

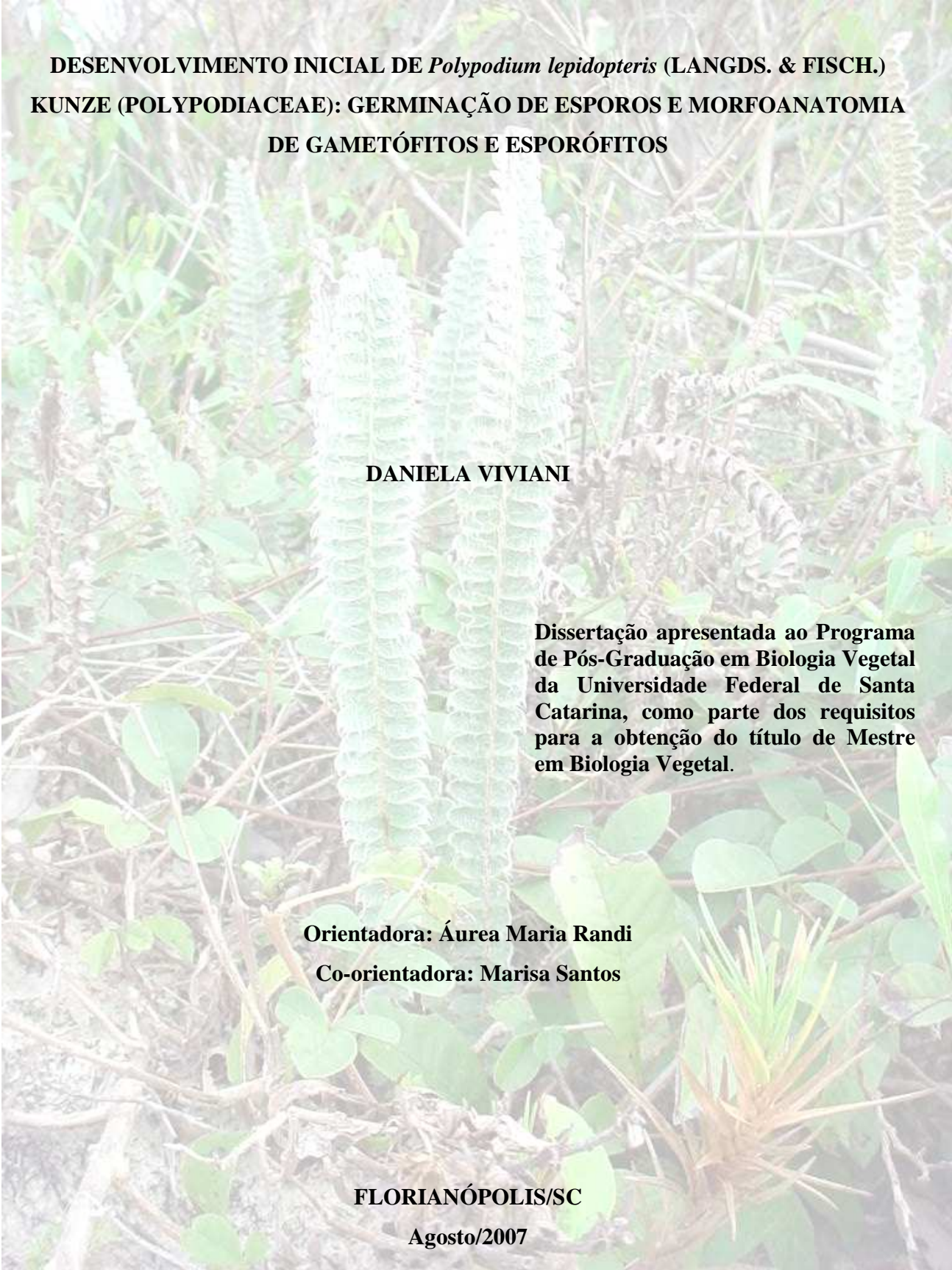
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

**DANIELA VIVIANI**

**DESENVOLVIMENTO INICIAL DE *Polypodium lepidopteris* (LANGDS. & FISCH.)  
KUNZE (POLYPODIACEAE): GERMINAÇÃO DE ESPOROS E MORFOANATOMIA  
DE GAMETÓFITOS E ESPORÓFITOS**

**FLORIANÓPOLIS/SC**

**Agosto/2007**



**DESENVOLVIMENTO INICIAL DE *Polypodium lepidopteris* (LANGDS. & FISCH.)  
KUNZE (POLYPODIACEAE): GERMINAÇÃO DE ESPOROS E MORFOANATOMIA  
DE GAMETÓFITOS E ESPORÓFITOS**

**DANIELA VIVIANI**

**Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Biologia Vegetal  
da Universidade Federal de Santa  
Catarina, como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de Mestre  
em Biologia Vegetal.**

**Orientadora: Áurea Maria Randi**

**Co-orientadora: Marisa Santos**

**FLORIANÓPOLIS/SC**

**Agosto/2007**

## Ficha Catalográfica

VIVIANI, Daniela

Desenvolvimento inicial de *Polypodium lepidopteris* (Langds. & Fisch.) Kunze (Polypodiaceae): germinação de esporos e morfoanatomia de gametófitos e esporófitos - 2007

f. 75; grafs, tabs.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Áurea Maria Randi

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas.

Bibliografia: f. 75.

1. Polypodiaceae; 2. *Polypodium*; 3. Germinação; 4. Gametófitos; 5. Esporófitos; 6. Morfoanatomia

**Dedico este trabalho,**

aos meus pais, Vili e Heloisa, por muitas vezes terem deixado de lado seus sonhos em favor dos meus e por serem minha fonte de amor e confiança.

**Amo vocês!**

## **Agradecimentos**

A Deus, essa força superior que nos guia e alimenta nossa alma.

À Professora Dra. Áurea Maria Randi, pela excelente orientação, pela amizade e paciência na hora dos ensinamentos, por todas as conversas que tivemos e principalmente pelo carinho com que me acolheu.

À Professora Dra. Marisa Santos, pela co-orientação, amizade e por todas as valiosas sugestões dadas para que este trabalho pudesse ser concluído com êxito.

À Professora Dra. Maria Terezinha Silveira Paulilo, pela amizade e sugestões nos trabalhos realizados.

Aos Professores Dra. Ana Claudia Rodrigues e Dr. Paulo Günter Windisch, por aceitar fazer parte da comissão examinadora deste trabalho.

Aos meus pais, Vili Viviani e Heloisa Ana Viviani, pelo amor e pelo apoio emocional e financeiro, sem os quais tudo teria sido muito mais difícil.

Ao meu irmão Fabio e minha cunhada Ediléia Buzzi, pelo carinho, apoio e pelos momentos de descontração.

À minha irmã Adriana (meu exemplo de mulher) e meu cunhado Yales R. de Novaes (meu exemplo de equilíbrio, dedicação e paciência), por me abrigarem em sua casa no primeiro ano do curso, por me mostrarem que valia à pena mesmo quando tudo parecia tão difícil e por ter compartilhado comigo grande parte das minhas angústias e alegrias em todos os momentos do trabalho.

À toda minha família, alicerce da minha vida, pelo incentivo.

À minha grande amiga Anelise Birckan (Ane Malu), pela amizade, alegria contagiante e pelas longas conversas sobre o nosso "futuro" (pois e agora!).

Às minhas amigas de infância Vanessa Poffo (Vane) e Raquel Viviani (Raque), pela eterna amizade e pelos momentos indispensáveis de descontração, festa e alegria.

Aos amigos inseparáveis da faculdade, Talita T. Pereira (Tali), Cláudia Brandt (Claudinha) e Juliano Albano (Ju), pela amizade que continua até hoje.

Aos colegas e amigos que conheci durante o mestrado, em especial Talía da Costa (Tá), pela amizade, alegria e por estar presente e me apoiar em momentos difíceis onde foi necessário tomar uma decisão.

À Ghislaine Lobo (Gi), por toda ajuda nos trabalhos realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal e pela amizade.

A Romualdo Morelatto Begnini, pela ajuda nas avaliações quando eu não pude estar presente.

À Vera Lúcia Araújo de Mello Zapelini, secretária do curso de Pós-graduação em Biologia Vegetal, por estar sempre disposta a ajudar com simpatia e dedicação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todos que, de certa forma, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

**Muito obrigada!**

“Embora ninguém possa voltar atrás e  
fazer um novo começo, qualquer um pode  
começar agora e fazer um novo fim”.

(Chico Xavier)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
3.1 LOCAL DE COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO .....	12
3.2 ESPÉCIE ESTUDADA.....	12
3.3 ACONDICIONAMENTO DOS ESPOROS .....	12
3.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS ESPOROS.....	14
3.5 ESTERILIZAÇÃO DOS ESPOROS .....	14
3.6 GERMINAÇÃO DOS ESPOROS .....	14
3.7 EFEITO DE DIFERENTES PHs NA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS .....	16
3.8 EFEITO DE DIFERENTES TEMPERATURAS NA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS.....	16
3.9 EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE LUZ NA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS.....	17
3.10 DESENVOLVIMENTO DOS ESPORÓFITOS.....	17
3.11 ESTUDO MORFOANATÔMICO DOS GAMETÓFITOS.....	18
3.12 CRESCIMENTO INICIAL E MORFOANATOMIA DOS ESPORÓFITOS JOVENS MANTIDOS EM SALA DE CRESCIMENTO.....	19
3.12.1 Análise de crescimento.....	19
3.12.2 Morfoanatomia dos esporófitos .....	20
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	21
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>22</b>
4.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS ESPOROS.....	22
4.2 EFEITO DE DIFERENTES PHs NA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS .....	24
4.3 EFEITO DE DIFERENTES TEMPERATURAS NA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS.....	28
4.4 EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE LUZ NA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS.....	32
4.5 ESTUDO MORFOANATÔMICO DOS GAMETÓFITOS.....	39
4.6 CRESCIMENTO INICIAL E MORFOANATOMIA DOS ESPORÓFITOS JOVENS MANTIDOS EM SALA DE CRESCIMENTO.....	43
4.6.1 Análise de crescimento.....	43
4.6.2 Morfoanatomia dos esporófitos .....	45



**5. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 52**

**6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 54**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> Ciclo de vida de pteridófito homosporada .....	<b>3</b>
<b>Figuras 02-04</b> Aspecto geral do esporófito de <i>Polypodium lepidopteris</i> .....	<b>8</b>
<b>Figura 05</b> Localização aproximada da área de coleta do material vegetal. Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição – Florianópolis/SC .....	<b>13</b>
<b>Figuras 06-08</b> Vista geral dos esporos de <i>Polypodium lepidopteris</i> em Microscopia Eletrônica de Varredura .....	<b>23</b>
<b>Figura 09</b> Vista geral dos esporos de <i>Polypodium lepidopteris</i> em Microscópio Óptico .....	<b>24</b>
<b>Figura 10</b> Germinação dos esporos de <i>Polypodium lepidopteris</i> em diferentes pHs .....	<b>25</b>
<b>Figura 11</b> Germinação dos esporos de <i>Polypodium lepidopteris</i> em diferentes temperaturas....	<b>29</b>
<b>Figura 12</b> Germinação dos esporos de <i>Polypodium lepidopteris</i> em diferentes níveis de luz ....	<b>33</b>
<b>Figuras 13-14</b> Esporos e gametófitos de <i>Polypodium lepidopteris</i> submetidos à 54 e 8% de luz total .....	<b>35</b>
<b>Figura 15</b> Gráfico de irradiâncias .....	<b>36</b>
<b>Figuras 16-22</b> Padrão de germinação e desenvolvimento gametofítico de <i>Polypodium lepidopteris</i> .....	<b>41</b>
<b>Figuras 23-28</b> Gametófitos de <i>Polypodium lepidopteris</i> com 120 dias de cultivo.....	<b>42</b>
<b>Figuras 29-32</b> Esporófitos de <i>Polypodium lepidopteris</i> .....	<b>44</b>
<b>Figuras 33-40</b> Morfoanatomia dos esporófitos de <i>Polypodium lepidopteris</i> .....	<b>47/48</b>

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 01</b> Efeito de diferentes pHs na germinação dos esporos de <i>Polypodium lepidopteris</i> ...	<b>27</b>
<b>Tabela 02</b> Efeito de diferentes temperaturas na germinação dos esporos de <i>Polypodium lepidopteris</i> .....	<b>30</b>
<b>Tabela 03</b> Efeito de diferentes níveis de luz na germinação dos esporos de <i>Polypodium lepidopteris</i> .....	<b>34</b>
<b>Tabela 04</b> Temperaturas mínimas e máximas obtidas no mês de novembro e dezembro de 2006 às 12h durante o teste de efeito de diferentes níveis de luz na germinação dos esporos de <i>Polypodium lepidopteris</i> .....	<b>38</b>
<b>Tabela 05</b> Altura de frondes e número de frondes na espécie <i>Polypodium lepidopteris</i> .....	<b>43</b>
<b>Quadro 01</b> Composição química do meio de Dyer (1979).....	<b>15</b>
<b>Quadro 02</b> Metodologia para fixação das amostras de gametófitos.....	<b>19</b>

## RESUMO

Diversas espécies de samambaias têm sido exploradas indiscriminadamente nas últimas décadas devido às suas características ornamentais, medicinais, ou para a confecção de vasos e solos. *Polypodium lepidopteris* (Langsd. & Fisch.) Kunze, apresenta propriedades medicinais cujas partes terapêuticas utilizadas são frondes, raízes e rizomas. Este trabalho tem por objetivo estudar a viabilidade e a morfologia dos esporos, verificar o efeito de diferentes níveis de luz, pH e temperatura no processo germinativo da espécie e analisar a morfoanatomia dos gametófitos durante seu desenvolvimento, além de analisar o desenvolvimento inicial dos esporófitos. Frondes férteis foram coletadas no litoral leste da Ilha de Santa Catarina, na Restinga da Praia da Joaquina, em Florianópolis-SC. Esporos foram filtrados em papel entreteia e armazenados a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ ; foram analisados em Microscópio Óptico (MO) onde foi observado que esporos viáveis são totalmente preenchidos com substância de reserva de coloração amarela e Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) mostrando esporos monoletes, com aproximadamente  $40\mu\text{m}$  de comprimento, apresentando depósitos esféricos na superfície ligeiramente papilada. O teste de germinação em diferentes pHs foi realizado em sala de cultivo a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  ( $22\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ); os resultados mostram que aos 7 dias de cultivo ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos pH 4 (9,5%) e pH 4,5 (22,25%). Nas demais avaliações, não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Diferentes temperaturas foram testadas (20, 25 e  $30^\circ\text{C}$ ) em câmara de germinação ( $17\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) sob fotoperíodo de 16 horas; as maiores porcentagens de germinação ocorreram a  $25^\circ\text{C}$  e menores a  $30^\circ\text{C}$ , sendo o percentual médio de germinação aos 28 dias de 35 e 2,25% respectivamente. O efeito que diferentes níveis de luz solar (54, 38, 22 e 8%) na germinação foi analisado. Os maiores percentuais de germinação foram encontrados sob 22% de luz (23,25%) e 8% de luz natural (28,5%). Quanto a morfoanatomia dos gametófitos, observou-se que após 15 dias de cultivo, os gametófitos filamentosos apresentam uma célula rizoidal alongada, aclorofilada, uma fileira de quatro a sete células clorofiladas; aos 30 dias a fase laminar espatulada está mais evidente e mostra um meristema apical central; após 45 dias os gametófitos são laminares e cordiformes; após 120 dias de cultivo, o meristema apical é nítido; tricomas unicelulares e estruturas reprodutivas são mais evidentes. Em relação ao crescimento inicial dos esporófitos, ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros avaliados no tempo 1 e no tempo 2 (60 dias após o início do tempo 1). A morfoanatomia dos esporófitos mostra que essa espécie apresenta escamas (tricomas) em ambas as faces das frondes, epiderme uniestratificada, mesófilo constituído por parênquima tendendo ao paliádico e parênquima esponjoso. Estômatos do tipo anomocítico estão presentes na face abaxial e as células epidérmicas possuem paredes anticlinais sinuosas. Feixe vascular anficrival delimitado por endoderme.

**Palavras-chaves:** *Polypodium lepidopteris*, germinação, morfoanatomia, gametófito, esporófito

## ABSTRACT

In the last few decades, several ferns which present ornamental or medicinal proprieties have been indiscriminately exploited for the confection of vases and ground. *Polypodium lepidopteris* (Langsd. & Fisch.) Kunze is a medicinal fern, which present therapeutic proprieties in the fronds, roots and rhizomes. The aim of this work was to study spore viability and morphology, verify the effects of different light levels, pH and temperature on spore germination and to analyze the phases of the gametophyte development, as well as to analyze the early sporophyte development. Fertile fronds were collected in the east coast of the Santa Catarina Island, in the dunes of the Joaquina Beach, in Florianópolis-SC. Spores were filtered through lens paper and stored at  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ . Under light microscopy (LM), the viable spores show yellow storage substances and under scanning electron microscopy (SEM), the spores are monolets, with approximately  $40\mu\text{m}$ , and show spherical deposits in the slightly papillated surface. The effect of different pHs on germination was carried in growth room at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  ( $22\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ); statistically significant difference was observed between the pH 4 (9.5% of germination) and the pH 4.5 (22.25% of germination) after 7 days of culture. Statistically significant differences were not found among the other treatments. The effect of different temperatures on germination was analyzed (20, 25 and  $30^\circ\text{C}$ ). The test was carried out in a germination chamber ( $17\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) under a 16h photoperiod; the higher percentage of germination was achieved at  $25^\circ\text{C}$  and the lowered at  $30^\circ\text{C}$ , which showed after 28 days of culture, 35.0% and 2.25% of germination respectively. The effect of natural light levels (54, 38, 22 and 8%) was analysed. The higher percentages of germination were found under 22 % of natural light (23.25%) and 8% of natural light (28.5%). Concerning gametophyte morfoanatomy, it was observed that after 15 days of culture, the filamentous gametophyte present a long rhizoidal cell, without chlorophyll, a four to seven row of chlorophyllated cells; after 30 days, the spatulated laminar phase is more evident, and show a central apical meristem; after 45 days, gametophyte are laminar and cordate; after 120 days of culture the apical meristem is conspicuous; unicellular trichomes and reproductive structures are very evident. Concerning to sporophyte initial growth, statistically significant difference were observed among the analyzed parameters between time 1 and time 2 (60 days started from time 1). The sporophyte morfoanatomy show scales (trichomes) in both the frond faces, unistratified epidermis, the mesophyll consisted of a parenchyma tending to palisade and spongy. The anomocytic stomata are presenting in the abaxial frond face and the epidermic cells show sinuous anticlinal walls. The vascular anficrival tissue is delimited by the endoderm.

**Word-keys:** *Polypodium lepidopteris*, germination, morfoanatomy, gametophyte, sporophyte

## 1. INTRODUÇÃO

As pteridófitas constituem um importante grupo de organismos da flora brasileira. São plantas vasculares, desprovidas de sementes, com duas fases heteromórficas em seu ciclo de vida, das quais a esporofítica é a duradoura e a gametofítica é a efêmera (Prado, 1998). A literatura cita um número de espécies variando de 9.000 a 12.000, das quais cerca de 3.250 ocorrem nas Américas (Tryon & Tryon, 1982; Windisch, 1992). Destas, aproximadamente 30% podem ser encontradas em território brasileiro. As regiões Sul e Sudeste do Brasil contêm cerca de 600 espécies e abrigam um dos centros de endemismo e especiação de pteridófitas no Continente Sul-Americano (Tryon, 1972).

Segundo Tryon & Tryon (1982) cerca de 65% das espécies de pteridófitas ocorrem em ambientes tropicais úmidos. Em ambientes florestais, onde existe uma variedade de microambientes, as pteridófitas apresentam uma maior diversidade em número de espécies e em tipos de hábitos (Senna & Kazmirczak, 1997). De acordo com Labiak & Prado (1998), as pteridófitas ocorrem preferencialmente nas áreas de Floresta Atlântica; mesmo assim, algumas espécies são encontradas nas regiões semi-áridas de caatinga no Nordeste brasileiro (Barros *et al.*, 1989; Ambrósio & Barros, 1997). Diversas espécies de samambaias têm sido exploradas indiscriminadamente nas últimas décadas, devido às suas características ornamentais, medicinais, ou para a confecção de vasos e solos (Santos *et al.*, 2001).

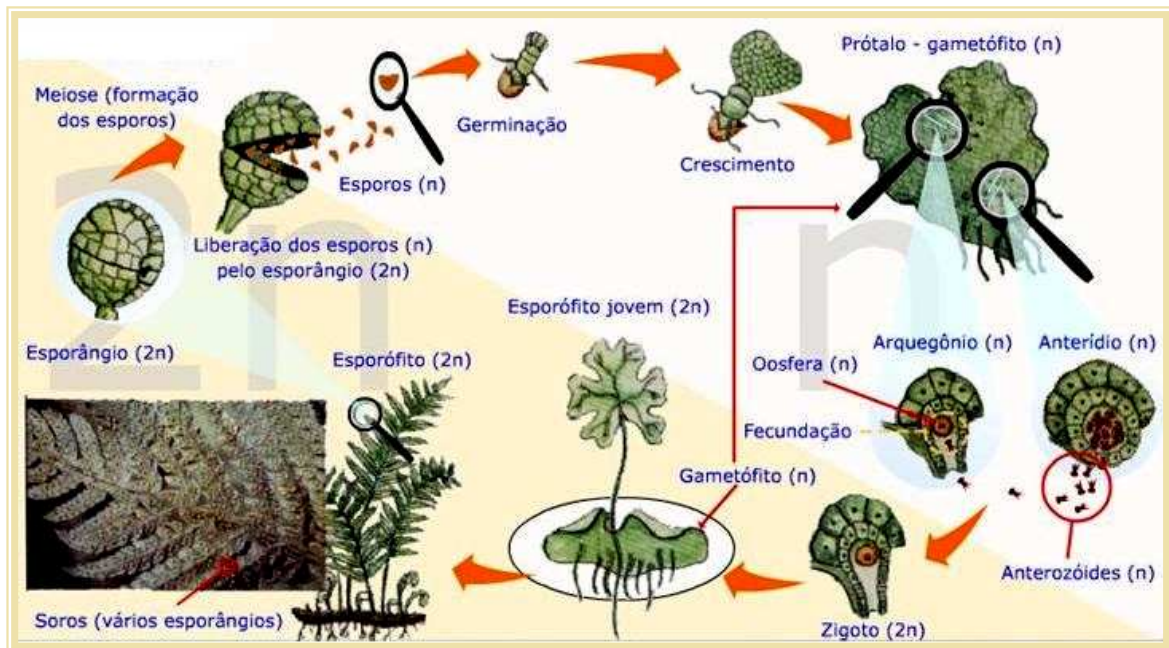
Segundo Santos (1973), populações nativas do Brasil já utilizavam samambaias, variando desde a preparação do local de parto (numa cama de frondes) até a decoração de túmulos. O mesmo autor relatou o uso de tronco de xaxim, pelo povo Xokleng no Sul do Brasil, para produzir uma bebida fermentada que era utilizada em ocasiões especiais. Ainda no Sul do Brasil,

muitas pessoas obtêm o sustento com a extração e comercialização de frondes de *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) para arranjos florais (Windisch, 2002).

Báculos de *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro (Onocleaceae), conhecida como samambaia avestruz, são comestíveis e comercializados em países como Estados Unidos e Canadá (Raven *et al.*, 2001). Segundo Bergeron & Lapointe (2000), no final da década de 90 do século passado, foram comercializadas 124 toneladas/ano de báculos congelados ou frescos de samambaia avestruz no Canadá.

Outro produto obtido a partir de pteridófitas são os troncos de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae), que são indiscriminadamente extraídos dos ecossistemas florestais e comercializados em forma de vasos e solo vegetal, sendo muito utilizados no cultivo de diversas espécies de plantas ornamentais (Santos *et al.*, 2001).

De acordo com Tryon & Tryon (1982), a maioria das espécies de pteridófitas pertence à ordem Filicales. São homosporadas, isto é, produzem apenas um tipo de esporos, e caracterizam-se por possuir alternância de gerações, uma gametofítica e outra esporofítica (Figura 01). A maioria das espécies possui semelhante capacidade de dispersão através do ar por longas distâncias; essa capacidade de dispersão dos esporos possibilita as pteridófitas ocuparem uma ampla área geográfica (Tryon, 1970).



**FIGURA 01** - Ciclo de vida de pteridófita homosporada.

FONTE: Disponível em: <<http://www.editorasaraiva.com.br>>. Acesso em: 27 jan. 2006.

As pteridófitas homosporadas apresentam esporos que são produzidos nos esporângios por meiose e depois são dispersos. Após a germinação, tais esporos quase sempre produzem gametófitos bissexuados que possuem tanto anterídios, quanto arquegônios e são independentes do esporófito quanto à nutrição. Dentro dos anterídios são produzidos numerosos anterozóides espiralados e multiflagelados que, quando maduros e com suprimento adequado de água, são liberados através do rompimento dos anterídios. Os anterozóides nadam em direção ao arquegônio, fecundam a oosfera e o zigoto resultante começa a dividir-se imediatamente. O embrião jovem cresce e diferencia-se diretamente em um esporófito adulto, obtendo sua nutrição inicialmente a partir do gametófito, porém, logo adquire um nível de fotossíntese suficiente para manter-se sozinho. Após o esporófito enraizar-se no solo, o gametófito desintegra-se (Raven *et al.*, 2001).



De acordo com Dyer (1979), os esporos de samambaias podem conter lipídios ou compostos protéicos como fonte de reserva. Esporos com alta quantidade de lipídios, apresentam coloração amarela e baixa quantidade de água, apresentando índices inferiores a 5% do peso de massa fresca total. Já os esporos que possuem compostos protéicos, como fonte de reserva, apresentam uma quantidade de água mais elevada, podendo chegar a 50% do peso de massa fresca total dos esporos. Segundo o mesmo autor a quantidade do composto de reserva está diretamente relacionada à viabilidade dos esporos, sendo que, esporos amarelos permanecem viáveis por um período de tempo maior que os esporos verdes.

Com relação à fisiologia da germinação de pteridófitas, estudos pioneiros realizados por Mohr (1956) mostram que os esporos da maioria das pteridófitas necessitam da luz para germinação. Miller (1968) constatou que dentre 88 espécies estudadas, apenas sete possuíam esporos que germinavam na escuridão completa, quando recebiam umidade, oxigênio e temperatura favoráveis. Alguns estudos realizados no Brasil por Esteves & Felipe (1985), mostraram que dentre nove espécies estudadas apenas duas apresentaram esporos que germinavam no escuro. Segundo Randi & Felipe (1988), a samambaia arbórea *Cyathea delgadii* Sternb. (Cyatheaceae) apresenta esporos fotoblásticos positivos sensíveis a tratamentos luminosos de luz vermelha de apenas um minuto de duração, após um período de 24 horas de embebição no escuro.

Os esporos de pteridófitas geralmente germinam em poucos dias. Simabukuro *et al.* (1993) estudaram a germinação de oito espécies de pteridófitas de mata ciliar e constataram que além de todas germinarem na presença de luz, o tempo médio de germinação variou de 2,61 dias (*Blechnum brasiliense* Desv. - Blechnaceae) a 9,01 dias (*Asplenium serra* Langsd. & Fisch. - Aspleniaceae). Filippini *et al.* (1999) mostraram que esporos de *Dicksonia sellowiana* Hook.

(Dicksoniaceae) atingiram a máxima porcentagem de germinação a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  em luz branca constante, após 8 ou 9 dias de inoculação.

Quanto às exigências relacionadas ao pH do meio de cultura há na literatura exemplos de espécies cuja germinação é favorecida em pHs mais baixos, como em *Ophioglossum palmatum* L. (Ophioglossaceae) cuja germinação de esporos ocorreu no escuro e foi mais alta após oito meses de inoculação em meio líquido, cujo pH foi ajustado para 4 (Whittier & Moyroud, 1993). A maior porcentagem de germinação de esporos de *Cheilanthes feei* Moore (Pteridaceae) foi observada em meio líquido, com pH ajustado para 4,5 (Nondorf *et al.*, 2003).

A morfoanatomia dos gametófitos de pteridófitas foi amplamente estudada por diversos autores, entre eles: Carafa (1990), Roux (1993), Prada *et al.* (1995), Chiou & Farrar (1997), Ramirez & Pérez-García (1998), Jaramillo *et al.* (1996 e 2000), Makgomol & Sheffield (2001), Suzuki (2003) e Hiendlmayer (2004). De acordo com os estudos desses autores, o desenvolvimento gametofítico pode ser grosseiramente dividido em três fases: fase filamentosa, fase laminar espatulada e fase laminar cordiforme, sendo que algumas das espécies apresentam tricomas desde a fase filamentosa até a fase laminar cordiforme. A maioria das espécies de pteridófitas citadas na literatura apresenta tricomas unicelulares, alguns dos quais são glandulares. Pérez-García *et al.* (1999) observaram que das seis espécies mexicanas do gênero *Dryopteris* (Driopteridaceae) estudadas, todas apresentavam tricomas capitados unicelulares. De acordo com estudos de Pérez-García *et al.* (1994, 1996), as espécies *Thelypteris rhachiflexuosa* Riba (Thelypteridaceae) e *Blechnum cycadifolium* (Colla) Sturm (Blechnaceae), apresentaram tricomas unicelulares glandulares em gametófitos.

Jaramillo *et al.* (2003) através de estudos morfoanatômicos observaram que em algumas espécies do gênero *Pleopeltis* havia formação de gametófitos com anterídios e arquegônios, mas

não ocorria a formação do esporófito. O mesmo já havia sido relatado por Bhattacharyya & Sem (1992), estando esse fato associado à formação de gametângios não férteis e/ou não funcionais.

Com relação ao estabelecimento de gametófitos e esporófitos, as pteridófitas podem apresentar exigências edafoclimáticas diferentes para cada fase de vida. De acordo com Simabukuro (2002), a fase gametofítica apresenta plasticidade morfológica frente a variações da intensidade e quantidade de luz, nutrição mineral, níveis hormonais, entre outros. Segundo Sato & Sakai (1981), gametófitos de *Vittaria lineata* (L.) Smith e *Vittaria graminifolia* Kaulf da família Vittariaceae, sobrevivem em áreas onde seus respectivos esporófitos não se desenvolvem, o mesmo ocorre em *Trichomanes speciosum* Willd. (Hymenophyllaceae) (Makgomol & Sheffield, 2001). Essa desigualdade na distribuição reflete a diferença na tolerância ecológica mostrada pelas duas gerações (Johnson *et al.*, 2000).

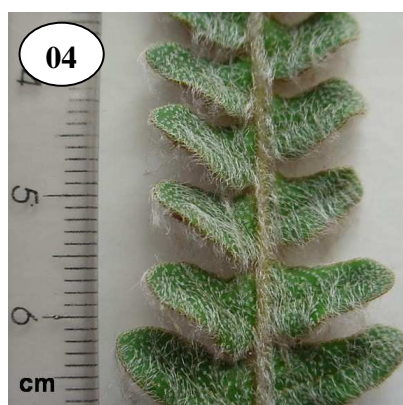
Condições ótimas para germinação de esporos são muitas vezes um reflexo das condições ótimas para todo ciclo de vida das pteridófitas. Como o gametófito é um estágio mais vulnerável do ciclo, sua fisiologia e a gama de condições ótimas necessárias para crescimento e desenvolvimento são limitadas. Conseqüentemente, essas mesmas condições para sobrevivência e desenvolvimento do gametófito são tipicamente congruentes com as condições ótimas para a germinação dos esporos (Raghavan, 1980).

A quantidade de luz disponível também é um fator importante para a ocorrência de pteridófitas (Lee *et al.*, 1997). Segundo Kitajima (1996), quando ocorrem mudanças nas condições de luz, a maioria das plantas, é capaz de, em maior ou menor grau, aclimatar-se à mudança ocorrida de maneira a maximizar o ganho total de carbono.

Ogura (1972), em sua obra sobre a anatomia comparada dos órgãos vegetativos de Pteridophyta, realizou estudos detalhados de várias famílias, reunindo um grande número de

dados relevantes até os dias atuais. Estudos morfoanatômicos dos esporófitos podem fornecer caracteres para a correta identificação das espécies (Guantay & Terán, 1995). Entretanto, um número elevado de espécies ainda não foi estudado anatomicamente (Graçano *et al.*, 2001). A anatomia estrutural da família Polypodiaceae foi estudada por alguns autores como: Allison (1911), Ogura (1935) e Nayar (1961) dentre outros.

A espécie *Polypodium lepidopteris* (Langsd. & Fisch.) Kunze (Figuras 02-04) que foi estudada no presente trabalho pertence à divisão Pteridophyta, classe Filicopsida, ordem Polypodiales e família Polypodiaceae (Tryon & Tryon, 1982). Segundo os mesmos autores, o gênero *Polypodium* é representado por plantas epífitas, rupícolas ou terrícolas. Caule horizontal curto a longo-reptante, moderadamente crasso a delgado, geralmente ramificado, com escamas peltadas a pseudopeltadas; superfície glabra ou pilosa, margem inteira ou denteada. As frondes são monomorfas a levemente dimorfas (com a fértil maior que a estéril), agrupadas ou espaçadas entre si. Pecíolo anguloso, sulcado, articulado com o caule, com um feixe vascular na base. Lâmina geralmente pinatífida, glabra ou pubescente. Soros arredondados ou alongados, ocasionalmente elípticos, abaxiais, sem indúsio ou protegidos por escamas ao redor (grupo *Polypodium lepidopteris*), com ou sem paráfises. Esporos elipsoidais, monoletes, superfície muitas vezes levemente verrucosa, tuberculada ou papilada.



**FIGURAS 02-04** - **02** Aspecto geral do esporófito de *Polypodium lepidopteris*; **03** - Detalhe de uma fronde fértil, face abaxial mostrando a disposição dos soros; **04** - Detalhe de uma fronde, face adaxial

Senna & Kazmirczak (1997) em um trabalho de levantamento florístico realizado no Estado do Rio Grande do Sul, registraram nove espécies da família Polypodiaceae, entre elas, *Polypodium lepidopteris*. De acordo com os autores, a espécie foi registrada quanto ao seu habitat como beira de mata, de hábito herbáceo terrestre e forma de crescimento reptante. A espécie encontra-se também entre os principais elementos da flora vascular da vegetação de praia e dunas frontais (área de restinga) como uma das espécies herbáceas mais características (Resolução

CONAMA nº 261/99). Para Schwartzburd (2006), em seu trabalho sobre Pteridófitas do Parque Estadual de Vila Velha (PEVV), Paraná, esta espécie possui hábito terrícola nos campos gerais (regiões mais elevadas) sendo também rupícola do cume das formações areníticas e arenitos isolados nos campos gerais. Segundo esse autor, esta é uma espécie preferencialmente litorânea, das restingas, porém foi registrada no PEVV, aproximadamente a 200 km da costa numa altitude de cerca de 1.000m em ambiente relativamente similar à restinga, qual seja, heliófilo e de solo arenoso.

Para que uma espécie se estabeleça na restinga, principalmente nas dunas móveis e semi-fixas, deve apresentar algumas características morfológicas como: porte reduzido ou rasteiro, sistema radicular profundo, folhas reduzidas, revestidas com uma camada de cera, pequeno número de estômatos na face abaxial das folhas pilosas, limbo em geral de consistência coriácea e brilhante, para refletir os raios solares (Bresolin, 1979; Caruso, 1983).

*Polypodium lepidopteris* está entre as plantas medicinais encontradas nas florestas úmidas do sul da América, cujas partes terapêuticas utilizadas são frondes, raízes e rizoma. A medicina tradicional brasileira reconhece para esta espécie propriedade sudorífera, anti-reumática, tônica, expectorante, útil na cura da bronquite, tosse e outras infecções da via respiratória. No Peru é também usada na cura de infecções urinárias e numerosos problemas cutâneos (Raintree Nutrition, 2005).

*P. lepidopteris* é utilizada em associação com a “cainca” (*Chiococca alba* (L.) Hitchc, Rubiaceae) sob forma de medicamento fitoterápico cujo nome comercial é “Rheumoflora®”, tendo sido inicialmente fabricado pelo laboratório “Flora Medicinal” e estando atualmente sob responsabilidade da “Natura do Brasil”. As partes da planta que possuem princípios ativos terapêuticos são frondes, raízes e rizomas. Este medicamento é indicado como analgésico e

antiinflamatório, sendo indicado no tratamento de reumatismo, dores musculares e dor ciática (Gazda *et al.*, 2006).

Há na literatura poucas informações a respeito da fisiologia de muitas espécies de pteridófitas, incluindo *Polypodium lepidopteris*. O conhecimento da fauna e flora é de extrema importância para os planos de conservação e necessário para aplicação dos projetos de manejo e preservação das espécies (Santiago & Barros, 2003).

Nesse sentido torna-se necessário o conhecimento das características ecofisiológicas, visando o manejo e conservação, bem como contribuir para a formação de recursos humanos que possam aplicar o conhecimento adquirido em benefício da preservação da flora de pteridófitas. Assim, esse trabalho tem como objetivo contribuir no conhecimento dos processos de desenvolvimento inicial do gametófito e esporófito de *P. lepidopteris* tendo em vista a carência de trabalhos com esta espécie.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar a viabilidade e a morfologia dos esporos, bem como o desenvolvimento gametofítico e o crescimento inicial dos esporófitos de *Polypodium lepidopteris* (Langsd. & Fisch.) Kunze.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Analisar sob microscopias óptica e eletrônica de varredura, a morfologia dos esporos de *P. lepidopteris*.
- Determinar a porcentagem de germinação dos esporos de *P. lepidopteris* em diferentes condições de cultivo: pH, temperatura e níveis de luz.
- Analisar o desenvolvimento morfoanatômico dos gametófitos e/ou segmentos dos mesmos.
- Analisar o crescimento inicial dos esporófitos crescidos em condições de laboratório através dos parâmetros: número total de frondes, altura da maior fronde.
- Analisar a morfoanatomia das frondes dos esporófitos jovens crescidos em condições de laboratório.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de coleta do material botânico**

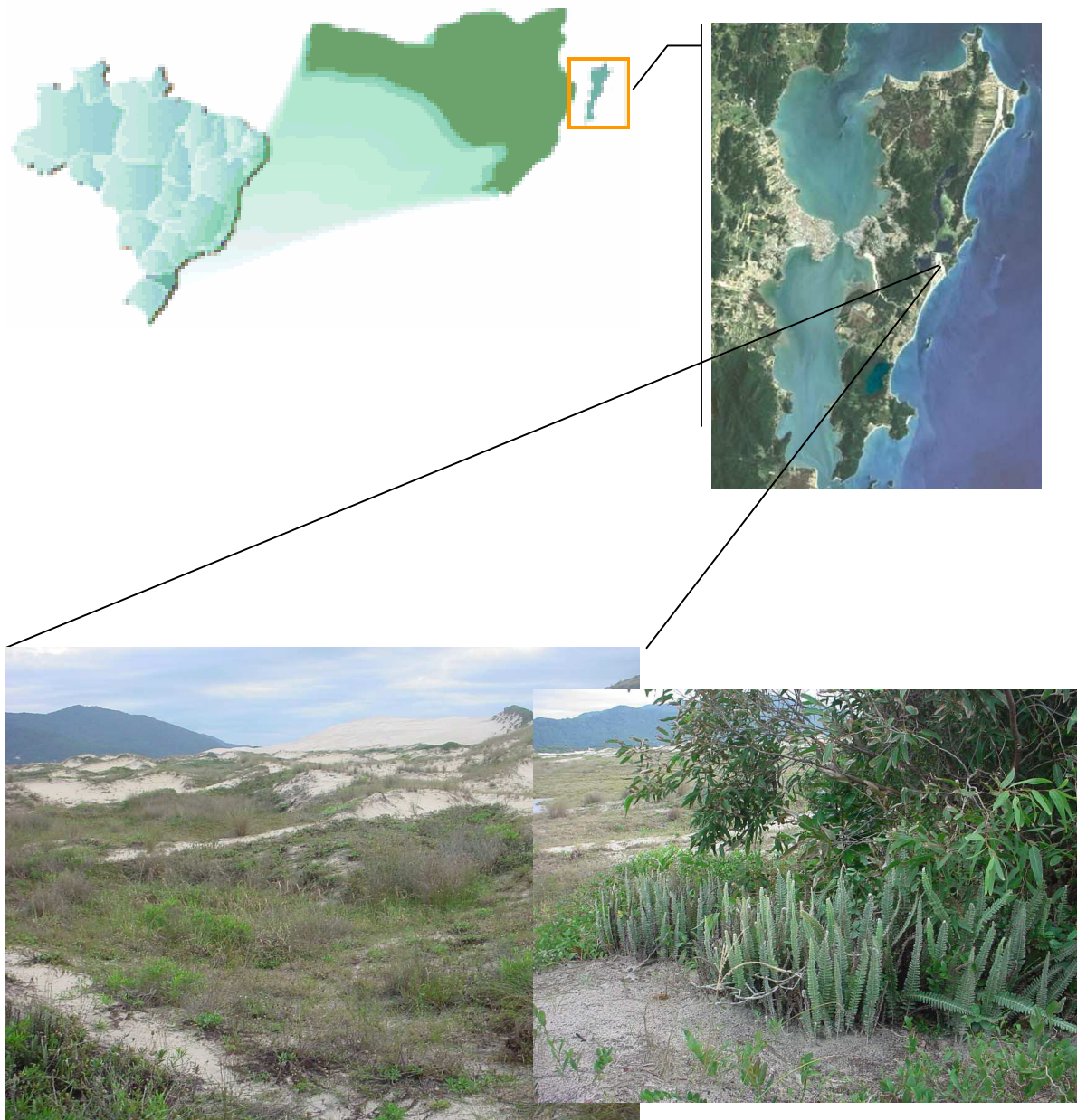
Fronde férteis da espécie foram coletadas no litoral leste da Ilha de Santa Catarina, na Restinga da Praia da Joaquina (Figura 05), situada dentro do distrito da Lagoa da Conceição, em Florianópolis, SC. Essa área pertence ao Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, unidade de conservação de proteção integral, decreto municipal nº 1.261, de 23 de maio de 1975 (CECCA, 1997).

#### **3.2 Espécie estudada**

Foram coletados esporos da espécie *Polypodium lepidopteris* (Langsd. & Fisch.) Kunze pertencente à divisão Pteridophyta, ordem Polypodiales e família Polypodiaceae.

#### **3.3 Acondicionamento dos esporos**

Após a coleta, as frondes foram postas para secar em bandejas plásticas sobre papel de filtro à temperatura ambiente, em laboratório, para induzir a abertura dos esporângios e liberação dos esporos. Em seguida, os esporos foram separados dos esporângios por filtragem em papel entreteia (ou papel de lente) e armazenados em frascos de vidro sob refrigeração a  $7 \pm 1^{\circ}\text{C}$  (Randi, 1987).



**FIGURA 05** - Localização aproximada da área de coleta do material botânico. Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição – Florianópolis/SC

FONTE da imagem de satélite da Ilha de Santa Catarina: Disponível em: <<http://www.spg.sc.gov.br>>. Acesso em: 02 abr. 2007.

### **3.4 Análise microscópica dos esporos**

Foram preparadas lâminas com esporos armazenados em frascos de vidro sob refrigeração a  $7 \pm 1^{\circ}\text{C}$  (Randi, 1987). Foi colocada uma pequena porção de esporos sobre a lâmina, pingando-se sobre estes uma gota de água e cobrindo-os em seguida com lamínula. O material foi fotografado em microscópio óptico da marca Leica MPS 30 DMLS, equipado com fotoautomático, no Laboratório de Anatomia Vegetal do CCB/UFSC. Amostras secas foram colocadas sobre suporte de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face e cobertas com 20nm de ouro, em metalizador Baltec, modelo CED 030. A análise e documentação foram efetivadas em Microscópio Eletrônico de Varredura, marca Phillips, modelo XL30, pertencente ao Laboratório de Materiais da UFSC.

### **3.5 Esterilização dos esporos**

Esporos de *Polypodium lepidopteris* foram previamente separados dos esporângios e esterilizados superficialmente pela lavagem em solução de hipoclorito de sódio comercial (Q-Boa<sup>®</sup>, com 2% de cloro ativo), diluída a 10% e acrescida de uma gota de detergente líquido comercial, durante 20 minutos; em seguida os esporos foram enxaguados em água destilada esterilizada em autoclave e filtrados a vácuo sobre papel de filtro (Randi & Crozier, 1991).

### **3.6 Germinação dos esporos**

Os esporos previamente esterilizados foram inoculados em 08 frascos erlenmeyers contendo 15mL de solução nutritiva de Mohr (1956), segundo Dyer (1979) (Quadro 01),

acrescida de Benlate® (25 mg.L<sup>-1</sup>) para evitar contaminação por fungos. A vidraria utilizada, bem como a solução nutritiva, foram previamente esterilizadas em autoclave por 20 minutos a uma temperatura de 120<sup>0</sup>C. Para cada repetição (01 frasco erlenmeyer) aproximadamente 10mg de esporos foram inoculados com auxílio de espátula. Os erlenmeyers foram tampados com filme de polipropileno de uso doméstico da marca Assafácil®, fixos por elástico e transferidos para sala de crescimento com irradiância à altura dos frascos de aproximadamente 22 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. A iluminação foi obtida pelo uso de lâmpadas fluorescentes brancas e o fotoperíodo foi de 16 horas a uma temperatura de 25 ± 2<sup>0</sup>C. Esse material foi mantido nessas condições durante 30 dias.

Compostos Químicos	Quantidade
Sulfato de Magnésio.....	510 mg/L
Nitrato de Potássio.....	120 mg/L
Nitrato de Cálcio.....	1440 mg/L
Fosfato de Potássio Dibásico.....	250 mg/L
Solução de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O e NaEDTA.....	1 ml/L
Água destilada até completar 1 (um) litro.	
<u>Preparação:</u> mistura-se todos os ingredientes.	
Solução de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O e NaEDTA:	
NaEDTA.....	33,2 g/L
Hidróxido de Sódio.....	3,65 g/L
Sulfato de Ferro .....	25 g/L
Água destilada até completar 1 (um) litro	
<u>Preparação:</u> Mistura-se todos os ingredientes	

**QUADRO 01** - Composição química do meio de Dyer (1979).

### **3.7 Efeito de diferentes pHs na germinação dos esporos**

Esporos previamente esterilizados foram inoculados em 24 frascos erlenmeyers (quatro repetições por tratamento) e mantidos conforme 3.6. Foram estabelecidos seis tratamentos: pH 4, pH 4,5, pH 5, pH 5,5, pH 6 e pH 6,7 (controle). A germinação foi acompanhada em intervalos de sete dias, sendo que para cada dia de avaliação foram preparadas quatro lâminas (repetições) por tratamento e contados 100 esporos por lâmina, em microscópio binocular, em aumento de 100 vezes. Para essas avaliações foram verificadas as porcentagens de esporos germinados, de esporos viáveis e de esporos inviáveis. Foram considerados esporos germinados os que apresentaram protrusão de rizóide; viáveis os que apresentaram coloração amarela; e inviáveis os que se apresentaram translúcidos indicando ausência de substâncias de reserva. Os cálculos de porcentagem de germinação foram feitos tendo como base somente os esporos viáveis, desconsiderando os inviáveis.

### **3.8 Efeito de diferentes temperaturas na germinação dos esporos**

Esporos foram inoculados conforme 3.6 e mantidos em câmara de crescimento com irradiância à altura dos frascos de aproximadamente  $17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A iluminação foi obtida pelo uso de lâmpadas fluorescentes brancas e o fotoperíodo foi de 16 horas. A germinação foi avaliada conforme descrito em 3.7. Foram realizados três tratamentos: 20, 25 e 30°C.

### **3.9 Efeito de diferentes níveis de luz na germinação dos esporos**

Esporos foram inoculados para a germinação conforme 3.6 e mantidos em armações de madeira de 50cm<sup>3</sup> revestidas por tela sombrite (caixas), que reduzem a insolação natural em aproximadamente 54, 38, 22 e 8%. Os níveis de densidade de fluxo de fótons dentro das caixas foram analisados diariamente às 12:00 horas, por quantômetro LICOR 250, munido de sensor PAR (400 a 700nm). Em um dia ensolarado de novembro, ao meio dia, a densidade de fluxo de fótons nesse local atingiu 1175 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Paralelamente foram registradas as temperaturas máximas e mínimas diárias dentro de cada caixa. Esse experimento foi realizado sob luz solar plena nas dependências do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina. A germinação foi avaliada conforme descrito em 3.7.

### **3.10 Desenvolvimento dos esporófitos**

Após 30 dias em meio de cultivo líquido, os gametófitos filamentosos, obtidos a partir da metodologia especificada no item 3.6, foram transferidos para bandejas de polipropileno transparente com tampa, contendo o substrato areia + composto comercial Húmus Aduplan<sup>®</sup> + terra roxa estruturada na proporção de 1:1:1 (volume:volume). O substrato foi previamente esterilizado em autoclave por 60 minutos a uma temperatura de 120<sup>0</sup>C (para evitar a contaminação do material com esporos de outras espécies que possam ocorrer no banco de esporos dos solos utilizados). As bandejas permaneceram em sala de crescimento com irradiância de aproximadamente 22 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ . A iluminação foi obtida pelo uso de lâmpadas fluorescentes brancas em regime de 16h de luz, a uma temperatura de 25  $\pm$  2<sup>0</sup>C. A partir do surgimento dos

primeiros esporófitos foi realizada uma repicagem aleatória de aproximadamente 200 gametófitos para quatro bandejas transparentes de polietileno contendo o mesmo substrato, sendo transplantados 50 (cinquenta) gametófitos por bandeja. A repicagem foi feita para obtenção de plântulas que foram utilizadas para analisar crescimento inicial de esporófitos crescidos em condições de laboratório e a morfoanatomia de frondes de esporófitos jovens crescidos nas mesmas condições. O material permaneceu nas mesmas condições ambientais utilizadas anteriormente à repicagem.

Os esporófitos obtidos a partir desta metodologia foram transferidos, individualmente, para mini-vasos de 125mL de volume com o mesmo substrato. Esses vasos foram acondicionados em bandejas plásticas transparentes San Remo<sup>®</sup> (tipo organizador) com volume total de 28,2L, com tampa para evitar ressecamento e mantidas nas mesmas condições anteriormente citadas.

### **3.11 Estudo morfoanatômico dos gametófitos**

Amostras obtidas a partir da germinação de esporos inoculados segundo metodologia 3.6 e 3.10 foram coletadas e fixadas quinzenalmente após a inoculação dos esporos (item 3.6), até o início da fase de fecundação dos gametófitos, para a caracterização do desenvolvimento morfoanatômico. A fixação foi realizada para promover a melhor preservação das estruturas que foram posteriormente estudadas e documentadas em microscopia óptica. A fixação das amostras foi feita em glutaraldeído a 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2 (Quadro 2), e o material foi conservado em etanol 70% (Bozzola & Russel, 1991).

Gametófitos e/ou segmentos dos mesmos fixados e mantidos em etanol 70% foram colocados sobre lâminas com água e cobertos com lamínulas para observação em microscópio

óptico. O registro de imagens foi feito em microscópio óptico marca Leica MPS 30 DMLS, equipado com fotoautomático, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica do Centro de Ciências Biológicas (CCB/UFSC).

Glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M – pH 7,2 (Bozzola & Russel, 1991)

Compostos químicos:

Glutaraldeído 25%..... – 5ml  
Tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2..... – 45ml

Solução A – 2,76 g de Fosfato de sódio monobásico monoidratado

Completar com água destilada até 100ml

Solução B – 5,37 g de Fosfato de sódio dibásico heptaidratado

Completar com água destilada até 100ml

Preparo: Para preparar tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 devem ser misturadas as soluções A e B: A – 28ml e B – 72ml (volume final – 100ml). Depois adicionar os 5 de glutaraldeído em 45ml da solução final de tampão fosfato. Manter em geladeira.

Procedimento de uso: O material deve permanecer na solução de fixação por 2 a 3 horas. Posteriormente lavar por 3 vezes em tampão fosfato e desidratar em etanol: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70% – ½ hora em cada. Pode ser conservado em etanol 70%.

## **QUADRO 02 - Metodologia para fixação das amostras de gametófitos**

### **3.12 Crescimento inicial e morfoanatomia dos esporófitos jovens mantidos em sala de crescimento**

#### **3.12.1 Análise de crescimento**

Esporófitos jovens individualizados conforme 3.10 foram utilizados para este estudo. No dia da implantação do experimento (tempo 1 - T<sub>1</sub>), foram tomadas as seguintes medidas de 30



plântulas: número de frondes e altura da maior fronde. As mesmas medidas foram coletadas após 60 dias (tempo 2 - T<sub>2</sub>). Através das medidas de altura foi calculada:

- Taxa de crescimento relativo em altura (TCRL):  $L_2 - L_1 / T_2 - T_1$  onde L<sub>2</sub> é o logaritmo da altura da fronde no tempo 2 (T<sub>2</sub>) e L<sub>1</sub> é o logaritmo da altura da fronde no tempo 1 (T<sub>1</sub>) (Bernabe *et al.*, 1999).

T<sub>1</sub> = tempo inicial

T<sub>2</sub> = tempo final

### **3.12.2. Morfoanatomia dos esporófitos**

Para o estudo morfoanatômico, algumas amostras da região média dos folíolos de esporófitos foram seccionadas à mão-livre, com auxílio de lâmina de aço. Foram feitas, em material *in vivo*, secções paradérmicas para observações em vista frontal da superfície epidérmica e dos estômatos; secções transversais do folíolo, para observação dos tecidos constituintes e tricomas e secções transversais da ráquis.

### 3.13 Análise estatística dos dados

Os resultados de germinação foram expressos em porcentagem e para cada dia de avaliação foram calculados: média, variância, intervalo de confiança e desvio padrão (Sokal & Rohlf, 1969). Os resultados foram analisados pelos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ( $D_{max}$ ) e de Bartlett ( $X^2$ ), para verificação da homogeneidade das variâncias (Santana & Ranal, 2004). Sempre que se constatou que os dados não seguiam a distribuição normal ou não mostravam variâncias homogêneas, estes foram transformados em valor angular ( $\arcsen x \sqrt{\%}$ ) e novamente submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade das variâncias. A análise de variância (Multifactor ANOVA) foi seguida do teste de comparação de médias (Tukey 5%) quando os dados apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas. No caso de os dados não apresentarem normalidade ou homogeneidade de variâncias mesmo após a transformação angular, a análise de variância foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $H$ ) seguido de teste de Dunn (Zar 1999).

Os resultados dos estudos sobre desenvolvimento de esporófitos foram submetidos aos mesmos testes anteriormente citados. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os resultados foram analisados pelos softwares Excel e Minitab (Microsoft), BioEstat e Statgraphics.

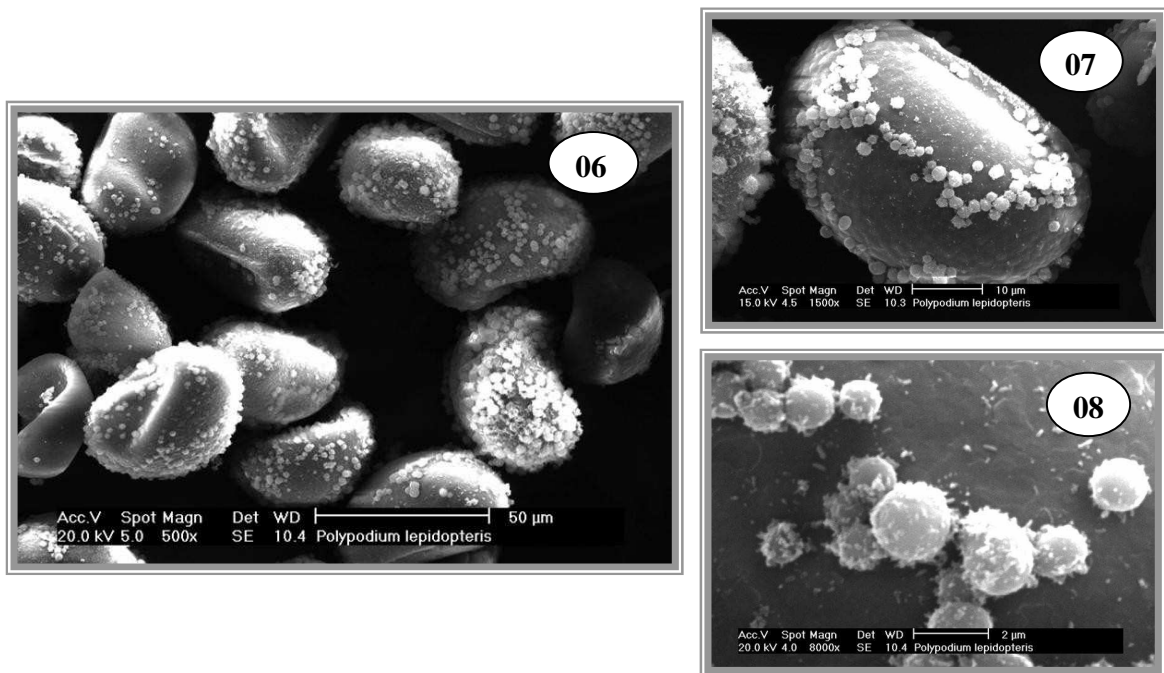
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise microscópica dos esporos

Os esporos são monoletes (Figuras 06 e 07), com aproximadamente 40µm de comprimento, apresentando superfície ligeiramente papilada e com depósitos esféricos (Figura 08). Estes registros estão de acordo com os dados da literatura, onde Tryon & Tryon (1982) citam que os esporos dessa espécie são papilados, com grandes depósitos esféricos e os esporos maduros do gênero *Polypodium* apresentam um perisporo fino, que freqüentemente segue os contornos do exósporo verrugoso ou rugoso. Segundo Lorscheitter *et al.* (2005), os esporos de *Polypodium lepidopteris* são elípticos, monoletes, possuem exósporo verrucoso, com pequena verrugas delicadas e distribuídas uniformemente em toda a superfície do esporos; o perisporo é papilado-granulado e os glóbulos são conspícuos, sendo espalhados ou densamente granulados.

Lorscheitter *et al.* (2005) observaram esporos monoletes para espécies dos gêneros *Campyloneurum*, *Microgramma*, *Niphidium*, *Pecluma*, *Pleopeltis* e *Polypodium* (Polypodiaceae). Pérez-García *et al.* (1998), comparando o desenvolvimento gametofítico de três espécies do gênero *Phlebodium* (Polypodiaceae) encontraram para as três espécies esporos monoletes e de coloração amarela. Esporos de *P. araneosum* M. Martens & Galeotti e *P. pseudoaureum* Cav. Lellinger mediram 40-48 µm de diâmetro e apresentaram superfície papilada. Os esporos de *P. decumanum* Willd. apresentaram um diâmetro de 36-40 µm e superfície verrugosa.

Esses dados mostram que as dimensões e forma dos esporos de *P. lepidopteris* são semelhantes às encontradas para outros esporos do mesmo gênero e de outros gêneros de Polypodiaceae.



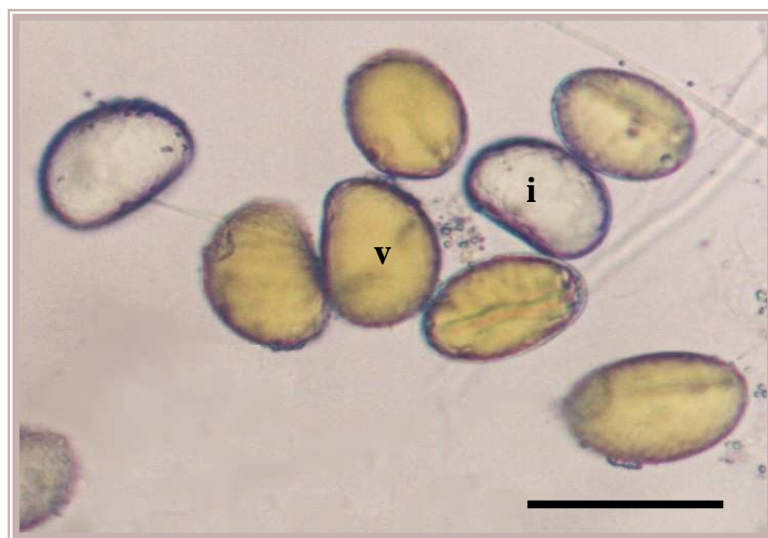
**FIGURAS 06-08** - Esporos de *Polypodium lepidopteris* em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). **06** - Vista geral dos esporos (Barra: 50 µm); **07** - Detalhe de um esporo (Barra: 10 µm); **08** - Imagem detalhada da superfície de um esporo, mostrando os depósitos esféricos (Barra: 2 µm).

Os esporos viáveis de *Polypodium lepidopteris* são totalmente preenchidos com substâncias de reserva de coloração amarela; já os esporos ocos ou que possuem poucas gotículas dessas substâncias são inviáveis (Figura 09). De acordo com Dyer (1979), esporos que apresentam alta quantidade de lipídios como fonte de reserva apresentam coloração amarela e baixa quantidade de água, apresentando índices inferiores à 5% do peso de massa fresca total.

Pela coloração característica, os esporos de *P. lepidopteris* provavelmente também apresentem lipídios como principal substância de reserva.

A presença de lipídios nas células protálicas iniciais é encontrada em diferentes espécies de Polypodiaceae, entre elas *Polypodium lepidotrichum* Feé Maxon (Reyes & Pérez-García,

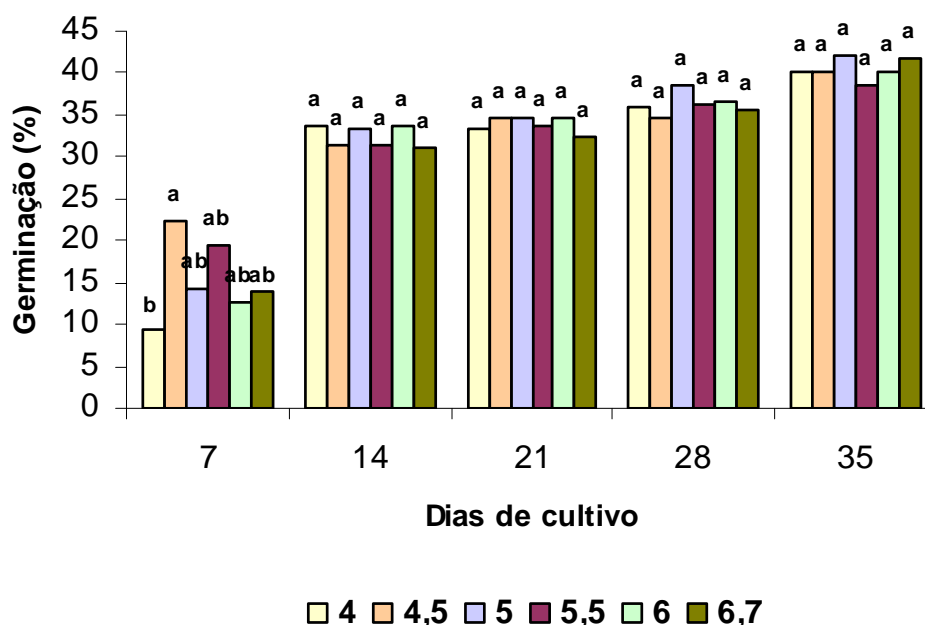
1994), *Pleopeltis percusa* Cav. Hook. (Bhattacharyya & Sen, 1992), *Phlebodium araneosum*, *P. pseudoaureum* e *P. decumanum* (Pérez-García *et al.*, 1998) e *Microgamma nitida* J. Sm. (Ramirez & Pérez-García, 1998). Segundo Jaramillo *et al.* (2003), essas gotas de lipídio de coloração amarela seguramente participam no metabolismo de crescimento e divisão celular que uma vez iniciado não cessa até formar a lâmina protálica.



**FIGURA 09** - Vista geral dos esporos de *Polypodium lepidopteris* em Microscópio Óptico (MO); detalhe da coloração de esporos viáveis e inviáveis. **v** - espora viável; **i** - espora inviável. (Barra: 50 $\mu$ m)

#### 4.2 Efeito de diferentes pHs na germinação dos esporos

Os resultados referentes ao estudo de diferentes pHs na germinação dos esporos de *Polypodium lepidopteris* mostram que na primeira avaliação, realizada aos sete dias de cultivo, ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos pH 4 e pH 4,5, apresentando percentual médio de germinação de 9,5 e 22,25% respectivamente (Figura 10).



**FIGURA 10** - Germinação dos esporos de *Polypodium lepidopteris* em diferentes pHs. Letras diferentes diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey.

Nas demais avaliações não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Aos 35 dias de cultivo com a estabilização da germinação, o percentual médio de esporos germinados foi de 40,25% (pH 4), 40,25% (pH 4,5), 42% (pH 5), 38,5 % (pH 5,5), 40,25% (pH 6) e 41,75% (pH 6,7) conforme mostrado na Tabela 01. Os resultados indicam que a princípio, o pH da solução nutritiva dentro da faixa analisada neste trabalho, não teve influência nas porcentagens finais de germinação, tendo em vista que não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, porém ocorreu um retardo na germinação, no pH 4. Dessa forma, essa espécie apresenta uma grande plasticidade com relação ao fator estudado.

Nondorf *et al.* (2003) estudando o efeito do pH na germinação dos esporos de *Cheilanthes feei* Moore (Pteridaceae), observaram que os esporos apresentaram taxas de germinação maiores

em pHs ácidos (pH 4,5 e 5,5), porém a germinação ocorreu em uma vasta gama de pHs (pH 4,5, 5,5, 6 e 8,5). Dessa forma, esta espécie também possui um potencial para ocupar uma grande diversidade de ambientes. Os dados mostram que *C. feei* é extremamente versátil embora o pH levemente ácido promoveu uma taxa de germinação maior que o pH básico, ao contrário do que ocorreu com *Polypodium lepidopteris*.

Estudos usando esporos de pteridófitas leptosporangiadas têm mostrado que a melhor germinação ocorre em pH ligeiramente ácido ou neutro (Miller, 1968). Porém há variações nas respostas de esporos às condições fortemente ácidas. Em algumas espécies não há germinação (Hevly, 1963) ou há uma baixa porcentagem de germinação (Mohr, 1956). Em outras espécies, moderados níveis de germinação ocorrem, mas o desenvolvimento gametofítico é limitado (Courbet, 1955; Otto *et al.*, 1984). Esporos de espécies terrestres de Ophioglossaceae respondem ao pH do meio nutritivo similarmente aquelas pteridófitas leptosporangiadas, que germinam melhor em um pH ligeiramente ácido (Whittier, 1981). Os esporos de *Ophioglossum palmatum* L. germinam melhor em condições fortemente ácidas, sendo que a germinação é reduzida ou eliminada em condições ligeiramente ácidas ou neutras (Whittier & Moyroud, 1993).

Com relação ao fator pH, esporos de *P.lepidopteris* se comportaram como a maioria das espécies dos trabalhos citados, cuja preferência é pelos pHs moderadamente ácidos ou neutros.

**TABELA 01** – Efeito de diferentes pHs na germinação dos esporos de *Polypodium lepidopteris*. *Dmax* é a estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov para normalidade dos dados;  $\chi^2$  é a estatística do teste de Bartlett's para homogeneidade de variâncias, *H* é o teste de Kruskal-Wallis e *F* é a estatística da análise de variância (ANOVA). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade.

Ph	DIAS DE GERMINAÇÃO				
	7	14	21	28	35
	<b>GERMINAÇÃO (%) MÉDIA ± ic</b>				
<b>4</b>	9,5±1,75b	33,75±0,42a	33,5±0,19a	36±0,62a	40,25±0,7a
<b>4,5</b>	22,25±2,48a	31,5±2,01a	34,5±1,25a	34,5±0,8a	40,25±0,7a
<b>5</b>	14,25±1,11ab	33,5±1,05a	34,75±0,17a	38,5±1,18a	42±1,10a
<b>5,5</b>	19,5±1,05ab	31,5±1,18a	33,75±1,88a	36,25±0,97a	38,5±0,65a
<b>6</b>	12,75±1,11ab	33,75±1,3a	34,75±1,01a	36,5±1,05a	40,25±1,36a
<b>6,7</b>	14±1,32ab	31±1,23a	32,25±2,09a	35,75±1,88a	41,75±1,59a
<i>Dmax</i>	0,105	0,056	0,051	0,055	0,084
$\chi^2$	3,444	4,603	18,613*	3,967	3,975
<i>H</i>			2,13 (ns)		
<i>F</i>	4,079	0,3392		0,5815	0,6261

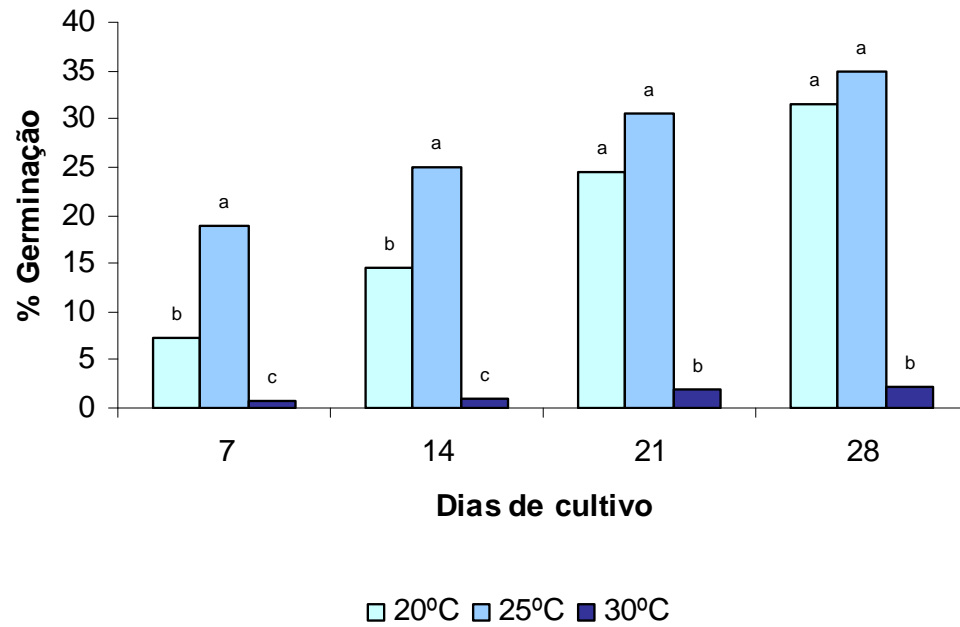
\* Variâncias não são homogêneas. O teste de Tukey foi realizado para os dias 7, 14, 28 e 35.



### 4.3 Efeito de diferentes temperaturas na germinação dos esporos

Os percentuais médios de germinação dos esporos e as análises estatísticas aplicadas nesse experimento estão apresentados na Figura 11 e na Tabela 02. Os dados não mostraram normalidade ou homogeneidade de variâncias para as avaliações de germinação realizadas após 7, 14 e 28 dias, mesmo após a transformação dos dados em valor angular. Por este motivo, de acordo com Santana & Ranal (2004), foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis ( $H$ ) seguido do teste de Dunn para a comparação das médias. No entanto, esse método ocultou as nítidas respostas biológicas observadas. Por esse motivo, foi realizada também a análise de variância (ANOVA) (teste  $F$ ) seguida do teste de Tukey. Esse método foi mais compatível com as respostas biológicas obtidas. Dessa forma, optou-se por empregar esse método para a comparação das médias.

A Figura 11 mostra que aos 7 e 14 dias de cultivo ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e a maior porcentagem de germinação foi obtida a 25°C, seguida das porcentagens obtidas a 20 e 30°C. Aos 21 dias os resultados obtidos a 20 e 25°C não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, porém diferiram dos resultados a 30°C. O mesmo ocorreu aos 28 dias de cultivo. Por outro lado, a germinação foi drasticamente inibida a 30°C em todas as avaliações. Os dados apresentados neste trabalho mostram que nas condições utilizadas, a germinação de esporos de *P. lepidopteris* foi otimizada à temperatura de 25°C; embora aos 21 e 28 dias não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre os percentuais de germinação obtidos a 20 e 25°C. Tais condições devem ter sido adequadas ao metabolismo da germinação e ao desenvolvimento gametofítico.



**FIGURA 11** - Germinação dos esporos de *Polypodium lepidopteris* em diferentes temperaturas. Letras diferentes diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey.

**TABELA 02** – Efeito de diferentes temperaturas na germinação dos esporos de *Polypodium lepidopteris*. *Dmax* é a estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov para normalidade dos dados;  $\chi^2$  é a estatística do teste de Bartlett's para homogeneidade de variâncias; *H* é o teste de Kruskal-Wallis e *F* é a estatística da análise de variância (ANOVA).

Temperatura (°C)	DIAS DE GERMINAÇÃO			
	7	14	21	28
	GERMINAÇÃO (%) MÉDIA ± ic			
20	7,25±1,71b	14,5±1,96b	24,5±1,84a	31,5±1,05a
25	19±0,62a	25±0,28 <sup>a</sup>	30,5±0,8a	35±0,73a
30	0,75±0,32c	1±0,28c	2±0,55b	2,25±0,75b
<i>Dmax</i>	0,181	0,164	0,173	0,204*
$\chi^2$	6,050*	8,429*	2,173	4,092
<i>H</i>	9,0412 (s)	9,9155 (s)		8,5781 (s)
<i>F</i>	34,416 (s)	39,166 (s)	71,28 (s)	201,597 (s)

\* Valores não seguem a normalidade ou a homogeneidade de variâncias.

Os percentuais de germinação de esporos de pteridófitas a 25°C são altamente variáveis. Esteves & Felipe (1985), estudaram a germinação de nove espécies de samambaias que ocorrem em cerrados do Estado de São Paulo. As porcentagens de germinação variaram de valores próximos a 100% para *Polypodium latipes* Langsd. & Fisch., *P. pleopeltifolium* Raddi e *P. squamulosum* Kaulf (Polypodiaceae), ao redor de 25% para *Adiantum serratodentatum* Willd. e ao redor de 48% para *P. hirsutissimum* Raddi.

Pérez-García & Riba (1982) realizaram estudos com espécies de Cyatheaceae e Dicksoniaceae: *Lophosoria quadripinnata* (Gmel.) C. Chr, *Trichipteris bicrenata* (Liebm) Tryon, *Trichipteris scabriuscula* (Maxon) Tryon, *Nephelea mexicana* (Schl. & Cham.) Tryon e *Cyathea fulva* (Mart.& Gal.) Fée e observaram também que temperaturas acima de 25°C diminuíram a porcentagem de germinação de todas as espécies e o ótimo ficou entre 18 a 25°C. Segundo Ranal (1999), para espécies de pteridófitas de floresta mesofítica semidecídua do Estado de São Paulo, a germinação foi semelhante em todas as temperaturas testadas para *Polypodium hirsutissimum* Raddi, *Polypodium latipes* (L.) Watt. e *Pteris denticulata* Sw. (Polypodiaceae); a maior germinabilidade foi observada novamente entre temperaturas de 18 e 25°C para esporos de *Micrograma lindbergii* (Kuhn) Sota, *Micrograma squamulosa* (Kaulf.) Sota e *Polypodium polypodioides* (L.) Watt., espécies da família Polypodiaceae. Para esporos de *Adiantopsis radiata* (L) Fée (Pteridaceae) e *Polypodium pleopeltifolium* Raddi (Polypodiaceae) a maior germinabilidade foi encontrada entre 21 e 29°C.

Brum & Randi (2002) observaram que as maiores porcentagens de germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) foram encontradas em temperaturas de 15, 20 e 25 ± 1°C e a germinação foi parcialmente inibida a 30 ± 1°C. Dessa forma, a maioria dos dados mostrados até agora, corroboram com os resultados obtidos para *P. lepidopteris* neste trabalho onde as maiores porcentagens de germinação ocorreram entre 20 e 25°C.

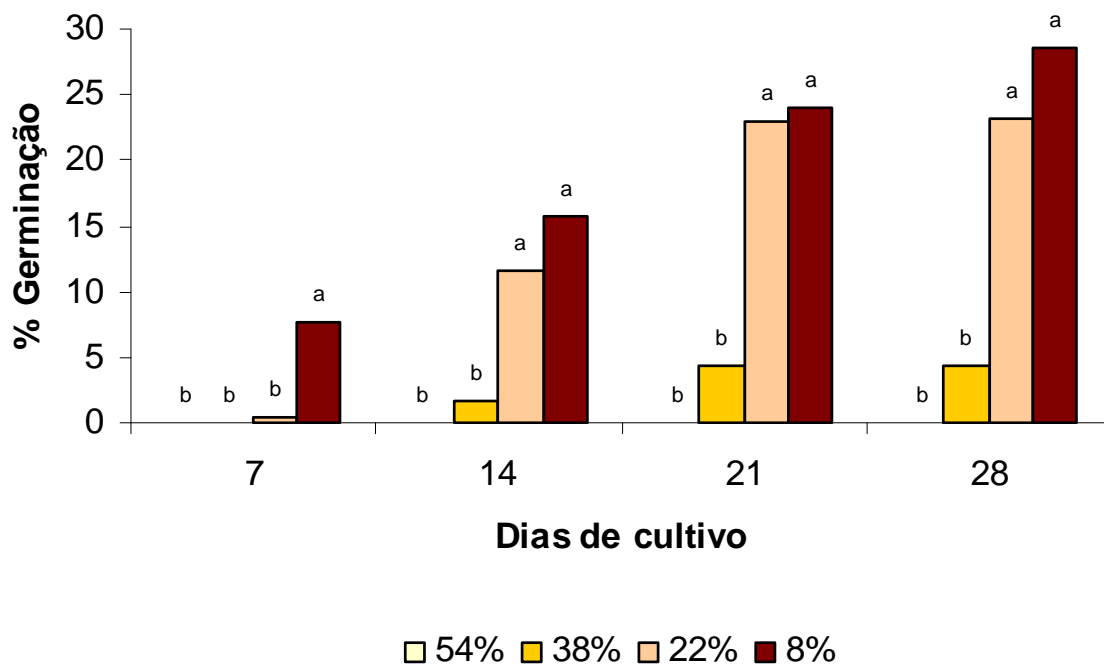
Segundo Towill (1978), a germinação de *Onoclea sensibilis* L. (Dryopteridaceae) é controlada pela luz e temperatura. Ele sugere que temperaturas amenas são necessárias para induzir a germinação por alterar a permeabilidade das membranas celulares. Altas temperaturas inibem as respostas mediadas pelo fitocromo segundo Raghavan (1989). Haupt (1990, 1991, 1992) observou que a germinação de esporos de *Dryopteris filix-mas* L. e *Dryopteris paleacea*

(Sw) *C. Chr.* (Dryopteridaceae) mediada pelo fitocromo, é inibida pelo aumento da temperatura de 22 para 27 ou 32°C. Segundo o mesmo autor, as temperaturas elevadas parecem inibir os processos de síntese de proteínas mediados pelo fitocromo, que são necessários à germinação.

#### **4.4 Efeito de diferentes níveis de luz na germinação dos esporos**

A Figura 12 e a Tabela 03 mostram os resultados obtidos para o efeito de diferentes níveis de luz na germinação dos esporos de *Polypodium lepidopteris*. Como a germinação dessa espécie é baixa, comparada à germinação de espécies como *Rumohra adiantiformis* (Brum & Randi, 2002), os dados geralmente não apresentam homogeneidade entre variâncias ou normalidade. Por esse motivo foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. No entanto, esse teste não se mostrou adequado à análise desses dados. Portanto, para melhor análise dos resultados, foi utilizado o teste F (Tabela Anova), seguido do teste de Tukey. Após 7 dias de cultivo, a maior porcentagem de germinação foi observada sob 8% de luz, cujos valores foram estatisticamente superiores aos encontrados para 54, 38 e 22% de luz.. Dos 14 aos 28 dias de cultivo, as maiores porcentagens germinação forma observadas a 8 e 22% de luz, que foram estatisticamente superiores ás encontradas para 54 e 38 % de luz. Sob 54% de luz, houve inibição total da germinação.

Outro fato observado nesse trabalho foi a degradação de substâncias de reserva dos esporos de *P. lepidopteris* submetidos ao tratamento de maior nível de luz (Figuras 13 e 14).



**FIGURA 12** - Germinação dos esporos de *Polypodium lepidopteris* sob diferentes níveis de luz. Letras diferentes diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey.

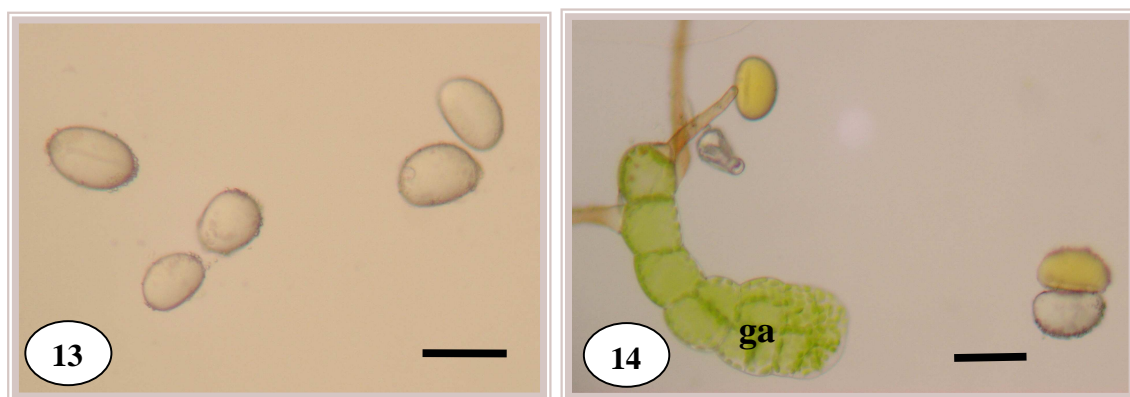
**TABELA 03** - Efeito de diferentes níveis de luz solar na germinação dos esporos de *Polypodium lepidopteris*. *Dmax* é a estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov para normalidade dos dados;  $\chi^2$  é a estatística do teste de Bartlett's para homogeneidade de variâncias; *H* é o teste de Kruskal-Wallis e *F* é a estatística da análise de variância (ANOVA).

Níveis de luz (%)	DIAS DE GERMINAÇÃO			
	7	14	21	28
	GERMINAÇÃO (%) MÉDIA ± ic			
54	0,0b	0,0b	0,5±0,17b	0,0b
38	0,0b	1,75±0,97b	4,25±1,61b	4,25±1,79b
22	0,5±0,34b	11,5±1,57a	23±1,20a	23,25±0,89a
8	7,75±1,11a	15,75±1,27a	24±1,32a	28±0,19a
<i>Dmax</i>	0,257*	0,238*	0,217*	0,243*
$\chi^2$	4,968	5,766	8,378*	12,837*
<i>H</i>	12,913(s)	12,769 (s)	12,198(s)	13,810 (s)
<i>F</i>	31,312 (s)	28,085 (s)	44,560 (s)	41,3988 (s)

\* Valores não seguem a normalidade ou a homogeneidade de variâncias.

Filippini *et al.* (1999) e Renner & Randi (2004) trabalhando com *Dicksonia sellowiana* observaram as maiores porcentagens de germinação de esporos sob 5 e 20% de luz. Brum & Randi (2002) testaram o efeito de diferentes níveis de luz na germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* e observaram que as maiores porcentagens de germinação ocorreram sob 9 e 17% de luz nos meses de abril e agosto.

Hiendlmayer & Randi (2007) observaram que as maiores porcentagens de germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. e *Blechnum brasiliense* Desv. ocorreram sob 5 e 22% de luz solar entre os meses de abril e junho de 2003. Essas autoras observaram que gametófitos submetidos aos maiores níveis de luz, sofreram posteriormente clorose e necrose. Os resultados encontrados para *Polypodium lepidopteris* estão de acordo com os encontrados para as espécies estudadas por essas autoras, que observaram os maiores percentuais de germinação sob os menores níveis de luz aplicados. No entanto, para *Cheilanthes feei* Moore, a maior porcentagem de germinação foi obtida sob regime de luz contínua a  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mas esta espécie pode germinar sob diversas condições incluindo escuro contínuo (Nondorf *et al.*, 2003).

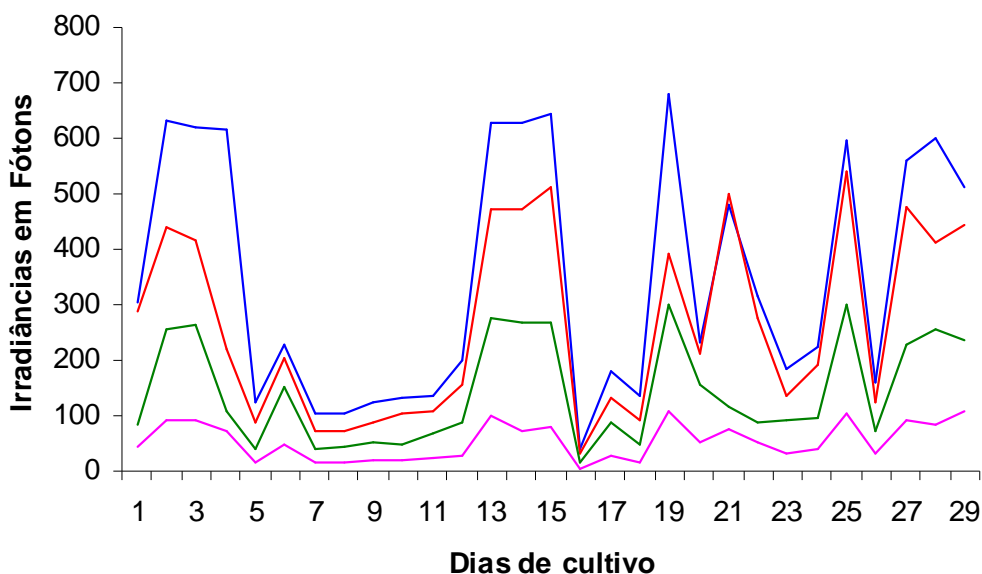


**FIGURAS 13 e 14** - Esporos de *Polypodium lepidopteris* em diferentes níveis de luz solar. **13** - Esporos sob 54% da luz total; **14** - Esporos e gametófitos sob 8% da luz total; **ga** = gametófito. (Barras: 50  $\mu\text{m}$ )

A figura 15 mostra as irradiâncias medidas dentro das armações de madeira revestidas com tela sombrite. Durante os 30 dias do experimento, os dias foram de nublados a ensolarados sendo poucos os dias chuvosos. As irradiâncias variaram de 39,49 a  $678,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na caixa que permitiu a passagem de 54% de luz solar. Na caixa que permitiu a passagem de 38% de luz,



as irradiâncias variaram de 30,39 a 541,6  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A 22% de luz, as irradiâncias variaram de 16,21 a 300,05  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e a 8% de luz variaram de 5,6 a 107,94  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



**FIGURA 15** – Gráfico de irradiâncias no período compreendido entre 21/11 a 19/12/2006. Medições em fótons ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), por quantômetro LICOR 250, munido de sensor PAR (400 a 700 nm) obtidas no mês de novembro e dezembro de 2006 às 12h durante o teste de efeito de diferentes irradiâncias na germinação dos esporos de *Polypodium lepidopteris*, dentro das armações de madeira revestidas com tela “sombrite”. Irradiâncias: 8% —, 22% —, 38% — e 54% —

A Tabela 04 apresenta temperaturas máximas e mínimas medidas às 12h, nos meses de novembro e dezembro de 2006, dentro das caixas de sombrite utilizadas para a obtenção de diferentes níveis de luz. As médias da temperatura mínima foram iguais para todos os tratamentos, ao final das avaliações. A 54% de luz, a média da temperatura máxima foi de 32°C; a 38% de luz a média da temperatura máxima foi de 33°C; a 22% de luz, a média da temperatura máxima foi de 33°C e a 8% de luz, a média da temperatura máxima ficou em 35°C.

Com relação às temperaturas medidas dentro das caixas de sombrite durante a realização destes testes, as armações que recebem menores níveis de luz mantiveram temperaturas mais altas, chegando a atingir 41°C, pois a tela sombrite apresenta menores orifícios e menor ventilação. No entanto, as maiores porcentagens de germinação foram encontradas sob 8 e 22% de luz e as menores sob 54 e 38% de luz, mostrando que as altas temperaturas obtidas a 8 e 22% de luz nos dias mais quentes do período de teste, não inibiram a germinação de *Polypodium lepidopteris*. Apesar de a literatura mostrar que as temperaturas constantes ótimas para a germinação de diversas espécies de pteridófitas estejam compreendidas entre 18 e 25°C (Pérez-García & Ribas 1982, Brum & Randi 2002) e a germinação de *P. lepidopteris* ter sido menor a 30°C constante, alternâncias diárias de temperaturas no campo associadas aos baixos níveis de luz, parecem ser benéficas para a germinação desta espécie.

**TABELA 04.** Temperaturas mínimas e máximas obtidas no mês de novembro e dezembro de 2006 às 12h durante o teste de efeito de diferentes níveis de luz na germinação dos esporos de *Polypodium lepidopteris*, dentro das armações de madeira revestidas com tela “sombrite”.

Dias	Níveis de luz							
	54%		38%		22%		8%	
	T °C Mínima	T °C Máxima	T °C Mínima	T °C Máxima	T °C Mínima	T °C Máxima	T °C Mínima	T °C Máxima
1	20	33	20	34	21	35	20	37
2	18	33	18	35	18	35	18	37
3	19	31	19	35	20	35	19	38
4	22	33	23	34	24	35	23	36
5	22	31	22	32	22	33	22	34
6	21	30	21	32	22	32	21	34
7	19	23	20	23	19	24	20	24
8	21	23	22	23	22	24	22	24
9	19	23	19	24	20	24	20	25
10	17	30	17	31	17	32	17	33
11	17	31	18	32	18	31	18	35
12	21	32	21	33	22	33	22	36
13	22	35	23	36	23	36	23	39
14	20	35	20	38	20	36	22	37
15	22	32	23	32	23	33	23	34
16	20	29	20	28	20	29	21	30
17	19	30	19	31	21	33	19	33
18	21	31	21	32	21	33	20	35
19	20	30	20	31	20	32	21	34
20	21	32	21	35	22	35	21	38
21	21	33	21	34	21	34	22	37
22	20	30	20	31	20	33	21	33
23	19	33	19	35	19	34	18	36
24	22	35	23	36	24	36	22	38
25	22	37	23	38	25	39	22	41
26	23	37	23	39	24	39	24	41
27	24	36	25	38	25	38	25	40
28	24	37	24	37	24	38	24	41
29	23	36	23	36	24	38	25	40
<b>Médias</b>	<b>21</b>	<b>32</b>	<b>21</b>	<b>33</b>	<b>21</b>	<b>33</b>	<b>21</b>	<b>35</b>

#### 4.5 Estudo morfoanatômico dos gametófitos

A Figura 16 mostra um esporo de *Polypodium lepidopteris* com 7 dias de cultivo. Aos 15 dias de cultivo, os gametófitos são filamentosos, apresentam uma célula rizoidal alongada, aclorofilada e uma fileira de quatro a sete células clorofiladas (Figuras 17 e 18); observa-se que gametófitos filamentosos mostram dois rizóides que aparentemente se diferenciam das primeiras células protálicas (Figuras 18 e 19); ocorrem as primeiras divisões laterais do filamento vegetativo (Figuras 19 e 20). Aos 30 dias, a fase laminar espatulada está mais nítida evidenciando-se o meristema apical central (Figura 21). Após 45 dias, os gametófitos adquirem a forma laminar cordiforme (Figura 22). Foram analisados gametófitos com 120 dias de cultivo (Figura 23) nos quais pode ser evidenciada a região meristemática (Figura 24) e tricomas unicelulares que crescem a partir de células marginais da lâmina do protalo (Figura 25). Esses tricomas são muito semelhantes aos observados para *Phlebodium araneossum* e *P. pseudoaureum*, duas espécies de Polypodiaceae (Pérez-García *et al.*, 1998); rizóides são abundantes, basais, de coloração parda e já podem ser evidenciadas estruturas reprodutivas (Figuras 26 e 27). Aos 120 dias, arquegônios estão evidentes na face abaxial do gametófito, na região basal próxima aos rizóides; são multicelulares com quatro colunas de células e no centro observa-se o poro que possibilita a entrada dos anterozóides (Figuras 27 e 28).

Ramírez & Pérez-García (1998) estudando a fase gametofítica de *Microgramma nitida* J. Sm., observaram que depois de 16 a 20 dias de cultivo forma-se um filamento de seis células protálicas com muitos cloroplastos e o rizóide é de cor pardo-escuro e hialino. Aos 20 dias depois da germinação, a célula inicial se divide longitudinalmente e depois as outras células do filamento fazem o mesmo produzindo um protalo de uma a quatro células. Posteriormente

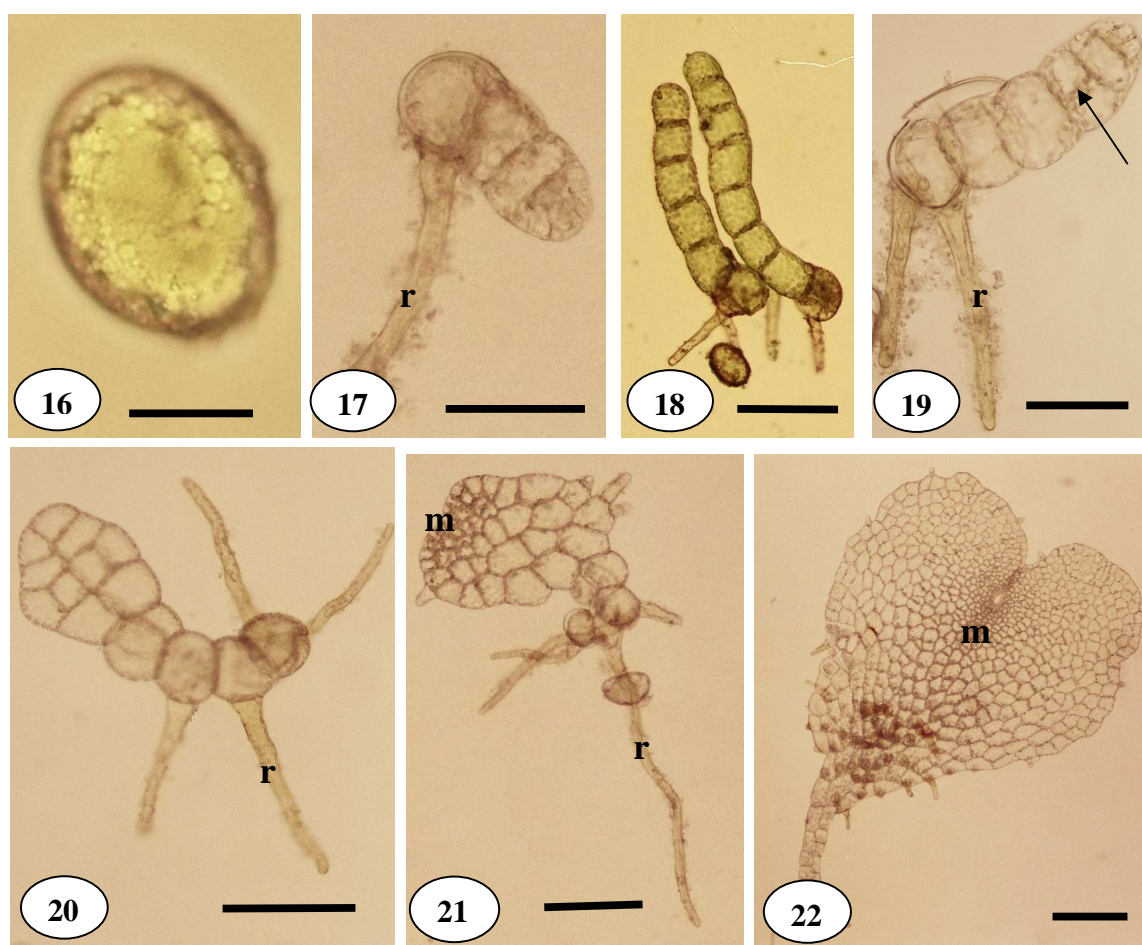
aparece a célula meristemática apical. Como resultado da atividade do meristema pluricelular, forma-se um gametófito espatulado aos 30 dias depois da germinação. Após 60 dias do início da germinação diferenciam-se tricomas marginais e superficiais unicelulares e translúcidos, coincidindo com o surgimento do ápice cordiforme. Os rizóides são abundantes, localizados em uma posição basal, de coloração pardo-clara e transparentes.

De acordo com Nayar & Kaur (1969), o padrão de desenvolvimento gametofítico da maioria dos gêneros de Polypodiaceae é do tipo Drynaria, que se caracteriza pelo estabelecimento de um meristema apical após a formação de tricomas marginais. A germinação dos esporos forma um filamento unisseriado. Uma placa protálica larga e espatulada é formada por sucessivas divisões longitudinais e transversais e a expansão das células filhas. A placa protálica geralmente é formada de 5 a 10 células alongadas, mas é desprovida de meristema organizado. Mais tarde, uma célula obcônica meristemática se diferencia por duas divisões oblíquas em uma das células marginais na extremidade da placa protálica. O protalo jovem torna-se cordiforme, a célula meristemática apical é substituída por um meristema pluricelular e uma região central se desenvolve. O protalo jovem geralmente é glabro: tricomas geralmente são formados quando o protalo torna-se cordiforme.

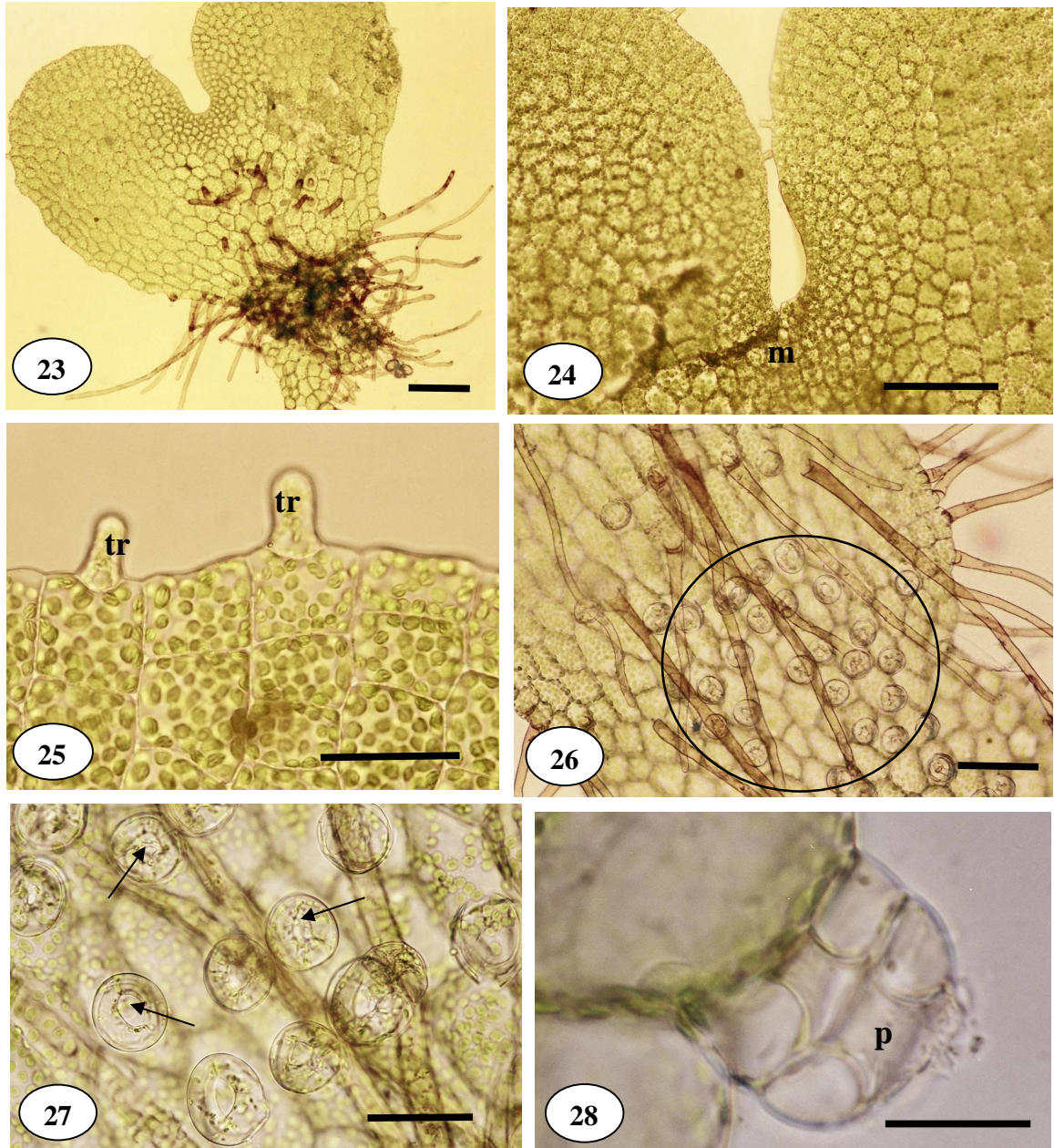
Segundo os mesmos autores, esse padrão de desenvolvimento gametofítico ocorre também para as famílias Cheiropleuriaceae, Dipteridaceae, Lomariopsidaceae, Loxsomaceae, Thelypteridaceae e Gleicheniaceae. Exemplos de espécies que apresentam desenvolvimento gametofítico do tipo Drynaria são: *Thelypteris rhachiflexuosa* Riba (Thelypteridaceae), *Niphidium crassifolium* L. Lellinger (Polypodiaceae), *Thyrsopteris elegans* Kze. (Thyrsopteridaceae), *Microgramma nitida* J. Sm. (Polypodiaceae) e *Pseudocolysis bradeorum*

Rosenst. LDG (Polypodiaceae) (Pérez-García *et al.*, 1994; Jaramillo *et al.*, 1996; Pérez-García *et al.*, 1996-1997; Ramírez & Pérez-García, 1998; Pérez-García *et al.*, 2001).

A escassez de informações acerca do desenvolvimento gametofítico de outras espécies que compõem o gênero *Polypodium*, não permite estabelecer muitas comparações entre elas.



**FIGURAS 16-22.** Padrão de germinação e desenvolvimento gametofítico de *Polypodium lepidopteris*. **16** - Esporo de *P. lepidopteris* (Barra: 25 $\mu$ m); **17 e 18** - 15 dias de cultivo, filamento germinativo (Barras: 50 $\mu$ m e 100 $\mu$ m respectivamente); **19** - 15 dias de cultivo, primeiras divisões laterais do filamento germinativo (seta) (Barra: 50 $\mu$ m); **20 e 21** - 30 dias de cultivo, gametófito na fase laminar espatulada (Barras: 50 $\mu$ m); **22** - 45 dias de cultivo, gametófito na fase laminar cordiforme (Barra: 200 $\mu$ m). (r = rizóide; m = meristema apical pluricelular)



**FIGURAS 23-28.** Gametófitos de *Polypodium lepidopteris* com 120 dias de cultivo. **23** - Gametófito cordiforme (Barra: 200 $\mu$ m); **24** - Região meristemática (**m**) (Barra: 200 $\mu$ m); **25** - Tricomas (**tr**) unicelulares dispostos nas margens (Barra: 50 $\mu$ m); **26** - Estruturas reprodutivas na região basal próximo aos rizóides (círculo) (Barra: 100 $\mu$ m); **27** - Arquegônios (**setas** indicando poro) (Barra: 50 $\mu$ m); **28** - Arquegônio em detalhe – poro arquegonial (**p**) (Barra: 20 $\mu$ m).

## 4.6 Crescimento inicial e morfoanatomia dos esporófitos jovens mantidos em sala de crescimento

### 4.6.1 Análise de crescimento

Os resultados mostram que para *Polypodium lepidopteris* ocorreu diferença estatisticamente significativa para os parâmetros altura da maior fronde e número de frondes no tempo 1 (T1) e no tempo 2 (T2) após 60 dias de cultivo, conforme Tabela 05. A taxa de crescimento relativo (TCRL) baseada na altura da maior fronde foi de 1,56 mm/mm/mês ou 1,87 cm/cm/ano (Tabela 05).

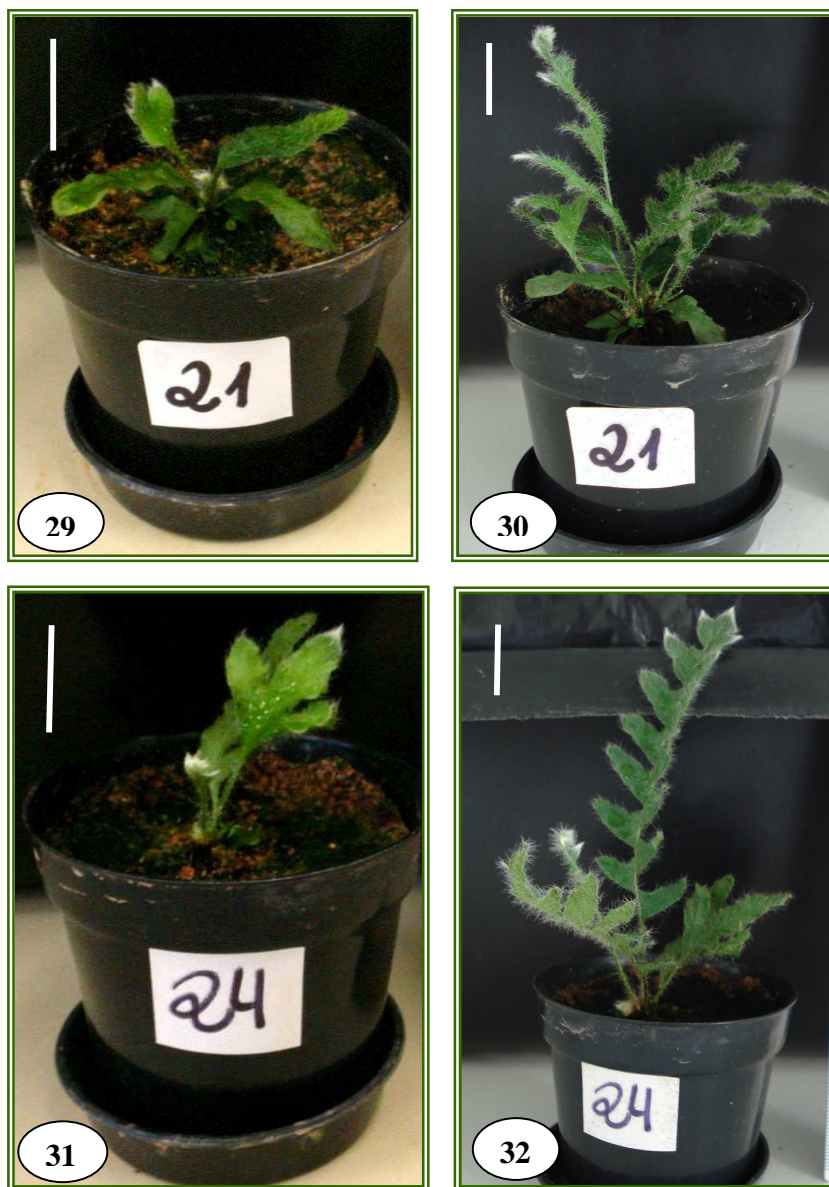
**TABELA 05** – Altura das frondes e número de frondes de *Polypodium lepidopteris*.  $D_{max}$  é a estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov para normalidade dos dados;  $F$  é a estatística do teste de Snedecor para homogeneidade de variâncias e  $H$  é o teste de Kruskal-Wallis. (T1 – esporos semeados no dia 07 de novembro de 2005 = 283 dias, T2 – 283 dias + 60 dias = 343 dias de cultivo)

	Número de frondes		Altura de frondes (cm)		TCRL	
	T1	T2	T1	T2	mm/mm/mês	cm/cm/ano
<b>Média ± ic</b>	5,00 ± 0,13a	7,67 ± 0,22b	4,04 ± 0,09a	8,65 ± 0,34b	1,56 ± 0,09	1,87±0,10
<b>DP</b>	1,05	1,77	0,71	2,73	0,73	0,87
<b>VAR</b>	1,10	3,13	0,50	7,46	0,53	0,77
<b><math>D_{max}</math></b>	0,046	0,047	0,051	0,076		
<b><math>F</math></b>		2,842*		3,935*		
<b><math>H</math></b>		28,93		34,05		

\* Valores não seguem a homogeneidade de variâncias



As Figuras 29 e 30 mostram a nítida diferença para o parâmetro número de frondes na repetição 21, a qual apresentou uma das maiores diferenças, 5 frondes no T1 e 10 frondes ao final dos 60 dias de avaliação (T2); o parâmetro altura da maior fronde está representado pela repetição 24 (Figuras 31 e 32), apresentado 4cm no T1 e 11cm no T2.



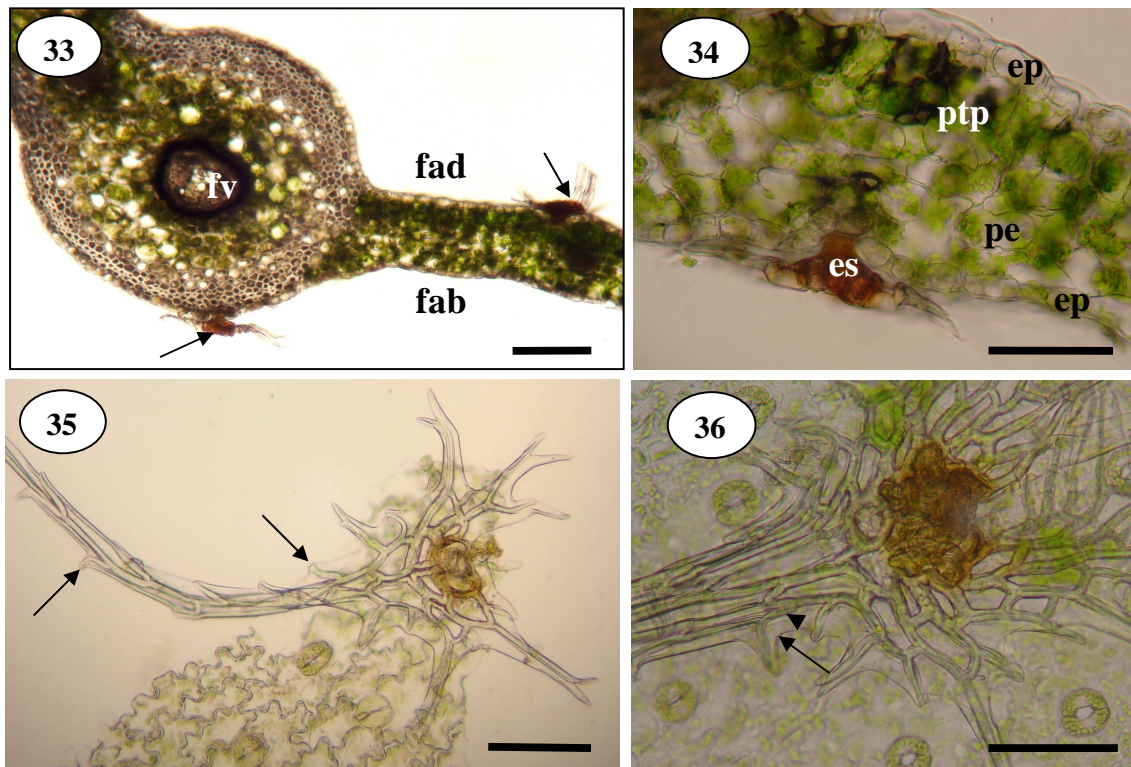
**FIGURAS 29 -32.** Esporófitos de *Polypodium lepidopteris*. 29 e 30 - parâmetro avaliado: número de frondes no T1 e T2 respectivamente. 31 e 32 - parâmetro avaliado: altura da maior fronde no T1 e T2 respectivamente. (Barras = 2 cm).

Hiendlmayer (2004) realizou estudo semelhante com quatro espécies de pteridófitas: *Blechnum brasiliense* Desv. (Blechnaceae), *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin, *Cyathea delgadii* Sternb. (Cyatheaceae) e *Saccoloma inaequale* (kze.) Mett. (Dennstaedtiaceae). A autora observou que para as quatro espécies ocorreu diferença estatisticamente significativa entre altura da maior fronde no tempo 1 e após 60 dias de cultivo, como também observado para *P. lepidopteris*. Com relação ao número de frondes somente *C. corcovadensis* não apresentou diferença estatística significativa ao final do experimento. A mesma autora relata ainda que a TCR variou de 2,04 cm/cm/ano para *C. corcovadensis* a 2,99 cm/cm/ano para *S. inaequale*; assim, a TCR encontrada para *Polypodium lepidopteris* não difere muito dos valores observados para essas outras espécies. Não há dados na literatura a respeito das taxas de crescimento para espécies do gênero *Polypodium*.

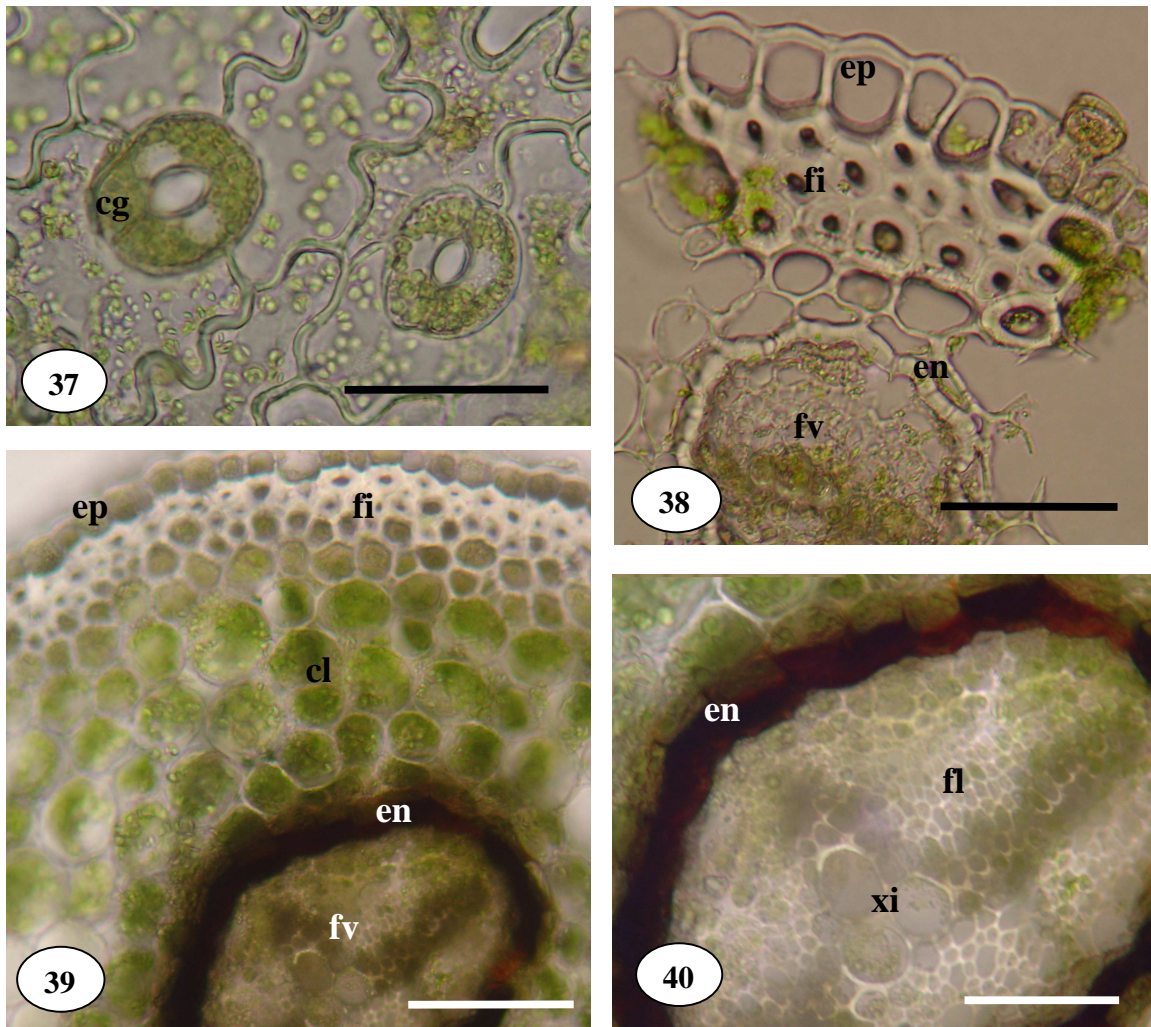
#### **4.6.2 Morfoanatomia dos esporófitos**

Em secção transversal do folíolo observa-se nervura mediana, expansão da lâmina e escamas em ambas as faces da epiderme (Figura 33); a epiderme é uniestratificada, o mesofilo é constituído por parênquima tendendo ao paliçádico e parênquima esponjoso e as escamas são pluricelulares ramificadas (Figura 34). A vista frontal da superfície epidérmica evidencia escama com ramificações (Figura 35). Na imagem detalhada da base da escama (Figura 36) nota-se que a parede terminal não é espessada, o que possibilita a multiplicação celular e alongamento de ramificações. Porém como as paredes laterais já estão espessadas, formam-se ramificações laterais pontiagudas.

Em vista frontal da epiderme na face abaxial destacam-se estômatos do tipo anomocítico e células epidérmicas com paredes anticlinais sinuosas (Figura 37); a epiderme da face adaxial apresenta células com paredes anticlinais sinuosas, porém, não apresenta estômatos. No folíolo, em uma nervura de menor calibre, podemos observar feixe vascular delimitado por endoderme com paredes espessadas em “U”, epiderme uniestratificada e fibras subepidérmicas (Figura 38). A Figura 39 apresenta uma secção transversal da ráquis mostrando epiderme uniestratificada, fibras subepidérmicas, clorênquima e feixe vascular anficrival, delimitado por endoderme. Em imagem detalhada do feixe vascular da ráquis, podemos observar o sistema vascular, delimitado por endoderme, mostrando xilema no centro, constituído por traqueídes e floema contornando, constituídos por células crivadas (Figura 40).



**FIGURAS 33-36.** Morfoanatomia dos esporófitos de *Polypodium lepidopteris*. **33** – Secção transversal de folíolo mostrando nervura mediana e expansão da lâmina: escamas em ambas as faces (**setas**); **fad** = face adaxial; **fab** = face abaxial; **fv** = feixe vascular (Barra: 200µm). **34** – Detalhe da lâmina em secção transversal: epiderme (**ep**) uniestratificada; escama (**es**) pluricelular ramificada; mesofilo constituído por parênquima tendendo ao paliçádico (**ptp**) e parênquima esponjoso (**pe**) (Barra: 100µm). **35** – Vista frontal da superfície epidérmica evidenciando escama, note aspecto pontiagudo das ramificações da escama (**seta**) (Barra: 100µm). **36** – Detalhe da base da escama: parede terminal não espessada (**seta**) e paredes laterais espessadas (**cabeça de seta**) (Barra: 100µm).



**FIGURAS 37-40.** Morfoanatomia dos esporófitos de *Polypodium lepidopteris*. **37** – Secção paradérmica da epiderme na face abaxial destacando estômatos e paredes anticlinais sinuosas (**cg** = célula-guarda) (Barra: 50µm). **38** – Secção transversal mostrando nervura mediana do folíolo de menor calibre: feixe vascular (**fv**) delimitado por endoderme (**en**) com paredes espessadas em “U”; epiderme (**ep**) uniestratificada e fibras (**fi**) subepidérmicas (Barra 100µm). **39** - Secção transversal da ráquis mostrando feixe vascular (**fv**) anficrival; epiderme (**ep**) uniestratificada; córtex mostrando fibras (**fi**) subepidérmicas, clorênquima (**cl**) e endoderme (**en**) (Barra 100µm). **40** – Detalhe do feixe vascular da ráquis: xilema (**xi**) no centro e floema (**fl**) contornando; endoderme (**en**) delimitando (Barra 50µm).

Ogura (1972) relata que em pteridófitas ocorrem escamas e pêlos. Os pêlos são geralmente filiformes, consistem de uma ou mais células e podem se ramificar; enquanto que as escamas são geralmente planas ou achatadas e grandes, constituídas por numerosas células. Sendo característicos em espécies, gêneros ou famílias podem ser usados na identificação taxonômica. Segundo o mesmo autor a família Polypodiaceae apresenta ambos os tipos: escamas e pêlos.

Segundo Sota (1965), descreve as escamas de *Polypodium lepidopteris* como gonfoides, com base estrelada, abruptamente terminada em uma grande porção apical, filiforme, com margem lisa ou levemente denteada formada por longas células cujas membranas são delgadas e hialinas; a parte basal possui margem fortemente denteada, com células mais ou menos isodiamétricas, cuja membranas são espessas. Esse autor não apresenta ilustração de escamas de *P. lepidopteris*. Porém essas descrições corroboram com os dados encontrados neste trabalho.

Ranal (1993) estudou o desenvolvimento heteroblástico de *Polypodium hirsutissimum* (Raddi) e constatou que esporófitos jovens apresentam escamas em ambas as faces, que se caracterizam como deltóides basipeltadas e com margem ligeiramente denteada. Nóbrega (2007) também observou que *P. hirsutissimum* (Raddi) possui escamas em ambas as faces da lâmina foliar, conforme o observado, no presente estudo, em *P. lepidopteris*. Segundo o mesmo trabalho, a espécie *Pleopeltis polypodioides* (L.) Watt. (Polypodiaceae) pode ser distinguida pela presença de indumento escamoso somente na face abaxial da lâmina. Strehl & Miranda (1997) também descrevem os tricomas de *P. hirsutissimum* como sendo escamiformes, do tipo peltado, não glandular com base alargada e ápice unisseriado.

Schwartsburd (2006) relata que *P. hirsutissimum* diferencia-se de *P. lepidopteris*, a espécie mais semelhante, por apresentar hábito predominantemente epifítico, com as frondes

arqueadas, caule geralmente grosso, com as frondes próximas entre si, surgindo na porção apical do caule e pelas escamas da face abaxial da lâmina geralmente com o ápice avermelhado. Em oposição, *Polypodium lepidopteris* apresenta o hábito terrícola ou rupícola, com frondes eretas, caule delgado e longo-reptante, com as frondes espaçadamente distribuídas ao longo do caule; além das escamas da face abaxial da lâmina geralmente com o ápice esbranquiçado.

Graçano *et al.* (2001) estudando a anatomia foliar de espécies de Pteridaceae, observaram que todas apresentavam epiderme uniestratificada. Sant'Anna *et al.* (2001) realizaram um estudo morfoanatômico em *Trichipteris atrovirens* (Langsd. e Fisch.) Tryon. (Cyatheaceae) e também observaram epiderme uniestratificada. Strehl & Miranda (1997) analisando alguns aspectos da anatomia de *P. hirsutissimum*, também descrevem epiderme uniestratificada em secção transversal da folha e em vista frontal, estômatos anomocíticos, estando presentes somente na face abaxial. Em secção transversal do folíolo, as mesmas autoras, evidenciam o parênquima paliçádico, uni ou biestratificado, o qual ocorre somente na face adaxial. As células desse parênquima encontram-se logo abaixo da epiderme contendo grande número de cloroplastos; logo abaixo, encontra-se o parênquima esponjoso que é pluriestratificado. Em *P. lepidopteris* observa-se padrão semelhante do mesófilo, conforme observado no presente estudo.

Em *P. lepidopteris*, as células epidérmicas da face abaxial apresentam-se clorofiladas. Ogura (1972), relata que as espécies representantes da Classe Filicopsida, normalmente contém uma pequena quantidade de cloroplastos nas células epidérmicas. Tryon & Tryon (1982), também relatam esse fato como sendo característica que ocorre em muitas pteridófitas. Graçano *et al.* (2001) observaram para a maioria das espécies do Gênero *Adiantum* (Pteridaceae) células da epiderme adaxial, em geral, clorofiladas. Strehl & Miranda (1997), relatam a existência de cloroplastos bem desenvolvidos nas células epidérmicas de *P. hirsutissimum*.

Segundo Taiz & Zeiger (2004), as células meristemáticas contém proplastídeos, os quais não possuem clorofila, pouca ou nenhuma membrana interna e um conjunto incompleto de enzimas necessárias para realizar a fotossíntese sendo que o desenvolvimento do cloroplasto a partir do proplastídeo é desencadeado pela luz. Porém, as clorofilas tendem a ser foto-oxidadas sob alta irradiação (Streit *et al.*,2005). A foto-oxidação é um processo irreversível e envolve diretamente os pigmentos receptores de luz, os quais, ao absorverem muita luz, ficam muito tempo excitados e interagem com o O<sub>2</sub>, produzindo radicais livres, podendo destruir os pigmentos (Taiz & Zeiger, 2004).

Os resultados observados no presente estudo podem estar relacionados à quantidade de luz recebida pelas plantas nas condições de laboratório. Possivelmente, a maior incidência de luz sobre a face adaxial, pode ter causado uma oxidação das clorofilas ou inativado os proplastídeos das células da face adaxial. No trabalho de Graçano *et al.* (2001) a coleta do material botânico foi realizada ao longo das estradas e trilhas demarcadas no Parque Estadual do Rio Doce (PERD), não sendo especificado o fator luminosidade. A ocorrência de cloroplastos nas células epidérmicas na face adaxial pode estar relacionada aos níveis de luz. No presente estudo, o material botânico foi mantido em condições de laboratório, com intensidade luminosa de 22  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (obtida pelo uso de lâmpadas fluorescentes brancas) em regime de 16h de luz, a uma temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Essas diferenças apresentadas pelos dois estudos, condições naturais e condições de laboratório, respectivamente, podem ter ocasionado a diferença nos resultados obtidos.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos relacionados à morfologia dos esporos são necessários pelo fato de ser este um aspecto taxonômico importante para identificação das espécies. A partir dos resultados obtidos em MEV, pode-se evidenciar que não houve contaminação do material com esporos de outras espécies.

Com relação ao fator pH, os resultados indicam que a princípio, o pH da solução nutritiva dentro da faixa analisada neste trabalho, não teve influência nas porcentagens finais de germinação, tendo em vista que não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, porém ocorreu um retardo na germinação, no pH 4,0. Dessa forma, essa espécie apresenta uma grande plasticidade com relação ao fator estudado.

A temperatura de 30°C afetou significativamente a germinação dos esporos de *Polypodium lepidopteris*, chegando ao final dos 28 dias de cultivo com apenas 2,25% dos esporos germinados.

Os diferentes níveis de luz, aos quais foram submetidos os esporos, também afetaram significativamente a germinação. Os maiores níveis de luz solar (54 e 38%) foram os menos favoráveis à germinação de esporos de *P. lepidopteris*.

Quanto à análise de crescimento dos esporófitos em condições de laboratório, ocorreu um aumento significativo nos parâmetros avaliados, altura da maior fronde e número de frondes, no final dos 60 dias de cultivo. Uma sugestão para futuros trabalhos realizados com essa espécie é analisar a taxa de crescimento em condições semelhantes às encontradas no ambiente natural.

O desenvolvimento morfoanatômico dos gametófitos e esporófitos de *Polypodium lepidopteris* assemelha-se ao de outros gêneros de Polypodiaceae, porém há poucas informações sobre o desenvolvimento gametofítico de outras espécies do gênero *Polypodium*.

Certamente há muito ainda para ser revelado não só da espécie estudada neste trabalho, mas da pteridoflora brasileira como um todo. Dessa forma, este trabalho contribui para ampliar o conhecimento morfoanatômico e ecofisiológico de *P. lepidopteris*, uma representante deste importante grupo de organismos da flora brasileira ainda pouco estudado.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allisson, H.E. 1911. Notes on the vascular connections of the sporocarp in *Marsilea polycarpa* Hook & Grev. **New Phytologist** **10**: 204-206.
- Ambrósio, S.T. & Barros, I.C.L. 1997. Pteridófitas de uma área remanescente de Floresta Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** **11**: 105-113.
- Barros, I.C.L.; Silva, A.J.R. & Silva, L.L.S. 1989. Levantamento florístico das pteridófitas ocorrentes na Zona das Caatingas do Estado de Pernambuco, Brasil. **Biologica Brasilica** **1**: 143-159.
- Bhattacharyya, A.K. & Sen, T. 1992. Structure and ontogenia of gametophytes of *Lepisorus* (J.Sm.) Ching and *Pleopeltis* Willdenow. **Indian Fern Journal** **9**: 66-75.
- Bergeron, M.E. & Lapointe, L. 2000. Impact of one year crozier removal on long-term frond production in *Matteuccia struthiopteris*. **Canadian Journal of Plant Science** **81**: 155-163.
- Bernabe, N.; Williams-Linera, G. & Palacios-Rios, M. 1999. Tree ferns in the interior and at the edge of a Mexican cloud forest remnant: Spore germination and sporophyte survival and establishment. **Biotropica** **31**:83-88.
- Bozzola, J.J. & Russel, L.D. 1991. **Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists**. Boston. Jones and Barlett.
- Bresolin, A. 1979. **Flora da restinga da Ilha de Santa Catarina. Insula** **10**: 1-54.
- Brum, F.R. & Randi, A. M. 2002. High irradiance and temperature inhibit the germination of spores of the fern *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae). **Revista Brasileira de Botânica** **25**: 391-396.
- Carafa, A.M. 1990. Gametophyte development of *Woodwardia radicans* (L.) SM.: effect of population density and antheridiogen on sex expression. **Giornale Botanico Italiano** **124**: 571-580.
- Caruso, M.M.L. 1983. **O desmatamento da Ilha de Santa Catarina de 1500 aos dias atuais**. Florianópolis: Editora da UFSC.

- CECCA. 1997. **Centro de Estudos, Cultura e Cidadania. Unidades de conservação e áreas protegidas da Ilha de Santa Catarina – Caracterização e Legislação.** Florianópolis: Editora Insular.
- Chiou, W. & Farrar, D.R. 1997. Comparative gametophyte morphology of selected species of the family Polypodiaceae. **American Fern Journal** **87**: 77-86.
- CONAMA. 1999. **Conselho Nacional do Meio Ambiente.** Resolução 261, que trata dos estágios sucessionais de vegetação de restinga para o estado de Santa Catarina.
- Courbet, H. 1955. Influence de la concentration ionique du milieu sur la germination des spores et la croissance des prothalles de Filicales en culture aseptique. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences** **241**: 441-443.
- Dyer, A.F. 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. *In*: **The experimental biology of ferns.** London. Academic Press. p. 253-305.
- Esteves, L.M. & Felipe, G.M. 1985. Fotossensibilidade de esporos de pteridófitas dos cerrados. **Revista Brasileira de Botânica** **8**: 219-222.
- Filippini, E.C.P., Duz, S.R. & Randi, A.M. 1999. Light and storage on the germination of spores of *Dicksonia selowiana* (Presl.) Hook., Dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Botânica** **22**: 21-26.
- Gazda, V. Gomes-Carneiro, M. R. Barbi, N. S. & Paumgarten, F.J.R. 2006. Toxicological evaluation of an ethanolic extract from *Chiococca alba* roots. **Journal of Ethnopharmacology** **105**:187-195.
- Graçano, D.; Azevedo, A.A. & Prado, J. 2001. Anatomia foliar das espécies de Pteridaceae do Parque Estadual do Rio Doce (PERD) - MG. **Revista Brasileira de Botânica** **24**: 333-347.
- Guantay, M.E. & Terán, M.H. 1995. Estudio morfoanatómico de las especies del género *Elaphoglossum* Schott de Tucumán. **Lilloa** **38**: 73-84.
- Haupt, W. 1990. Phytochrome-mediated fern-spore germination: inhibition by elevated temperatures. **Photochemical Photobiology** **52**: 57-9.

- Haupt, W. 1991. Phytochrome-controlled fern-spore germination: phase-specific modulation by elevated temperatures. **Photochemical Photobiology** **54**: 811-818.
- Haupt, W. 1992. Phytochrome-mediated fern-spore germination: a temperature-sensitive phase in the transduction chain after action of Pfr. **Journal of Plant Physiology** **140**: 575-81.
- Hevly, R. H. 1963 Adaptations of cheilanthoid ferns to desert environments. **Journal Arizona Academic Science** **2**: 164-175.
- Hiendlmayer, R. 2004. **Estudo da Viabilidade de Esporos e do Crescimento Inicial de Quatro Espécies Nativas de Pteridófitas da Floresta Ombrófila Densa Atlântica**. Dissertação de Mestrado. UFSC. Florianópolis.
- Hiendlmayer, R. & Randi, A.M. 2007. Response of spores and young gametophytes of *Cyathea delgadii* Sternb. (Cyatheaceae) and *Blechnum brasiliense* Desv. (Blechnaceae) to different light levels. **Acta Botanica Brasílica**. (Aceito para publicação no vol. 21).
- Jaramillo, I.R.; Pérez-García, B. & Mendoza, A. 1996. Desarrollo del gametófito y del esporófito joven de *Niphidium crassifolium* (Filicales: Polypodiaceae s. str.). **Revista de Biología Tropical** **44**: 485-490.
- Jaramillo, I.R.; Pérez-García, B. & Mendoza, A. 2000. Fase gametofítica del helecho *Llavea cordifolia* (Pteridaceae). **Revista de Biología Tropical** **48**: 19-23.
- Jaramillo, I.R.; Pérez-García, B. & Mendoza, A. 2003. Morfogénesis de los gametofitos de especies mexicanas de *Pleopeltis* (Polypodiaceae, subfamilia Pleopeltoideae). **Revista de Biología Tropical** **51**: 321-332.
- Johnson, G.N.; Rumsey, F.J.; Headley, A.D. & Sheffield, E. 2000. Adaptations to extreme low light in the fern *Tricomanes speciosum* Willd. (Hymenophyllaceae). **New Phytologist** **148**: 423-431.
- Kitajima, K. 1996. Ecophysiology of tropical tree seedlings. In: Mulkey, S.S; Chazdon, R.L. & Smith, A.F. **Tropical Forest Plant Ecophysiology**. New York, Ed. Chapman & Hall. p. 559-595.

- Labiak, P.H. & Prado, J. 1998. Pteridófitas epífitas da Reserva Volta Velha, Itapoá, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Botânica 11**: 1-79.
- Lee, D.W.; Oberbauer, S.F.; Krishnapilay, B.; Mansor, M.; Mohamed, H. & Yap, S.K. 1997. Effects of irradiance and spectral quality on seedlings development of two Southeast Asian *Hopea* species. **Oecologia 110**: 1-9.
- Lorscheitter, M.L.; Ashraf, A.R.; Windisch, P.G. & Mosbrugger, V. 2005. **Pteridophyte spores of Rio Grande do Sul flora, Brazil, Part V**. Palaeontographica. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart.
- Makgomol, K. & Sheffield E. 2001. Gametophyte morphology and ultrastructure of the extremely deep shade fern, *Trichomanes speciosum*. **New Phytologist. 151**: 243-225.
- Millër, J.H. 1968. Fern gametophytes as experimental material. **Botanical Review 34**: 361-440.
- Mohr, H. 1956. Die Abhängigkeit des protonemawachstums und der protonemapolarität bei farnen von Licht. **Planta 47**: 127-158.
- Nayar, B.K. 1961. Studies in Polypodiaceae. VII. *Pyrrhosia* MIRBEL. **Journal of the Indian Botanical Society 40**: 164-186.
- Nayar, B.K. & Kaur, S. 1969. Types of protalial development in homosporous ferns. **Phytomorphology 19**: 179-188.
- Nóbrega, A.G. 2007. **Pteridófitas da Vegetação nativa do Jardim Botânico Municipal de Bauru, São Paulo, Brasil**. Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo. Brasil.
- Nondorf, L. S.; Dooley A. M.; Palmieri M. & Swatzell J. 2003. The effects of pH, temperature, light intensity, light quality, and moisture levels on spore germination in *Cheilanthes feei* of Southeast Missouri. **American Fern Journal 93**: 56-69.
- Ogura, Y. 1935. Morphologische beobachtungen der gattung *Polypodium*. **Journal of Japanese Botany 11**: 673-687, 742-760.

- Ogura, Y. 1972. **Comparative anatomy of vegetative organs of the pteridophytes**. 2ed. Berlin. Gebrüder Borntraeger.
- Otto, E. T.; Crow, J. H & Kirby, E. G. 1984. Effects of acidic growth conditions on spore germination and reproductive development in *Dryopteris marginalis* (L.). **Annals of Botany** **53**: 439-442.
- Pérez-García, B. & Riba, R. 1982. Germinación de esporas de Cyatheaceae bajo diversas temperaturas. **Biotropica** **14**: 281-287.
- Pérez-García, B.; Riba, R.; Mendoza, A. 1994. Observaciones del gametofito de *Thelypteris rhachiflexuosa* Riba (Thelypteridaceae). **Acta Botánica Mexicana** **28**: 63-69.
- Pérez-García, B.; Mendoza, A.; Riba, R. & Ricci, M. 1996. Morfogénesis de la fase sexual de *Blechnum chilense* y *Blechnum cycadifolium* (Pteridophyta: Blechnaceae). **Revista de Biología Tropical** **44**: 491-497.
- Pérez-García, B.; Mendoza, A.; Riba, R. & Ricci, M. 1996-1997. Morfogénesis del gametofito del helecho *Thyrsopteris elegans* (Filicales: Thyrsopteridaceae). **Revista de Biología Tropical** **44**: 59-65.
- Pérez-García, B.; Riba, R.; Mendoza, A. & Reyes, I.J. 1998. Compared gametophytic development of three species of *Phlebodium* (Polypodiaceae, s.str.). **Revista de Biología Tropical** **46**: 1059-1067.
- Pérez-García, B.; Mendoza, A.; Jaramillo, I.R.; Riba. 1999. Morfogénesis de la fase sexual de seis especies mexicanas del género *Dryopteris* (Dryopteridaceae). **Revista de Biología Tropical** **47**: 69-81.
- Pérez-García, B.; Mendoza, A.; Riba, R. & Gomes-Pignataro, L. 2001. Development of the sexual phase of *Pseudocolysis bradeorum* (Polypodiaceae). **American Fern Journal** **91**: 214-226.
- Prada, C.; Pangua, E.; Pajaron, S.; Herrero, A.; Escudero, A. & Rubio, A. 1995. A comparative study of gametophyte morphology, gametangial ontogeny and sex expression in the *Asplenium adiantum-nigrum complex* (Aspleniaceae, Pteridophyta). **Annales Botanici Fennici** **32**: 107-115.

- Prado, J. 1998. Pteridófitas do Estado de São Paulo. **In: C.E.M. Bicudo & G. Shepherd (Eds.). Fungos macroscópicos e plantas do Estado de São Paulo (Série Biodiversidade do Estado de São Paulo)**. São Paulo: FAPESP, v.2, p. 49-61.
- Ramírez, R. & Pérez-García, B. 1998. Fase gametofítica del helecho *Microgramma nitida* (Polypodiaceae). **Revista de Biología Tropical 46**: 587-593.
- Raghavan, V. 1980. Cytology, physiology, and biochemistry of germination of fern spores. **International Review of Cytology 62**: 69-118.
- Raghavan, V. 1989. **Developmental biology of fern gametophytes**. Cambridge University Press.
- Raintree Nutrition. Disponível em: <http://www.rain-tree.com/samambia.htm>. Acesso em: 05 jun. de 2005.
- Ranal, M.A. 1993. Desenvolvimento de *Polypodium hirsutissimum* Raddi (Pteridophyta, Polypodiaceae) em condições naturais. **Acta Botanica Brasílica 7**: 3-15.
- Ranal, M.A. 1999. Effects of temperature on spore germination in some fern species from semideciduous mesophytic forest. **American Fern Journal 89**: 149-158.
- Randi, A.M. & Felipe, G.M. 1988. Effect of red light and far-red on the germination of spores of *Cyathea delgadii* Sternb. **Revista Brasileira de Botânica 11**: 41-45.
- Randi, A.M., Crozier, A. 1991. Gibberellins, indole-3-acetic acid and the germination of spores of the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. **Revista Brasileira de Botânica 14**: 67-72.
- Randi, A.M. 1987. **Aspectos fotomorfogênicos, bioquímicos e citoquímicos durante a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb.** Tese de doutorado. UNICAMP. Campinas. Brasil.
- Raven, P.H; Evert, R.F & Eichhorn, S. 2001. **Biologia Vegetal**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Ed: Guanabara Koogan S.A.



- Renner, G.D.R & Randi, A.M. 2004. Effects of sucrose and irradiance on germination and early gametophyte growth of the endangered tree fern *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook (Dicksoniaceae). **Acta Botanica Brasílica** **18**: 375-380.
- Reyes, J. I. & Pérez-García, B. 1994. Morfología y estrategias reproductivas del gametofito de *Polypodium lepidotrichum* (Fée) Maxon (Polypodiaceae). **Acta Botánica Mexicana** **28**: 71-78.
- Roux, J.P. 1993. Systematic studies in the genus *Mohria* (Anemiaceae: Pteridophyta). IV. Comparative gametophyte morphology in *Mohria* end *Anemia*. **Bothalia** **23**: 191-196.
- Santana, D.G. & Ranal, M. A. 2004. **Análise da germinação**. Um enfoque estatístico. Editora Unb.
- Sant'Anna, J.R de; Miguel O.G; Alquini Y. 2001. Estudo morfo-anatômico de *Trichipteris atrovirens* (Langsd. et Fisch) Tryon. (Cyatheaceae). **Revista Visão Acadêmica** **2**: 59-64. Curitiba.
- Santiago, A.C.P & Barros I.C.L. 2003. Pteridoflora do Refúgio Ecológico Charles Darwin (Igarassu, Pernambuco, Brasil). **Acta Botanica Brasílica** **17**: 597-604.
- Santos, A.J.dos. 1973. **Índios e brancos no sul do Brasil. A dramática experiência dos Xokleng**. Florianópolis, Edeme, p. 61-62.
- Santos, A.J. dos; Chotguis, J. & Mielke, E. 2001. **Análise da cadeia produtiva do xaxim (*Dicksonia sellowiana*) do estado do Paraná**. In: I Simpósio Ibero-Americano de Gestão e Economia Florestal. Porto-Seguro/BA.
- Sato, T. & Sakai, A. 1981. Cold tolerance of gametophytes and sporophytes of some cool temperature ferns native to Hokkaido. **Canadian Journal of Botany** **59**: 604-608.
- Schwartsburd, P.B. 2006. **Pteridófitas do Parque Estadual de Vila Velha, Paraná, Brasil**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. Brasil.
- Senna, R.M; Kazmirczak, C. 1997. Pteridófitas de um remanescente florestal no Morro da Extrema, Porto Alegre, RS. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia (Uruguaiana)** **4**: 47-57.

- Simabukuro, E.A.; Esteves, L.M. & Felipe, G.M. 1993. Fotoblastismo de pteridófitas da mata ciliar. **Insula** 22: 177-186.
- Simabukuro, E.A. 2002. Onde os Gametófitos das Pteridófitas Crescem? In: Araújo, E.L.; Moura, A.N.; Sampaio, E.V.S.B.; Gestinari, L.M.S. & Carneiro, J.M.T. (eds). **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. 1969. **Biometry**. San Francisco. Freeman and Company.
- Sota, E.R. de la. 1965. Las espécies escamosas del género *Polypodium* L. (S. Str.) em Brasil. Revista de Museo de La Plata (Nueva Serie), **Botánica** 42: 243-271.
- Streit, N.M.; Canterle, L.P.; Canto, M.W.; Hecktheuer L.H.H. 2005. As clorofilas. **Ciência Rural** 35: 748-755.
- Strehl, T & Miranda, A.L.B. 1997. Alguns aspectos da anatomia de *Polypodium hirsutissimum* Raddi (Pteridophyta – Polypodiaceae). **Iheringia, Série Botânica** 49: 21-32.
- Suzuki, C.C.L.F. 2003. **Desenvolvimento gametofítico e estudo de diferentes níveis de luz no crescimento de plântulas de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Pteridófito-Dicksoniaceae)**. Dissertação de mestrado. UFSC. Florianópolis. Brasil.
- Taiz L, Zeiger E. 2004. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed.
- Towill, L.R. 1978. Temperature and photocontrol of *Onoclea* spore germination. **Plant Physiology** 62: 116-119.
- Tryon, R.M. 1970. Development and evolution of ferns floras of Oceanic Islands. **Biotropica** 2: 76-84.
- Tryon, R.M. 1972. Endemic areas and geographical speciation in tropical american ferns. **Biotropica** 4: 121-131.

- Tryon, R.M. & Tryon, A.F. 1982. **Ferns and allied plants with special reference to Tropical America**. New York: Springer-Verlag.
- Windisch, P.G. 1992. **Pteridófitas da região norte-ocidental do Estado de São Paulo (Guia para estudo e excursões)**. 2a ed. UNESP, São José do Rio Preto.
- Windisch, P.G. 2002. Pteridófitas do Brasil: Diversidade Decrescente. *In*: Araújo, E.L.; Moura, A.N.; Sampaio, E.V.S.B.; Gustinari, L.M.S. e Carneiro, L.M.T (eds). **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Whittier, D. P. 1981. Spore germination and young gametophyte development of *Botrychium* and *Ophioglossum* in axenic culture. **American Fern Journal** **71**: 13-19.
- Whittier, D. P. & Moyroud, R. 1993. The promotion of spore germination and gametophyte development in *Ophioglossum palmatum* by low pH. **American Fern Journal** **83**: 41-46.
- Zar, J. H. 1996. **Biostatistical Analysis**, 3 ed., Upper SaddJe River, Prentice Hall.