

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

**Estudo da Viabilidade de Esporos e do Crescimento Inicial de Quatro Espécies
Nativas de Pteridófitas da Floresta Ombrófila Densa Atlântica.**

Mestranda: Rosane Hiendlmayer

Orientadora: Áurea Maria Randi

Co-orientadora: Marisa Santos

Fevereiro de 2004

**Estudo da Viabilidade de Esporos e do Crescimento Inicial de Quatro Espécies
Nativas de Pteridófitas da Floresta Ombrófila Densa Atlântica**

ROSANE HIENDELMAYER

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal, do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Fevereiro 2004

Vocês poderiam questionar em seus corações:

“Como distinguir no prazer o que é bom daquilo que não é?”

Andem entre campos e os jardins,
e compreenderão que há prazer na abelha
ao recolher mel das flores,
mas há também prazer na flor
em dar mel 'a abelha.

Para a abelha, na verdade, a flor é fonte de vida,
e, para flor, a abelha é mensageira do amor.

Para ambas, dar e receber é prazer, necessidade e êxtase.

Sejam, no seu prazer, como as flores e as abelhas.

Agradecimentos

Agradeço a DEUS, por mais está vitória em minha vida;

A minha Mãe, por estar sempre perto nos momentos mais difíceis e por ter compreendido as minhas razões e aceitado os meus sonhos e objetivos;

A minha Orientadora, em ter aceitado me orientar, pela compreensão nos momentos mais difíceis e pela grande amiga que se tornou;

A minha Co-orientadora, pela orientação e também pela amizade, e compreensão nos momentos mais difíceis;

A professora Maria Terezinha Paulilo, pelas sugestões.

A professoras Ana Viana, pelas sugestões e acesso às dependências que são de responsabilidade no Laboratório de Fisiologia Vegetal.

A CAPES pela disponibilidade da Bolsa de Pós-graduação, de fevereiro de 2003 à fevereiro de 2004, que não poderia ter sido oferecida em momento melhor;

Ao Curso de Pós-graduação em Biologia Vegetal, pela disponibilidade de recursos;

Ao Departamento de Botânica, pela disponibilidade dos Laboratórios;

As minhas amigas Eliane e Patrícia, pela ajuda e amizade;

As minhas amigas Dalzemira, Dominique, Eliete e Isabela, pelo carinho, alegria e amizade.

A Professora Lúcia Sevegnani pela amizade e obtenção de cópias dos mapas e foto do Parque Natural Municipal São Francisco de Assis, Blumenau, SC.

Ao colega Almir Giovani Figueiredo pela disponibilidade de tempo para a realização de fotos dos esporófitos adultos no Parque Natural Municipal São Francisco de Assis, Blumenau, SC.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	VI
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE PTERIDÓFITAS E CICLO DE VIDA	1
1.2 – A IMPORTÂNCIA DA LUZ NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PTERIDÓFITAS.....	1
1.3 – ALGUNS ESTUDOS SOBRE O EFEITO DA LUZ NA GERMINAÇÃO DE PTERIDÓFITAS, REALIZADOS NO BRASIL..	3
1.4 – ALGUNS ESTUDOS SOBRE A MORFO-ANATOMIA DE GAMETÓFITOS	5
1.5 – ESPÉCIES ESTUDADAS NESTE TRABALHO.....	6
2 – OBJETIVOS	11
2.1 – OBJETIVO GERAL	11
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 – DESCRIÇÃO DO LOCAL DE COLETA	12
3.2 – ESPÉCIES ESTUDADAS.....	15
3.3 – COLETA DE MATERIAL E ACONDICIONAMENTO DE ESPOROS.....	15
3.4 – ANÁLISE MICROSCÓPICA DE ESPOROS.....	15
3.5 – ESTERILIZAÇÃO DE ESPOROS	15
3.6 – CURVAS DE GERMINAÇÃO	16
3.7 – DETERMINAÇÃO DO TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO.....	16
3.8 – EFEITO DE DIFERENTES IRRADIÂNCIAS NA GERMINAÇÃO DE <i>CYATHEA DELGADII</i> E <i>BLECHNUM BRASILIENSE</i>	17
3.9 – ESTUDO MORFO-ANATÔMICO DOS GAMETÓFITOS	17
3.11 – ANÁLISE DE CRESCIMENTO DE ESPORÓFITOS	18
3.12 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 – ASPECTOS DA MORFOLÓGIA DE ESPOROS	20
4.2 – GERMINAÇÃO E VIABILIDADE DE ESPOROS	24
4.3 – EFEITO DE DIFERENTES IRRADIÂNCIAS NA GERMINAÇÃO DE <i>CYATHEA DELGADII</i> STERNB. E <i>BLECHNUM</i> <i>BRASILIENSIS</i> DESV.....	28
4.4 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS GAMETÓFITOS	42
4.5 – CURVAS DE FECUNDAÇÃO DE GAMETÓFITOS	50
4.6 – ANÁLISE DE CRESCIMENTO.....	58
5 – CONCLUSÕES.....	62
6 – ANEXOS	64
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- Tabela 1 Tempo médio de germinação, CV, porcentagem final de germinação, temperaturas médias e densidade de fluxo de fótons obtidos para *Cyathea delgadii* Sternb.....pág. 32
- Tabela 2 Temperaturas mínimas e máximas diárias de cada caixa sombrite utilizada para a obtenção de diferentes irradiâncias. Medidas realizadas diariamente durante o experimento de curva de germinação de *Cyathea delgadii* Sternb.....pág. 33
- Tabela 3 Tempo médio de germinação, CV, porcentagem final de germinação, temperaturas médias e densidade de fluxo de fótons obtidos para *Blechnum brasiliense* Desv.....pág. 38
- Tabela 4 Temperaturas mínimas e máximas diárias de cada caixa sombrite utilizada para a obtenção de diferentes irradiâncias. Medidas realizadas diariamente durante o experimento de curva de germinação de *Blechnum brasiliense*.Desv.....pág.39
- Tabela 5 Médias, desvios padrão e t (teste de Student) referente à altura de frondes e número de frondes, das espécies *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin. e *Cyathea delgadii* Sternb.....pág.59
- Tabela 6 Médias, desvios padrão e t (teste de Student) referente à altura de frondes e número de frondes, nas espécies *Blechnum brasiliense* Desv. e *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett.....pág. 60
- Tabela 7 Taxa de crescimento relativo de *Blechnum brasiliense* Desv., *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin., *Cyathea delgadii* Sternb. e *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mettpág. 61
- Figura 1 Aspecto geral de esporófito de *Blechnum brasiliense* Desv.....pág. 07
- Figura 2 Detalhe de uma fronde de *Blechnum brasiliense* Desv. mostrando a disposição dos soros.....pág. 07
- Figura 3 Aspecto de esporófito de *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin.....pág. 08
- Figura 4 Detalhe da fronde mostrando os soros de *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin.....pág. 08
- Figura 5-A Aspecto de esporófitos de *Cyathea delgadii* Sternb.....pág. 09
- Figura 5-B Fronde de *Cyathea delgadii* Sternb., mostrando a disposição dos sorospág. 09
- Figura 6-A Aspecto de esporófito de *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett.....pág. 10
- Figura 6-B Detalhe da disposição dos soros de *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett.....pág. 10

Figura 7 Localização do Parque Natural Municipal São Francisco de Assis.....	pág. 13
Figura 8 Vista geral do Parque Natural Municipal São Francisco de Assis.....	pág. 14
Figura 9 Localização do Parque Natural Municipal São Francisco de Assis.....	pág. 14
Figura 10 Fotomicrografia em microscopia óptica de esporos de <i>Blechnum brasiliense</i> Desv.....	pág. 20
Figura 11 Esporos de <i>Blechnum brasiliense</i> Desv. em microscopia eletrônica de varredura.....	pág. 20
Figura 12 Fotomicrografia em microscopia óptica de esporos de <i>Cyathea corcovadensis</i> (Raddi) Domin.....	pág. 21
Figura 13 Esporos de <i>Cyathea corcovadensis</i> (Raddi) Domin. em microscopia eletrônica de varredura.....	pág. 21
Figura 14 Fotomicrografia em microscopia óptica de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> Sternb.....	pág. 22
Figura 15 Esporos de <i>Cyathea delgadii</i> Sternb. em microscopia eletrônica de varredura.....	pág. 22
Figura 16 Fotomicrografia em microscopia óptica de esporos de <i>Saccoloma inaequale</i> (Kze.) Mett.....	pág. 23
Figura 17 Esporos de <i>Saccoloma inaequale</i> (Kze.) Mett. Em microscopia eletrônica de varredura.....	pág. 23
Figura 18 Curva de germinação de esporos de <i>Blechnum brasiliense</i> Desv. mantidos em sala de cultivo a $20\pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas.....	pág. 24
Figura 19 Curva de germinação de esporos de <i>Cyathea corcovadensis</i> (Raddi) Domin. mantidos em sala de cultivo a $20\pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas.....	pág. 25
Figura 20 Curva de germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> Sternb. mantidos em sala de cultivo a $20\pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas.....	pág. 26
Figura 21 Curva de germinação de esporos de <i>Saccoloma inaequale</i> (Kze.) Mett mantidos em sala de cultivo a $20\pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas.....	pág. 27
Figura 22 Curvas de germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> Sternb. submetidos a diferentes irradiâncias no mês de abril.....	pág. 29

Figura 23 Gráfico de irradiâncias para as curvas de germinação de <i>Cyathea delgadii</i> Sternb.....	pág. 30
Figura 24 Efeito de diferentes irradiâncias no mês de abril na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> Sternb.....	pág. 31
Figura 25 Curvas de germinação de esporos de <i>Blechnum brasiliense</i> Desv., submetidos a diferentes irradiâncias no mês de junho.....	pág. 35
Figura 26 Gráfico de irradiâncias para as curvas de germinação de <i>Blechnum brasiliense</i> Desv.....	pág. 36
Figura 27 Efeito de diferentes irradiâncias no mês de junho na germinação de esporos de <i>Blechnum brasiliense</i> Desv.....	pág. 37
Figura 28 Gametófitos de <i>Blechnum brasiliense</i> Desv. com 133 dias.....	pág. 46
Figura 29 Gametófitos de <i>Cyathea corcovadensis</i> (Raddi) Domin. com 105 dias.....	pág. 47
Figura 30 Gametófitos de <i>Cyathea delgadii</i> Sternb. com 133 dias.....	pág. 48
Figura 31 Gametófitos de <i>Saccoloma inaequale</i> (Kze.) Mett com 133 dias.....	pág. 49
Figura 32 Curva de fecundação de gametófitos de <i>Blechnum brasiliense</i> Desv. cultivados em bandejas transparentes de polietileno 12 x 9 cm, em sala de cultivo 20±3°C e fotoperíodo de 16 horas.....	pág. 52
Figura 33 Curva de fecundação de gametófitos de <i>Cyathea corcovadensis</i> (Raddi) Domin, cultivados em bandejas transparentes de polietileno 12 x 9 cm, em sala de cultivo 20°C e fotoperíodo de 16 horas.....	pág. 53
Figura 34 Curva de fecundação de gametófitos de <i>Cyathea delgadii</i> Sternb., cultivados em bandejas transparentes de polietileno 12 x 9 cm, em sala de cultivo 20±3°C e fotoperíodo de 16 horas.....	pág. 54
Figura 35 Curva de fecundação de gametófitos de <i>Saccoloma inaequale</i> (Kze.) Mett, cultivados em bandejas transparentes de polietileno 12 x 9 cm, em sala de cultivo 20±3°C e fotoperíodo de 16 horas.....	pág. 55
Figura 36 Gametófitos e esporófitos jovens de <i>Blechnum brasiliense</i> Desv. cultivados em bandejas de polipropileno, mantidos em sala de cultivo a 20±3°C e fotoperíodo de 16 horas.....	pág. 56
Figura 37 Gametófitos e esporófitos jovens de <i>Cyathea corcovadensis</i> (Raddi) Domin. cultivados em bandejas de polipropileno, mantidos em sala de cultivo a 20±3°C e fotoperíodo de 16 horas.....	pág. 56

Figura 38 Gametófitos e esporófitos jovens de *Cyathea delgadii* Sternb. cultivados em bandejas de polipropileno, mantidos em sala de cultivo a $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.....pág. 57

Figura 39 Gametófitos de *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett cultivados em bandejas de polipropileno, mantidos em sala de cultivo a $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.....pág. 57

RESUMO

As pteridófitas constituem um importante grupo de organismos da flora brasileira. São importantes grupos de plantas utilizados na ornamentação de casas e jardins. Dados fisiológicos e morfológicos sobre essas plantas são restritos. Portanto, este trabalho teve a finalidade de estudar métodos que contribuam para otimizar sua propagação e conservação. Foram verificados aspectos da morfologia, viabilidade de esporos e desenvolvimento inicial de quatro espécies: *Blechnum brasiliense* Desv., *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin., *Cyathea delgadii* Sternb. e *Saccoloma inaequale* (Kze) Mett. Frondes férteis foram coletadas no Parque Natural Municipal São Francisco de Assis, Blumenau-SC. As frondes secaram em papel de filtro à temperatura ambiente. Esporos foram separados dos esporângios por filtragem em papel entretela e armazenados a $7 \pm 1^\circ\text{C}$. Esporos foram analisados em microscópio óptico e em microscópio Eletrônico de Varredura. Experimentos para estabelecer as curvas de germinação, foram realizados em sala de cultivo a $20 \pm 3^\circ\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $33 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. *B. brasiliense* atingiu 65% de germinação e o \bar{t} (tempo médio de germinação) foi de 12,54 dias. *C. corcovadensis* atingiu 31,75 % de germinação e o \bar{t} foi de 15,23 dias. *C. delgadii* apresentou 75 % de esporos germinados e o \bar{t} foi de 12,99 dias. *S. inaequale* apresentou 60% de germinação e seu \bar{t} foi de 17,81 dias. Estudou-se o efeito de 5, 22, 42, 62 e 100% de irradiância na germinação de *B. brasiliense* (Junho, 2003) e *C. delgadii* (Abril, 2003). As maiores porcentagens de germinação ocorreram sob 22 e 5% de irradiância. Gametófitos na fase cordiforme (com 180 a 200 dias de cultivo), foram analisados sob microscópio óptico e eletrônico de varredura. Todas as espécies apresentaram tricomas glandulares. Para o estudo da porcentagem de fecundação, gametófitos cordiformes foram transferidos para bandejas contendo solo: terra roxa e composto orgânico (3:1) e mantidos em sala de cultivo. *B. brasiliense* apresentou 91,5% de esporófitos após 303 dias de cultivo. *C. corcovadensis* apresentou 35,83% de esporófitos após 264 dias de cultivo. *C. delgadii* apresentou 79,16% de esporófitos após 249 dias de cultivo e *S. inaequale*, 48,39 % de esporófitos após 295 dias de cultivo. A análise de crescimento relativo (TCR) em altura da maior fronde, teve início quando os esporófitos apresentavam 2 a 3 cm de altura. *B. brasiliense* apresentou TCR de 2,19 cm/cm/ano. *C. corcovadensis* apresentou TCR de 2,04 cm/cm/ano. *C. delgadii* e *S. inaequale* apresentaram TCR de 2,39 e 2,99 cm/cm/ano respectivamente.

Palavras-chaves: *Blechnum brasiliense*, crescimento, *Cyathea corcovadensis*, *Cyathea delgadii*, esporófitos, gametófitos, germinação, irradiância, *Saccoloma inaequale*

ABSTRACT

Ferns are an important group of organisms in the Brazilian Flora. These plants are used as ornamentals in houses and gardens. Little information on their physiology and morphology are available. Therefore, this paper has the aim to study methods that can contribute to optimize their propagation and conservation. Some aspects of the morphology, viability and initial growth were studied for: *Blechnum brasiliense* Desv., *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin., *Cyathea delgadii* Sternb. and *Saccoloma inaequale* (Kze) Mett. Fertile fronds were collected in the "Parque Natural Municipal São Francisco de Assis, Blumenau-SC". Fronds dried over filter paper at environmental temperature for releasing spores, which were separated from sporangia through filtration in lens paper and stored at $7\pm 1^{\circ}\text{C}$. Spores were analyzed under optical and scanning microscopy. Tests for the germination curves were carried out in growth room at $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$, density of photon flux of $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ and photoperiod of 16 hours. *B. brasiliense* reached 65% of germination and the \bar{t} (mean germination time) was 12,54 days. *C. corcovadensis* reached 31,75 % of germination and the \bar{t} was 15,23 days. *C. delgadii* reached 75 % germination and the \bar{t} was 12,99 days. *S. inaequale* showed 60% of germination and the \bar{t} was 17,81 days. The effect of 5, 22, 42, 62 and 100% of irradiance were studied for *B. brasiliense* (June, 2003) and *C. delgadii* (April, 2003). The greatest percentage of germination was observed under 22 and 5 % of irradiance. Gametophytes in the heart phase (after 180 to 200 days of cultivation) were analyzed under optical and scanning microscopy. All of the species presented glandular trichomes. To study the percentage of fecundation, cordate gametophytes were transferred to trays containing red soil plus organic compost (3:1) and were kept in growth room. *B. brasiliense* presented 91,5% of sporophytes after 303 days of cultivation. *C. corcovadensis* presented 35,83% of sporophytes after 264 days of cultivation. *C. delgadii* showed 79,16% of sporophytes after 249 days of cultivation and *S. inaequale*, 48,39 % of sporophytes after 295 days of cultivation. The relative growth rate (RGR) in height of the bigger frond started when the sporophytes were 2 to 3 cm in height. *B. brasiliense* showed RGR of 2,19 cm/cm/year. *C. corcovadensis* showed RGR of 2,04 cm/cm/year. *C. delgadii* and *S. inaequale* presented RGR of 2,39 and 2,99 cm/cm/year respectively.

Key-words: *Blechnum brasiliense*, *Cyathea corcovadensis*, *Cyathea delgadii*, gametophytes, germination, growth, irradiance, *Saccoloma inaequale*, sporophytes.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Diversidade de espécies de pteridófitas e ciclo de vida

As pteridófitas constituem um importante grupo de organismos na megadiversa flora brasileira, com cerca de 1.150 espécies de um total estimado de 9.000 a 11.500 espécies no mundo. Estima-se que 700 espécies estejam atualmente ameaçadas (Walter & Gillett 1998 *apud* Windisch 2002). A diversidade das samambaias é maior nos trópicos, onde aproximadamente 3/4 das espécies são encontradas (Raven *et al.* 2001).

A maioria das espécies de samambaias pertence à ordem Filicales. Os esporos dessa ordem são homosporados e dão origem a gametófitos de vida livre, bissexuados, que são freqüentemente encontrados em locais úmidos, tais como nas laterais de vasos em casas de vegetação. O gametófito desenvolve-se rapidamente em uma estrutura membranosa achatada, cordiforme, o protalo, com numerosos rizóides na parte central da superfície inferior. Tanto os anterídios quanto os arquegônios desenvolvem-se na superfície ventral do protalo. Os anterídeos ocorrem principalmente entre os rizóides, enquanto os arquegônios são geralmente formados próximos à reentrância, um entalhe na extremidade anterior do gametófito. A ordem de aparecimento destes gametângios é controlada geneticamente e pode ser mediada por substâncias químicas especiais produzidas pelos gametófitos. O momento de surgimento dos gametângios pode influenciar se o sistema de cruzamento é primariamente de autofecundação ou de fecundação cruzada. A água é necessária para o anterozóide multiflagelado nadar até as oosferas (Raven *et al.* 2001).

1.2 – A importância da luz na germinação e desenvolvimento de Pteridófitas

A maioria das pteridófitas possui esporos fotossensíveis cuja dormência pode ser sobrepujada pela luz (Mohr, 1956). Miller (1968) constatou que dentre 88 espécies estudadas, apenas 7 possuíam esporos que germinavam em número considerável na escuridão completa quando recebiam umidade, oxigênio e temperaturas favoráveis. Sugai & Furuya (1967, 1968) observaram o envolvimento do pigmento fitocromo na germinação de *Pteris vittata* L., cuja promoção ocorria em resposta à luz de baixa irradiância. Os mesmos autores mostraram também interação entre luz azul e luz vermelha, onde a luz azul inibia a germinação, luz vermelha revertia a inibição e vermelho extremo mantinha a inibição de germinação.

Towill & Ikuma (1975) mostraram que a sensibilidade dos esporos à luz se desenvolve durante um período de embebição sob condições aeróbicas, denominado de fase de pré-indução; a fase posterior à pré-indução onde a luz induz a máxima germinação é chamada de fase de indução e o período subsequente onde os processos de indução luminosa levam à divisão celular e produção visível das células rizoidal e protonemal é a fase de pós-indução.

O efeito da luz vermelha na conversão de fitocromo vermelho (FV) a fitocromo vermelho extremo (Fve), foi investigado em *Lygodium japonicum* L. (Tomizawa *et al.*, 1983). Os autores mostraram uma correlação nítida entre os níveis de Fve e a porcentagem de germinação. Por outro lado, Sugai *et al.* (1984) e Sugai & Furuya (1985) observaram uma inibição da promoção de luz vermelha pela luz azul, na germinação de esporos, em *Pteris vittata* L. e *Adiantum capillus-veneris* L.

Embora a luz azul possa inibir a germinação de diversas espécies, Raghavan (1993) comenta que em associação à luz vermelha, é fundamental para o crescimento de gametófitos. O crescimento filamentosos de gametófitos é induzido e mantido pela luz vermelha ou pelo escuro, enquanto a transição à forma plana é promovida pela luz azul que parece estar envolvida com a expressão de alguns mRNAs. O mesmo autor mostrou que o crescimento de gametófitos na luz azul foi associado a um aumento no número de cloroplastos enquanto que na luz vermelha, cloroplastos são replicados menos freqüentemente do que em luz azul. Estes resultados levaram a conclusão de que a luz azul promove o crescimento plano do gametófito pela maximização da fotossíntese, enquanto a morfologia filamentosos é mantida sob luz vermelha e no escuro. O sistema fitocromo parece estar envolvido na transcrição de genes específicos. Transcrição do gene nuclear rbsS que codifica a subunidade menor da enzima fixadora de CO₂ Rubisco, ocorre somente nos esporos fotoinduzidos de *Anemia phyllitidis* L. (Raghavan, 1993).

Furuya *et al.* (1997) trabalhando com esporos de *Adiantum capillus-veneris* L. concluíram que durante a germinação a primeira mitose que produz uma divisão assimétrica originando uma célula rizoidal e uma célula protonemal, é induzida pela luz vermelha através da ação do fitocromo Fve. Essa mitose induzida pela luz vermelha é inibida reversivelmente pelo vermelho-extremo (VE) e irreversivelmente pela irradiação com luz azul ou UV longo. Entretanto, nem a luz azul e nem o VE inibem a germinação quando os esporos são irradiados após o início da primeira mitose. A primeira mitose parece ser um passo crucial da fotoindução na germinação de esporos. Por outro lado, observam que o fitocromo Fve induz a primeira mitose, mas a próxima mitose que origina o crescimento do protalo é induzida pelo

receptor de luz azul e inibida pela luz vermelha. Atualmente, sabe-se que as várias fases da mitose são reguladas positiva ou negativamente por enzimas quinases dependentes de proteínas ciclinas. Uchida & Furuya (1997) observaram que em esporos de *Adiantum capillus-veneris* L., o fitocromo e o receptor de luz azul agem antagonicamente regulando a primeira mitose. Através da incorporação de timidina ³H observaram que o fitocromo Fve induz o ciclo celular a entrar na fase S da primeira mitose após irradiação com luz vermelha. Já, a luz azul antes ou após o tratamento com luz V inibe totalmente a síntese de DNA induzida pelo Fve. Irradiações rápidas com luz vermelha, vermelho-extremo ou azul após 28 horas de indução por luz vermelha não produziram nenhum efeito.

1.3 – Alguns estudos sobre o efeito da luz na germinação de pteridófitas, realizados no Brasil

Esteves & Felipe (1985), estudaram a germinação de nove espécies de pteridófitas herbáceas encontradas em cerrados do Estado de São Paulo (Mogi-Guaçú e Itirapina): *Adiantum serratodentatum* Willd., *Anemia flexuosa* (Sav.) Sw., *Anemia raddiana* Link., *Doryopteris concolor* Langsd. & Fisch., *Polypodium hirsutissimum* Raddi, *Polypodium latipes* Langsd. & L. Fisch., *Polypodium pleopeltifolium* Raddi, *Polypodium polypodioides* (L.) Watt. var. *minus*, *Polypodium squamulosum* Kaulf. Esses autores observaram que apenas duas apresentaram germinação no escuro: *Polypodium pleopeltifolium* e *Polypodium polypodioides*.

A samambaia arbórea *Cyathea delgadii* Sternb., coletada na Floresta Atlântica da Serra do Mar do Estado de São Paulo, apresentou esporos que necessitam de luz para germinar (Marcondes-Ferreira & Felipe, 1984). Randi & Felipe (1988a) observaram que esporos dessa espécie são sensíveis a tratamentos luminosos de luz vermelha de apenas um minuto de duração, após um período de 24 horas de embebição no escuro. Tratamentos de 24 e 48 horas de luz azul após 48 horas de pré-indução no escuro, promoveram menos de 2% da germinação de esporos dessa espécie, enquanto que tratamento semelhante com luz vermelha promoveu 50% de germinação (Randi & Felipe, 1988b). Felipe, Esteves & Randi (1989), compararam as porcentagens de germinação de esporos de duas espécies arbóreas coletadas na Floresta Atlântica da Serra do Mar do Estado de São Paulo: *Cyathea delgadii* Sternb. e *Trichipteris corcovadensis* (Raddi) Copel. atualmente denominada *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin. (Fernandes, 1997) e uma herbácea coletada no cerrado de Mogi-Guaçú, no Estado de São Paulo: *Polypodium latipes* Langs & L. Fisch. Observaram que a germinação é baixa para

Trichipteris corcovadensis, atingindo no máximo 20% após 14 dias de cultivo, enquanto que para *Cyathea delgadii* após o mesmo período, a germinação atingiu 75%. *Polypodium latipes* atingiu 80% de germinação após 6 dias de cultivo nas mesmas condições das espécies citadas anteriormente.

Esporos de outra espécie arbórea, *Dicksonia sellowiana* Hook., coletada na Floresta Ombrófila Mista Atlântica do Município de Antônio Carlos, necessitam de luz para germinar e atingiram a máxima porcentagem de germinação a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ em luz branca constante após 8 ou 9 dias de cultivo. A fase de pré-indução para esporos induzidos por 24 horas de luz branca ou vermelha foi de 72 horas (Filippini *et al* 1999). As autoras verificaram que houve correlação entre a porcentagem de germinação e o número de horas diárias de luz branca de longa duração. Estudando o efeito de diferentes irradiâncias em condições ambientais, verificaram que 34 e 2% de irradiância induziram as menores porcentagens de germinação, enquanto que 26, 21, 19 e 4% de irradiância induziram porcentagens de germinação mais altas. As mesmas autoras observaram que gametófitos crescidos em luz branca apresentaram-se planos e bidimensionais, enquanto os crescidos sob luz vermelha mostraram-se filamentosos.

Simabukuro *et al.* (1993) estudaram a germinação de 8 espécies de pteridófitas de mata ciliar e constataram que todas germinavam na presença de luz. Constataram que o tempo médio de germinação (\bar{t}) variou de 2,61 dias para *Blechnum brasiliense* Desv. a 9,01 dias para *Asplenium serra* Langsd. & Fisch.

Randi (1996) observou que esporos da samambaia presente em manguezais, *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch, necessitam de luz para germinar. A máxima germinação ocorreu após 9 dias de cultivo a 25°C , sob luz constante e a fase de pré-indução foi de 24 horas para esporos induzidos a germinar após receberem 24 horas de luz fluorescente branca, mas a máxima germinação ocorre após 48 horas de pré-indução.

(Brum & Randi, 2002) utilizando esporos de *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching, uma pteridófito (Dryopteridaceae) usada para compor arranjos florais, foram coletados no Município de Ilha Comprida, São Paulo. Essa espécie também apresenta esporos sensíveis à luz. O efeito de 72, 54, 17 e 9% de irradiância total sobre a germinação dessa espécie em condições ambientais, foi analisado. Experimentos foram conduzidos em Março, Abril e Agosto de 2000. Sob 54 e 72% de irradiância em Março, a germinação foi completamente inibida e parcialmente inibida sob 72% de irradiância em Abril. O menor tempo médio de

germinação (\bar{t}) foi observado sob 9% de irradiância em Abril (7,93 dias) e Agosto (8,80 dias), respectivamente, seguidos de 17% em Abril (10,12 dias) e 9% em Março (11,62 dias).

1.4 – Alguns estudos sobre a morfo-anatomia de gametófitos

A morfo-anatomia dos gametófitos de pteridófitas foi amplamente estudada por diversos autores, citando: Chiou *et al.* 1998, Chiou & Farrar 1997, Garrafa 1990, Jaramillo *et al.* 1996, 1998 e 2000, Mendoza *et al.* 1999, Pangua *et al.* 1994, Pérez-García *et al.* 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999 e 2001, Prada *et al.* 1995, Ranal (1991, 1993, 1995), Roux 1993, Sheffield *et al.* 2001, Suzuki (2003) e Whittier & Thomas 1993. 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.

Diversos dos autores citados observaram que gametófitos de algumas das espécies estudadas apresentavam tricomas desde a fase filamentosa até a fase cordiforme. Alguns destes tricomas são glandulares.

Os tricomas de plantas superiores podem ser unicelulares ou multicelulares, podendo ser formados por uma única camada de células (uniseriados) ou por várias camadas (multiseriados). Alguns tricomas podem ser glandulares (Dickson, 2000). Os tricomas glandulares podem apresentar uma cabeça unicelular ou multicelular composta de células secretoras, localizadas sobre uma coluna de células não glandulares. Em pteridófitas, a maioria das espécies citada na literatura apresenta tricomas unicelulares, alguns dos quais são glandulares. Por exemplo, Pérez – García *et al.* (1999) estudaram seis espécies mexicanas do gênero *Dryopteris* (Dryopteridaceae) e observaram que todas apresentavam tricomas capitados unicelulares. Exemplos de espécies que apresentaram tricomas unicelulares glandulares em gametófitos são: *Thelypteris rhachiflexuosa* Riba (Thelypteridaceae) e *Blechnum cycadifolium* (Blechnaceae) (Pérez – García *et al.* 1994, 1996)

O desenvolvimento gametofítico foi acompanhado em *Dicksonia sellowiana* Hook. por Suzuki (2003). Nessa espécie, aos 15 dias de cultivo, a fase filamentosa caracteriza-se por possuir uma célula rizoidal e 3 a 7 células protonemais. A célula rizoidal é alongada, aclorofilada e de coloração parda. As células protonemais, originadas por divisões da célula protálica inicial, formam um filamento unisseriado, de coloração verde devido à presença de muitos cloroplastos. Não há formação de tricomas nas células protonemais. O gametófito filamentoso inicia divisão lateral quando apresenta 7 células. Quando a região apical apresenta aproximadamente quatro células, a célula apical diferencia-se em célula obcônica

ou meristemática, entre 30 a 35 dias de cultivo. Essa célula meristemática dá origem a uma zona meristemática apical pluricelular de posição central que origina gametófitos espatulados. A lâmina do protalo é formada por sucessivas divisões celulares que possibilitam a expansão, mas mantém-se uniestratificada em toda a fase gametofítica, contendo grande número de cloroplastos. Os rizóides são hialinos, longos, não clorofilados, de coloração pardo-clara, localizados na superfície ventral do gametófito. Aos 45 dias o gametófito adquire a forma cordata, com as expansões laterais distintas na lâmina do protalo, onde também se evidencia o meristema apical central. Os gametófitos de *Dicksonia sellowiana* nas fases espatulada e cordiforme não apresentaram tricomas. Aos 75 dias de desenvolvimento os gametófitos apresentam-se cordiformes e aos 90 dias apresentam-se arquegoniados e sem tricomas. Sob microscopia eletrônica de varredura, constata-se que os arquegônios são multicelulares e formados por quatro colunas de células. Aos 84 dias de cultivo, foram observados os primeiros esporófitos.

1.5 – Espécies estudadas neste trabalho

Neste trabalho foram estudadas as seguintes espécies: *Blechnum brasiliense* Desv. (Blechnaceae), *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin, *Cyathea delgadii* Sternb. (Cyatheaceae) e *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett. (Dennstaedtiaceae).

Kazmirczak (1999) observou que *Blechnum brasiliense* Desv. (Figura 1 e 2) uma espécie de hábito sub-arbóreo que habita locais úmidos e sombrios no interior da mata, beira de córregos, desde zero até 1400 m de altitude e também é encontrada em barrancos úmidos de beira da estrada, com vegetação pioneira. Distribuí-se geograficamente na Guatemala, Colômbia, Peru, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai. No Brasil foram encontrados registros da espécie nos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.



Figura 1 – Aspecto geral de esporófito de *Blechnum brasiliense* Desv. Foto: Almir Giovani Figueiredo 2004.



Figura 2 – Detalhe de uma fronde de *Blechnum brasiliense* Desv. mostrando a disposição dos soros. Foto: Lúcia Sevegnani 1999.

Segundo Barrington (1978) *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin (Fernandes 1997) citada por Tryon & Tryon (1982) como *Trichypteris corcovadensis* (Figura 3 e 4) é uma espécie de pteridófita de hábito arbóreo a qual habita florestas primárias ou secundárias, campos gerais planálticos do Brasil Meridional ou campos rupestres e cerrados, onde cresce em capões e em matas-de-galeria ou entre vegetação de baixo porte. Cresce na orla da mata ou no seu interior, de preferência em lugares expostos ao sol moderado ou sol pleno. Também é encontrada nos interiores mais sombrios das matas, crescendo tanto nos interflúvios como beiras de córregos, barrancos ou lugares úmidos e entre vegetação herbáceo-arbustiva de altitude.



Figura 3 – Aspecto de esporófito de *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin. Foto: Almir Giovani Figueiredo 2004.



Figura 4 – Detalhe fronde mostrando os soros de *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin. Foto: Almir Giovani Figueiredo 2004.

Cyathea delgadii Sternb. (Figura 5-A e B), está também é uma espécie de pteridófita arbórea que prefere sítios úmidos do interior das matas, mas não ocorre em interiores das matas muito escuros. É comum nas bordas das matas mais altas. Cresce preferencialmente em florestas primárias, comum em florestas-galerias, campo rupestre, mas também em florestas secundárias ou capoeiras, porém desaparece com antropismo muito intenso. Segundo Tryon (1976) distribui-se geograficamente da Costa Rica, Panamá, em torno da Bacia Amazônica desde a Guiana Inglesa até a Bolívia, sudeste do Brasil chegando ao Nordeste, até o Ceará. No Brasil, ocorre em Roraima, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Ceará, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Ilha Trindade. De acordo com Randi & Felipe (1988), esporófitos de *Cyathea delgadii* localizados na Reserva Biológica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, S.P., produziram esporos férteis durante todo o ano de 1985 e não houve diferença estatisticamente significativa nas porcentagens de germinação.



Figura 5 – 5-A – Aspecto de esporófito de *Cyathea delgadii* Sternb. Foto: Almir Giovani Figueiredo 2004; 5-B – Fronde de *Cyathea delgadii* Sternb., mostrando a disposição dos soros. Foto: Almir Giovani Figueiredo 2004.

Tryon & Tryon (1982) referem-se ao gênero *Saccoloma* Kaulf. como sendo de floresta, freqüentemente crescendo sob sombra densa. Nas Américas, cresce nas florestas pluviais, em escarpas e declives das montanhas, nas ravinas, menos freqüente nas florestas secundárias, ou raramente nos pântanos ou nas rochas. O gênero cresce de 50 até 2000 m de altitude. O gênero *Saccoloma* ocorre nas Américas, no Madagascar e na Malásia. Nas Américas ocorre desde Vera Cruz no México até Bolívia e Santa Catarina no Brasil. Neste trabalho estudou-se a espécie *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett. a qual possui hábito herbáceo (Figura 6-A e B).



Figura 6 – 6-A – Aspecto de esporófito de *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett. Foto: Juliano Albano 2001; 6-B – Detalhe da disposição dos soros de *Saccoloma inaequale* (Kze) Mett. Foto: Almir Giovani Figueiredo 2004.

Este trabalho teve a finalidade de estudar aspectos da germinação e do crescimento inicial de esporófitos das espécies citadas a fim de gerar conhecimentos que possam ser úteis à sua propagação, conservação e manejo.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Estudar a morfo-anatômica e a viabilidade de esporos e o desenvolvimento inicial de esporófitos de: *Blechnum brasiliense* Desv., *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin, *Cyathea delgadii* Sternb. e *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett.

2.2 – Objetivos específicos

- Analisar sob microscopia óptica e eletrônica a morfologia de esporos.
- Realizar testes para estabelecer curvas de germinação.
- Determinar o tempo médio de germinação.
- Avaliar a porcentagem de esporos viáveis para cada espécie.
- Analisar o efeito de diferentes níveis de luz na germinação.
- Observar o período de duração da fase gametofítica de cada espécie.
- Analisar a morfo-anatômica de gametófitos na fase adulta.
- Avaliar a porcentagem de esporófitos provenientes de gametófitos de cada espécie.
- Analisar o crescimento de esporófitos através da altura da primeira fronde e do número total de frondes.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Descrição do local de coleta

Fronde férteis foram coletadas no Parque Natural Municipal São Francisco de Assis, localizado no município de Blumenau, S.C., localizado à rua Ingo Hering, nos fundos do Shopping Neumarkt, centro (Figura 9). O Parque possui uma área aproximada de 22,29 ha, sendo coberto por Floresta Ombrófila Densa Atlântica primária e secundária em diferentes estádios sucessionais e com uma exuberante flora epifítica e de lianas. Apresenta relevo acidentado, formando um vale com altitudes entre 35 e 135m, (Figura 8). Coordenadas 26° 55'15''S e 49°05'30''W, (Figura 7). O clima é do tipo Temperado Úmido Verão Quente, sem estação seca. A temperatura média anual é de 20,1°C e a pluviosidade de 1.446mm anuais.

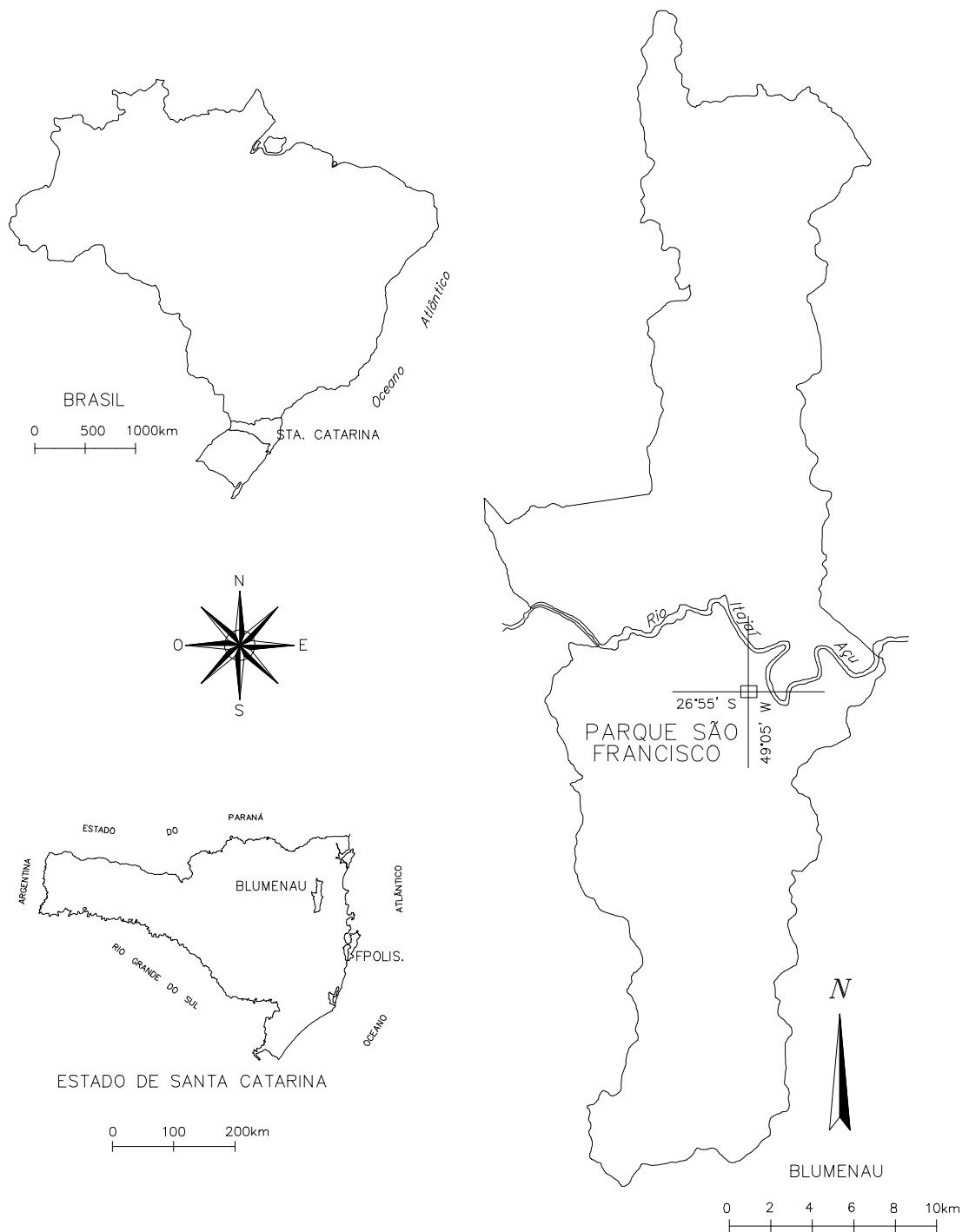


Figura 7 – Localização do parque natural Municipal São Francisco de Assis (aproximadamente $26^{\circ} 55' S$ e $49^{\circ} 05' W$, 35 a 135 m de altitude) no município de Blumenau, em Santa Catarina e no Brasil.



Figura 8 – Vista geral do Parque Natural Municipal São Francisco de Assis (aproximadamente 26° 55' S e 49° 05' W, 35 a 135 m de altitude), Blumenau, SC, inserido na área urbana de Blumenau. Foto: Lauro Eduardo Bacca, 1998.

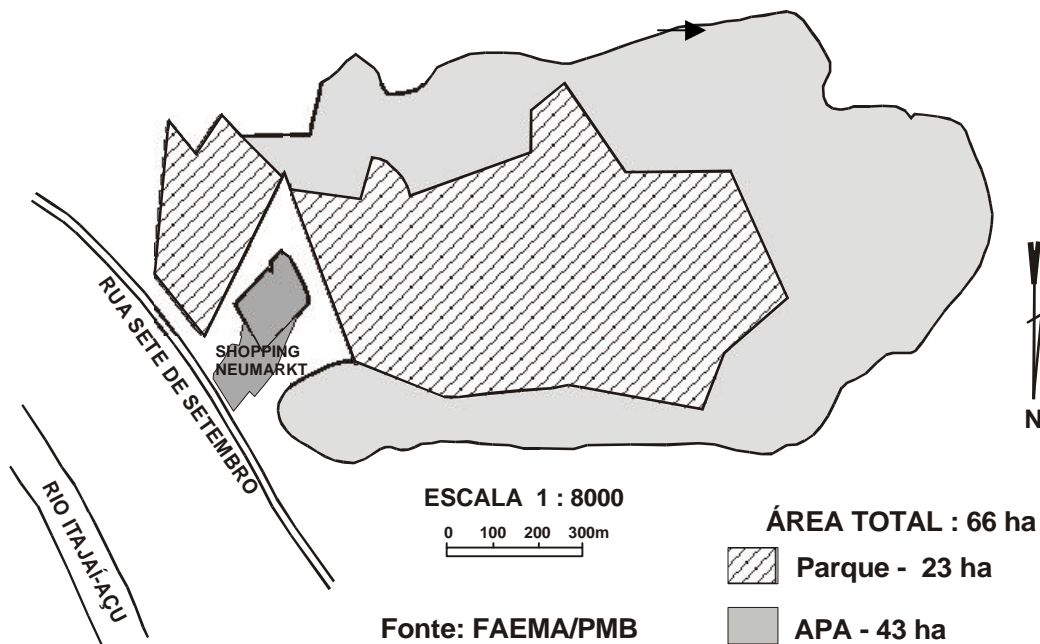


Figura 9 – Localização do Parque Natural Municipal São Francisco de Assis (aproximadamente 26° 55' S e 49° 05' W, 35 a 135 m de altitude), Blumenau, SC. (.....) área de estudo.

3.2 – Espécies estudadas

Foram coletados esporos das seguintes espécies: *Blechnum brasiliense* Desv. (Blechnaceae), *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin. (Cyatheaceae), *Cyathea delgadii* Sternb. (Cyatheaceae) e *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett (Dennstaedtiaceae).

3.3 – Coleta de material e acondicionamento de esporos

Frondes férteis das quatro espécies em estudo foram coletadas no Parque Natural Municipal São Francisco de Assis, no dia 25 de abril de 2002.

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

3.4 – Análise microscópica de esporos

Foram preparadas 3 lâminas, uma para cada espécie, com esporos armazenados em frascos de vidro sob refrigeração a $7 \pm 1^\circ\text{C}$. Colocou-se uma pequena porção de esporos sobre a lâmina, pingando-se sobre estes uma gota de água e cobrindo com lamínula. O material foi fotografado em microscópio óptico da marca Leica DMLS. A este está acoplada uma máquina fotográfica marca Leica MPS 30. O aumento utilizado foi de 20 vezes. As amostras secas foram colocadas sobre suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face, e cobertas com 20 nm de ouro, em metalizador Baltec, modelo CED 030. A documentação foi efetivada em Microscópio Eletrônico de Varredura, marca Phillips, modelo XL30, pertencente ao laboratório de materiais da UFSC.

3.5 – Esterilização de esporos

Esporos de *B. brasiliense*, *C. corcovadensis*, *C. delgadii* e *S. inaequale* foram previamente separados dos esporângios e esterilizados superficialmente pela lavagem em solução de hipoclorito de sódio comercial a 10% acrescida de uma gota de detergente líquido comercial, durante 20 minutos e em seguida foram lavados em água destilada autoclavada e filtrados a vácuo sobre papel de filtro (Randi & Crozier, 1991). Este procedimento foi realizado em capela de fluxo luminar, onde o material permaneceu até a secagem completa.

3.6 – Curvas de germinação

Esporos previamente esterilizados foram inoculados em 2 frascos cônicos tipo “erlenmeyer”, contendo 20ml de solução de Mohr (1956), modificada por Dyer (1979)(Quadro I) em anexo, acrescida de Benlate a 0,1% para evitar contaminação por fungos. A solução foi previamente autoclavada durante 20 minutos a 1 atm. Cerca de 10mg de esporos foram semeados em cada frasco, utilizando-se espátula. Todo o procedimento foi conduzido em capela de fluxo laminar. Experimentos para estabelecer curvas de germinação foram realizados duas vezes durante o desenvolvimento deste trabalho. Os primeiros experimentos preliminares com *Blechnum brasiliense* e *Cyathea corcovadensis* tiveram início no dia 03 de setembro de 2002, com os esporos armazenados à 129 dias. Os experimento para estabelecimento da curva de germinação de *Cyathea delgadii*, tiveram início no dia 07 de novembro de 2002. Para a espécie *Saccoloma inaequale*, os mesmos tiveram início no dia 12 de novembro de 2002. O segundo experimento para estabelecer curvas de germinação foi conduzido com *Blechnum brasiliense* e *Cyathea corcovadensis* (esporos com 244 dias de armazenamento) e *Saccoloma inaequale* com esporos com 167 dias de armazenados. Os três experimentos tiveram início no dia 15 de setembro de 2003. Para estabelecer as curvas de germinação, esporos germinaram em sala de cultivo a 25°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons $33\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Foram preparadas 4 lâminas (repetições) e contados 100 esporos por lâmina, em microscópio binocular e aumento de 100 vezes, para cada espécie estudada. Na primeira curva preliminar, as contagens para *B. brasiliense*, *C. corcovadensis* e *S. inaequale* foram realizadas a cada três dias e para *C. delgadii*, a germinação foi avaliada a cada dois dias, segundo dados da literatura. Na segunda curva, a germinação foi avaliada a cada dois dias (*C. delgadii*, *C. corcovadensis*, *S. inaequale*) ou diariamente (*B. brasiliense*). Durante a realização da primeira curva, foi avaliada a porcentagem de esporos viáveis e inviáveis das espécies estudadas. Foram considerados esporos inviáveis os que não apresentam substâncias de reserva ou que parcialmente acham-se preenchidos com substancia de reserva.

3.7 – Determinação do tempo médio de germinação

O tempo médio de germinação foi calculado a partir dos resultados de germinação de cada repetição (4 lâminas por espécie ou por tratamentos) e para cada dia de contagem de germinação, de acordo com a equação: $\bar{t} = \sum (tn) / \sum n$ onde t é o tempo em dias iniciando no

dia 0 (zero) e n é o número de esporos que completaram a germinação no dia t (Labouriau 1983).

3.8 – Efeito de diferentes irradiâncias na germinação de *Cyathea delgadii* e *Blechnum brasiliense*

O efeito de diferentes irradiâncias sobre a germinação foi analisado para *C. delgadii* (1 a 30 de abril de 2003) e *B. brasiliense*. (12 de junho a 1 de julho) pois essas espécies apresentaram maior disponibilidade de material. Esporos foram semeados em frascos cônicos contendo meio de Dyer, conforme descrito em 3.3.3. e foram mantidos em caixas de 50cm³ revestidas por tela sombrite, cujas reduções de irradiância foram de 5%, 22%, 42% , 62% e 100% (luz solar plena). Os níveis da densidade de fluxo de fótons dentro e fora das caixas foram analisados diariamente, às 14:00 horas, por quantômetro LICOR 250, munido de sensor PAR (400 to 700 nm). Paralelamente, foram registradas as temperaturas máximas e mínimas diárias dentro de cada caixa. As caixas foram mantidas sob luz solar nas dependências do Departamento de Botânica, ao lado do Laboratório de Fisiologia Vegetal.

Para *C. delgadii* foram realizadas contagens de germinação a cada dois dias e para *B. brasiliense* as contagens de germinação foram diárias. Os dados foram apresentados em curvas de germinação e foi calculado o tempo médio de germinação para cada tratamento.

3.9 – Estudo morfo-anatômico dos gametófitos

Esporos de *B. brasiliense* e *S. inaequale* germinaram em 2 frascos (aproximadamente 50mg por frasco) conforme descrito em 3.3.3. Esporos de *C. delgadii* e *C. corcovadensis* (aproximadamente 50mg frasco) germinaram em 6 frascos conforme descrito em 3.3.3. Após um mês de cultivo em meio líquido, os gametófitos filamentosos foram transferidos para bandejas de polipropileno transparente contendo solo constituído de mistura de terra roxa estruturada e composto orgânico na proporção de 3:1.

Para observação em microscópio óptico, segmentos de gametófitos foram colocados sobre lâminas com água e cobertos com lamínula. O registro de imagens foi feito em microscópio óptico, equipado com fotoautomático, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da UFSC e fotomicroscópio estereoscópico marca Olympus SZ-PT 11, no Laboratório de Biologia Celular, UFSC.

Para observação em microscopia eletrônica de varredura, os gametófitos na fase cordiforme e visíveis a olho nu (aproximadamente 180 a 200 dias de cultivo), foram fixados

em glutaraldeído a 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2 (vide Quadro 2) em anexo, e conservados em etanol 70°GL. Algumas amostras fixadas, desidratadas e mantidas em etanol 70°GL, foram totalmente desidratadas em série etílica (etanol 80°, 90°, 96° e duas vezes em 100°GL). Posteriormente foi utilizado HMDS (hexametildesilasane) para secagem, como meio substitutivo de ponto crítico de CO₂ (Bozzola & Russel, 1991). As amostras secas foram colocadas sobre suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face, e cobertas com 20 nm de ouro, em metalizador Baltec, modelo CED 030. A documentação foi efetivada em Microscópio Eletrônico de Varredura, marca Phillips, modelo XL30, pertencente ao laboratório de materiais da UFSC.

3.10 – Curvas de porcentagem de fecundação

Gametófitos cordiformes (visíveis a olho nu), foram transferidos para 4 bandejas de polipropileno transparente contendo solo constituído de mistura de terra roxa estruturada e composto orgânico na proporção de 3:1. Para *B. brasiliense*, foram transferidos 50 gametófitos por bandejas, num total de 200 gametófitos. Para *C. delgadii*, *C. corcovadensis* e *S. inaequale* foram transferidos 30 gametófitos por bandeja, num total de 120 gametófitos. Esse número variou em função da disponibilidade de gametófitos obtidos para cada espécie. O controle da contaminação do solo por fungos foi realizado pelo uso de solução de Benlate a 0,25%. O controle da contaminação por larvas de insetos foi realizado pelo uso de Malation a 0,2%. Semanalmente foram avaliados os números totais de esporófitos provenientes dos gametófitos, por bandeja. As análises foram realizadas até final de Novembro de 2003 e os dados foram expressos na forma de curvas de fecundação.

3.11 – Análise de crescimento de esporófitos

Para obtenção dos esporófitos os esporos de *Blechnum brasiliense* e *Cyathea corcovadensis* foram semeados no dia 03 de setembro de 2002. *Cyathea delgadii* os esporos foram semeados no dia 07 de novembro de 2002 e para *Saccoloma inaequale* no dia 12 de novembro de 2002. Quando esporófitos apresentaram a maior fronde medindo entre 2 a 3 cm, foram transferidos individualmente para vasos de mini-violeta contendo o mesmo solo utilizado anteriormente. Quando os experimentos foram encerrados, os esporófitos de *Blechnum brasiliense* possuíam 330 dias de cultivo; de *Cyathea delgadii*, 446 dias de cultivo; de *Cyathea corcovadensis* 397 dias de cultivo e *Saccoloma inaequale* 312 dias de cultivo.

Para todas as espécies, foram utilizadas 4 repetições (blocos) de 5 plantas num total de 20 plantas. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado. As plantas foram mantidas em sala de cultivo em fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 20 ± 3 °C e irradiância de $33 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

De cada planta foram avaliados: número de frondes por planta e altura da maior fronde. Foi calculada a taxa de crescimento relativo (TCR) de acordo com a seguinte equação:

$L_2 - L_1 / T_2 - T_1$ onde L_2 é o logaritmo da altura da maior fronde no tempo 2 (T_2) e L_1 é o logaritmo da altura da maior fronde no tempo 1 (T_1) (Bernabe *et al* 2000). Tempo 1: dia da implantação do experimento e tempo 2 : dois meses (60 dias) após o início.

3.12 – Análise estatística

Os dados de germinação foram expressos como porcentagem, mas para a análise estatística foram transformados em valor angular ($\arcseno \times \sqrt{\%}$) para normalizar os dados conforme sugerido por Santana & Ranal (2000). Nos testes de efeito de diferentes irradiâncias na germinação, após a transformação angular, as médias de 4 repetições por tratamento, em cada dia de avaliação, foram comparadas pelo teste de comparação de média (Tukey $p < 0.05$). Nos experimentos de análise de crescimento, as alturas de frondes e os números de frondes entre T_2 e T_1 foram comparadas pelo teste t de Student (Snedecor, 1964). Quanto aos parâmetros avaliados os dados foram analisados por algumas medidas de tendência central (média, variância, desvio padrão e intervalo de confiança). Os dados foram analisados pelos softwares Excel for Windows (Microsoft) e Statgraphics.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Aspectos da morfologia de esporos

A Figura 10 mostra esporos de *Blechnum brasiliense* Desv. em microscopia óptica. Esses esporos são monoletes, sendo que os esporos inviáveis são ocos ou possuem poucas gotículas de substância de reserva. Os esporos viáveis são totalmente preenchidos com reserva (Figura 11). A Figura 11 mostra aspectos de esporos de *B. brasiliense* em microscopia eletrônica de varredura. Observa-se que os esporos são monoletes, apresentando pequenas perfurações em quase toda a superfície; porém as perfurações aumentam em diâmetro, próximas à abertura do esporo. De acordo com Tryon & Tryon (1982), os esporos desse gênero são geralmente levemente papilados ou quase lisos e podem apresentar uma face distal inferior (oposta à abertura) bem desenvolvida e reticulada.



Figura 10 – Fotomicrografia em microscopia óptica de esporos de *Blechnum brasiliense* Desv. Setas vermelhas indicam esporos inviáveis; setas verdes indicam esporos viáveis (400 x).

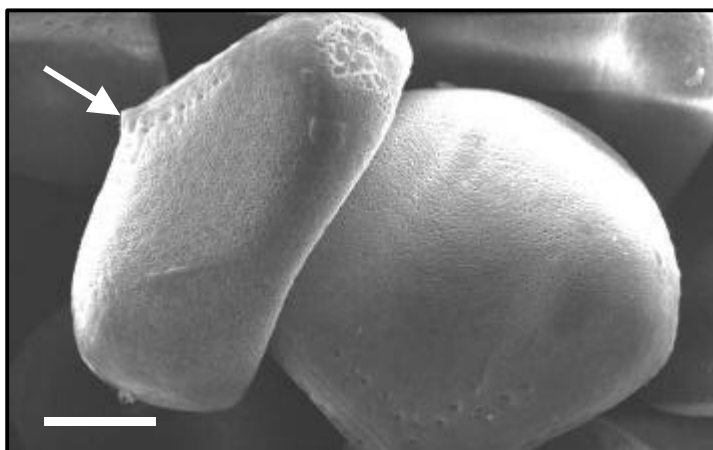


Figura 11 – Esporos de *Blechnum brasiliense* Desv. evidenciando, em microscopia eletrônica de varredura, perfurações na superfície externa. Seta indica abertura. Barra: 10 μm (1500x).

A Figura 12 mostra aspectos de esporos de *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin. em microscópica óptica. Essa espécie apresenta esporos triletes e tetraédricos. Possui esporos inviáveis ocos ou parcialmente preenchidos com substâncias de reserva, enquanto que os esporos viáveis são totalmente preenchidos com substância de reservas, possivelmente lipídeos (Figura 12).

A Figura 13 mostra aspecto de um esporo aparentemente inviável de *C. corcovadensis*, em microscopia eletrônica de varredura. Observa-se que a superfície do esporo trilete mostra-se lisa. De acordo com Tryon & Tryon (1982), esporos desse gênero são também recobertos por estruturas verrugosas e possuem um perispofo bem desenvolvido formado por filamentos mais ou menos conectados, de material especial.

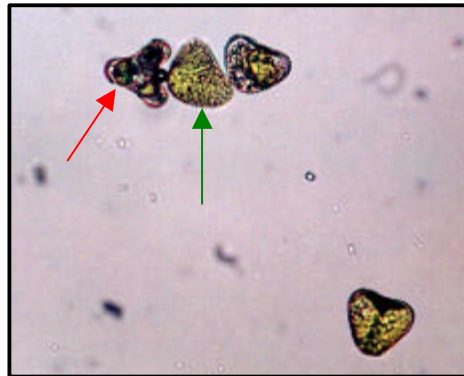


Figura 12 - Fotomicrografia em microscopia óptica de esporos de *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin. Seta vermelha indica esporo inviável e seta verde indica esporo viável(400 x).

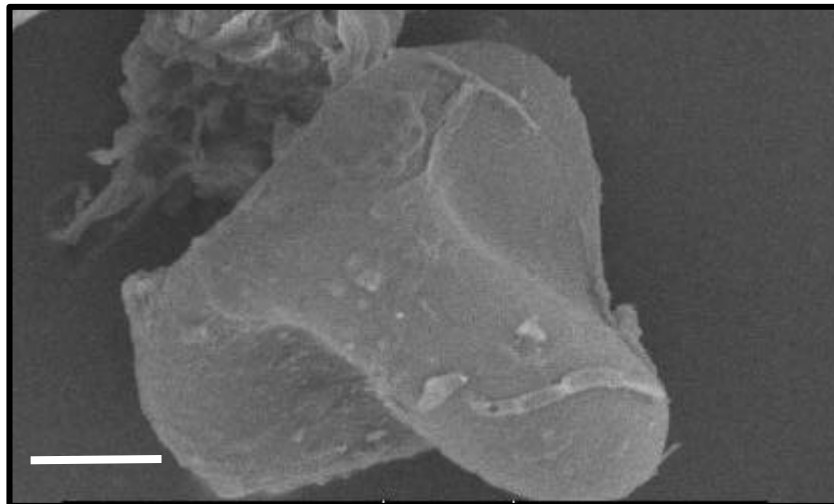


Figura 13 – Esporo de *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin. evidenciando, em microscopia eletrônica de varredura, a superfície aparentemente lisa. Barra: 10 μm (1500x).

A Figura 14 mostra aspectos de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. em microscopia óptica. Essa espécie possui esporos triletes e tetraédricos. Apresenta esporos inviáveis ocios e esporos viáveis aparentemente preenchidos com gotas de substâncias de reserva, possivelmente lipídeos. A Figura 15 mostra aspectos de esporos dessa espécie em microscopia eletrônica de varredura, evidenciando a superfície coberta com filamentos. Nota-se a abertura do envoltório do esporo, em forma de trilete. De acordo com Tryon & Tryon (1982), esporos desse gênero são cobertos por envoltórios ricos em estruturas verrugosas e possuem um perisporo bem desenvolvido, formado por filamentos, mais ou menos conectados, de material especial. O perisporo de *C. delgadii*, conforme os autores, recobre uma estrutura exospórica rica em estruturas filamentosas.

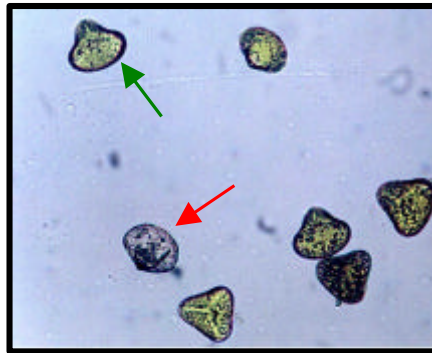


Figura 14 - Fotomicrografia em microscopia óptica de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. Seta vermelha indica esporo inviável e seta verde indica esporo viável (400 x).

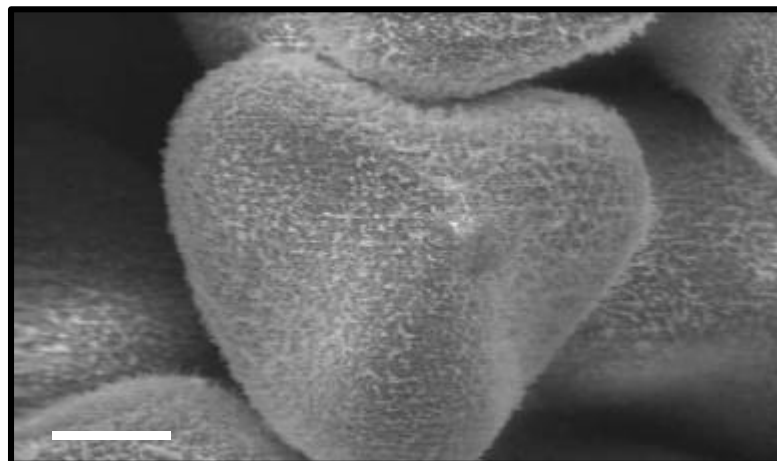


Figura 15 – Esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. evidenciando, em microscopia eletrônica de varredura, a superfície coberta por filamentos. Barra: 10 µm (1500x).

A Figura 16 apresenta esporos de *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett. em microscopia óptica. Essa é uma espécie que apresenta esporos triletes e tetraédricos. Possui esporos inviáveis ocos e esporos viáveis totalmente preenchidos com substâncias de reserva, possivelmente lipídeos. A Figura 17 mostra esporos de *S. inaequale* em microscopia eletrônica de varredura. Observa-se um esporo com o trilete e rugosidades delgadas e dicotômicas, em forma de nervuras, e com superfície lisa. As rugosidades ocorrem também na face distal inferior, oposta à abertura do esporo, dispostas de modo mais irregular, sendo mais espessas e com depósitos granulados esparsos. Segundo Tryon & Tryon (1982), os esporos do gênero *Saccoloma* Kaulf. possuem estrias dicotômicas que podem ser densamente granuladas.

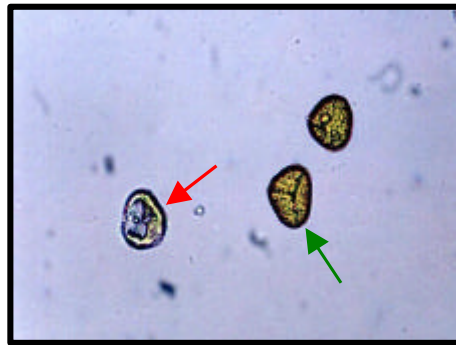


Figura 16 – Fotomicrografia em microscopia óptica de esporos de *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett. Seta vermelha indica esporo inviável (oco) e verde esporo viável (400 x).

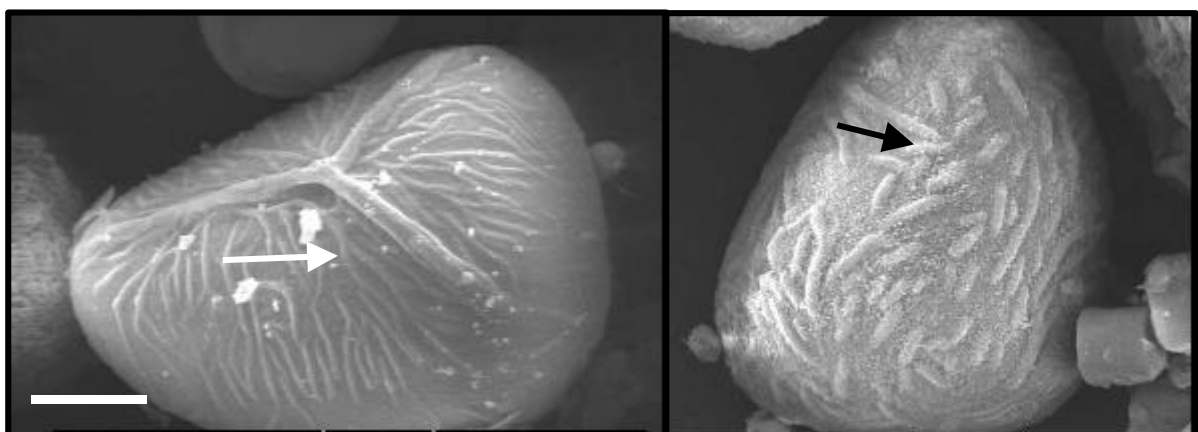


Figura 17 – Esporos de *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett. evidenciando, em microscopia eletrônica de varredura, o trilete e as rugosidades dicotômicas (seta branca) e rugosidades esparsas com granulções (seta preta). Barra: 10 μ m (1500x).

4.2 – Germinação e viabilidade de esporos

Esporos de *Blechnum brasiliense* foram coletados no dia 12 de janeiro de 2003. O experimento teve início no dia 15 de setembro de 2003 e as contagens de germinação foram realizadas a cada 2 dias. A germinação iniciou ao 2º dia e estabilizou entre 11 e 14 dias de cultivo. A germinação estabilizou com aproximadamente com 65% de esporos germinados, como mostra a Figura 18. O tempo médio de germinação obtido neste trabalho para esta espécie foi de 12,54 dias. Esta espécie apresentou uma média de 28,62% de esporos inviáveis. Simabukuro, Esteves & Felipe (1993), observaram que o tempo médio de germinação \bar{t} foi de 2,61 dias e encontraram aproximadamente 60% de esporos germinados após a estabilização da curva.

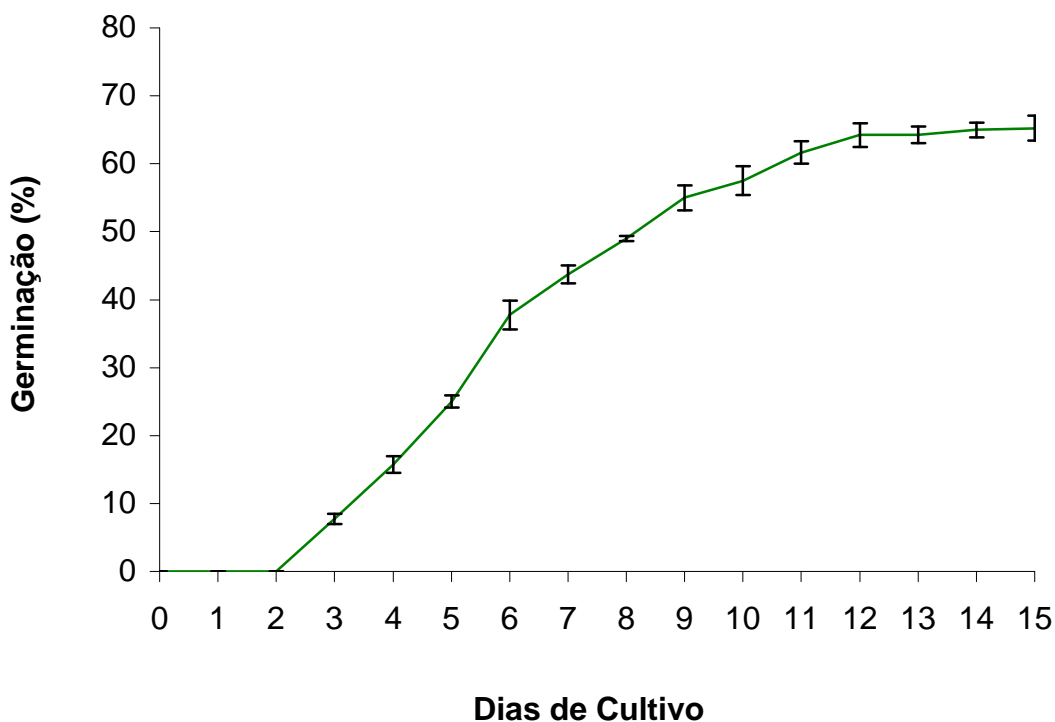


Figura 18 – Curva de germinação de esporos de *Blechnum brasiliense* Desv. mantidos em sala de cultivo a $20\pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons $33\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras verticais indicam desvios-padrões.

Esporos de *Cyathea corcovadensis* foram coletados no dia 12 de janeiro de 2003. O experimento teve início no dia 15 de setembro de 2003 e as contagens de germinação foram realizadas a cada 2 dias. A germinação iniciou no 4º dia (Figura 19), porém a porcentagem de germinação foi muito baixa e atingiu 31,25% ao 20º dia, provavelmente devido ao baixo número de esporos viáveis (42,30%). A germinação começou a se estabilizar após 16 dias. O tempo médio de germinação obtido neste trabalho para esta espécie foi de 15,23 dias. Esta espécie apresentou uma média de 26,45% de esporos inviáveis. Felipe, Esteves & Randi 1989, verificaram que *Trichipteris corcovadensis* (Raddi) Copel., atualmente denominada como *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin. começou a germinar a partir do sexto dia e atingiu aproximadamente 20% de germinação (Fernandes, 1997).

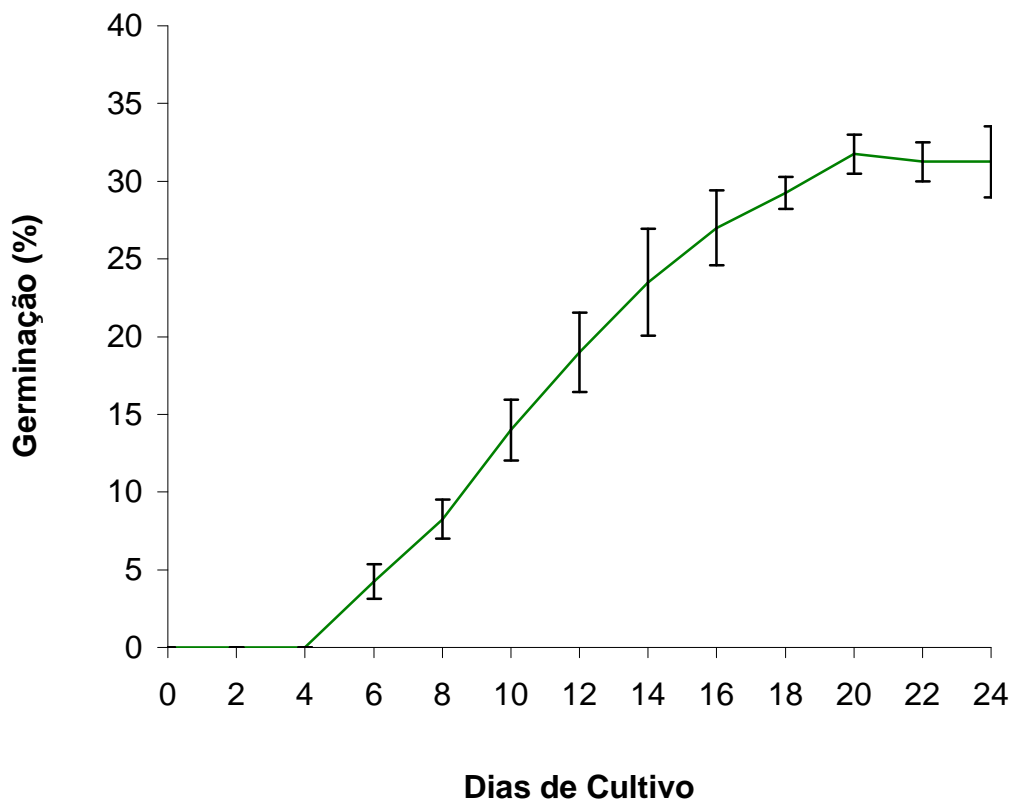


Figura 19 – Curva de germinação de esporos de *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin. mantidos em sala de cultivo a $20\pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons $33\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Barras verticais indicam desvios-padrões.

A germinação de esporos de *Cyathea delgadii* coletados em 25 de abril de 2002, teve início no dia 07 de outubro de 2002 e as contagens de germinação foram realizadas a cada 2 dias. Foram observados esporos germinados a partir do 4 dia e a germinação estabilizou após 16 dias, mantendo a porcentagem de aproximadamente 75% de esporos germinados, (Figura 20). O tempo médio de germinação calculado foi de 12,99 dias. Esta espécie apresentou uma média de 5,55% de esporos inviáveis. Randi & Felipe (1988) observaram que a germinação de *Cyathea delgadii* se inicia a partir do segundo dia.

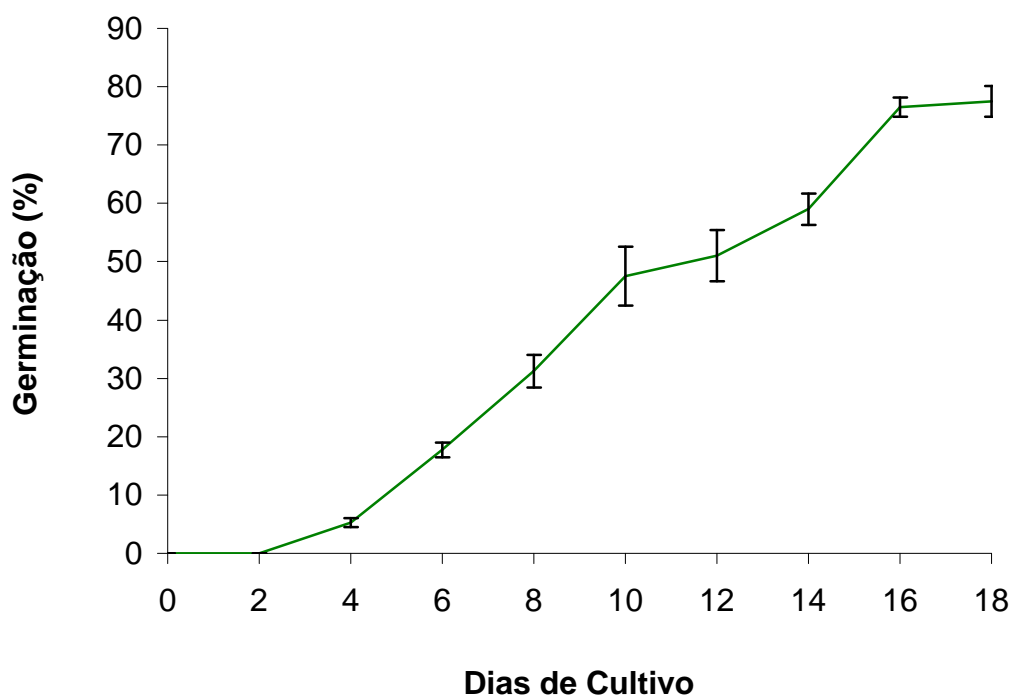


Figura 20 – Curva de germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. mantidos em sala de cultivo a $20\pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons $33\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras verticais indicam desvios-padrões.

Esporos de *Saccoloma inaequale* foram coletados no dia 29 de março de 2003. O experimento teve início no dia 15 de setembro de 2003 e as contagens de germinação foram realizadas a cada 2 dias. Sua germinação 6^o dia, como mostra a Figura 21, e estabilizou ao 20^o dia de cultivo, com aproximadamente 60% dos esporos germinados. O tempo médio de germinação obtido neste trabalho para esta espécie foi de 17,81 dias. Esta espécie apresentou uma média de 5,65% de esporos inviáveis.

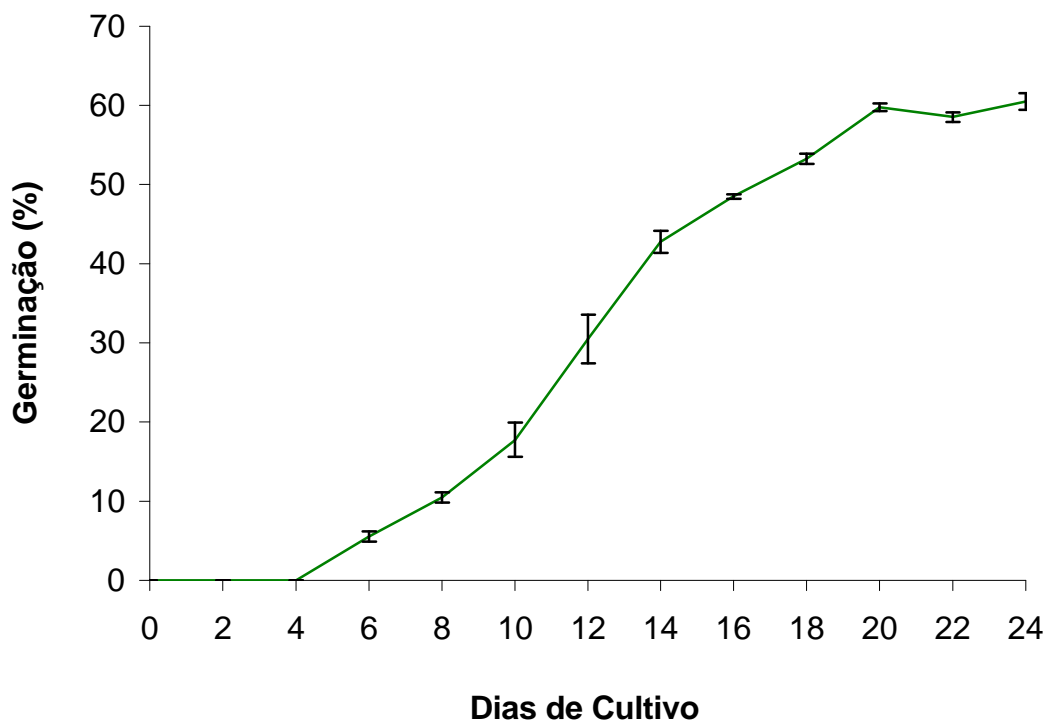


Figura 21 – Curva de germinação de esporos de *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett mantidos em sala de cultivo a $20\pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons $33\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras verticais indicam desvios-padrões.

4.3 – Efeito de diferentes irradiâncias na germinação de *Cyathea delgadii* Sternb. e *Blechnum brasiliense* Desv.

A Figura 22 (A-E) mostra o efeito de diferentes irradiâncias na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*. A Figura 22-A mostra que a pleno sol, a germinação atingiu aproximadamente 5 % após 15 dias de cultivo e permaneceu estável até o 27º dia. Após, houve um ligeiro decréscimo na porcentagem de germinação, fato que pode ser explicado possivelmente pela morte dos gametófitos submetidos à luz solar plena que se apresentou mais intensa. Durante o início deste experimento, os dias eram nublados (Figura 23) o que propiciou uma baixa porcentagem de germinação. A Figura 22-B mostra o efeito de 62% de irradiância na germinação de esporos de *C.delgadii*. A porcentagem máxima (aproximadamente 20%) foi atingida após 12 dias e a seguir houve uma redução da germinação provocada pelo aumento da intensidade luminosa ambiental que provavelmente causou a morte dos esporos e gametófitos jovens. A Figura 22-C mostra que a 42% de irradiância a máxima porcentagem de germinação foi atingida após 21 dias e posteriormente decaiu em decorrência da morte dos esporos e gametófitos também observada nessa irradiância. A Figura 22-D mostra que a germinação a 22% de irradiância atingiu a estabilidade após 27 dias de cultivo, com aproximadamente 70% de esporos germinados. A Figura 22-E mostra que a germinação a 5% de irradiância atingiu o máximo após 30 dias de cultivo, com aproximadamente 80% de esporos germinados.

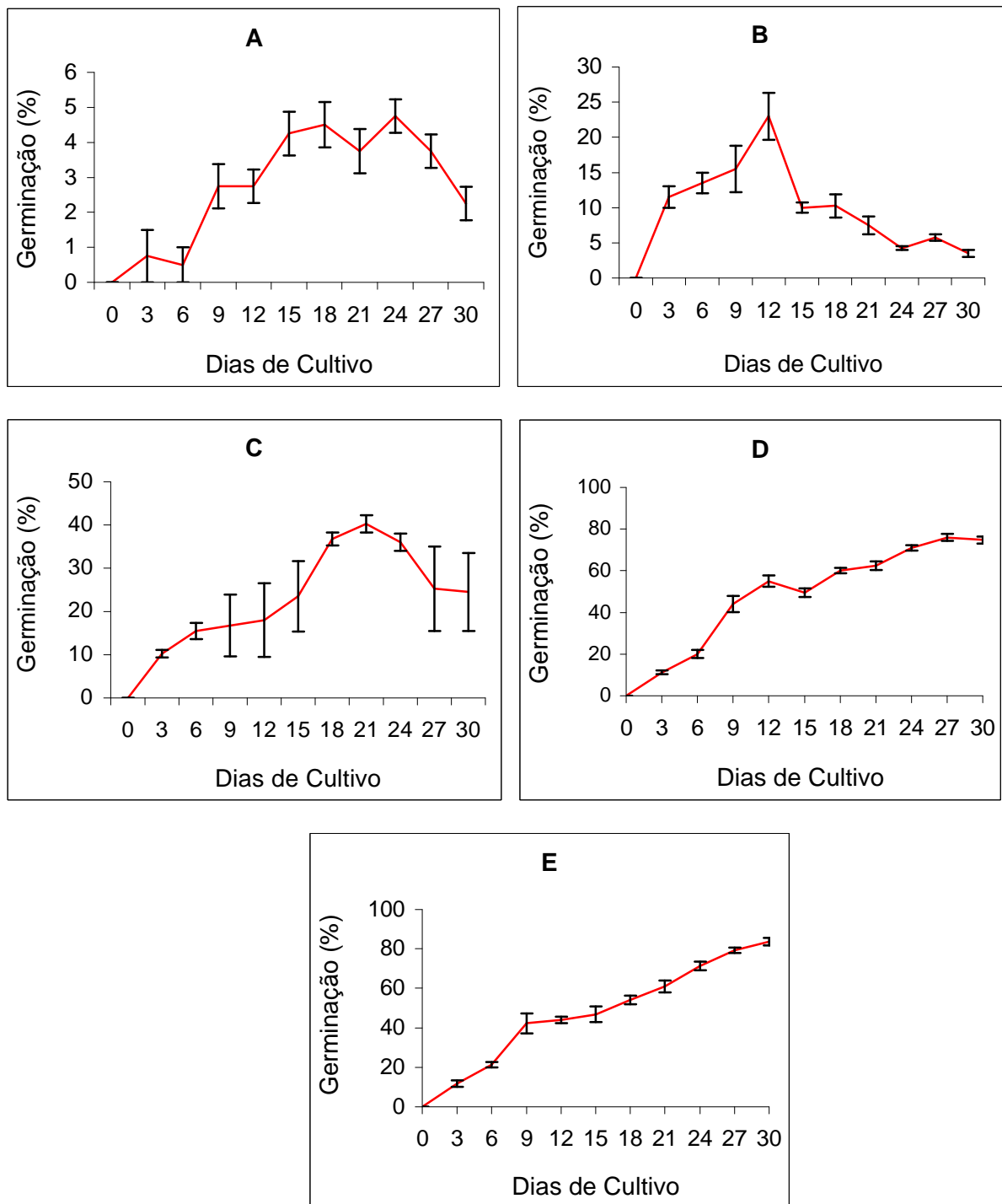


Figura 22 - Curvas de germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. submetidos a diferentes irradiâncias no mês de abril. Irradiâncias: A - 100%, B - 62%, C - 42%, D - 22% e E - 5%. Barras verticais indicam desvios padrões.

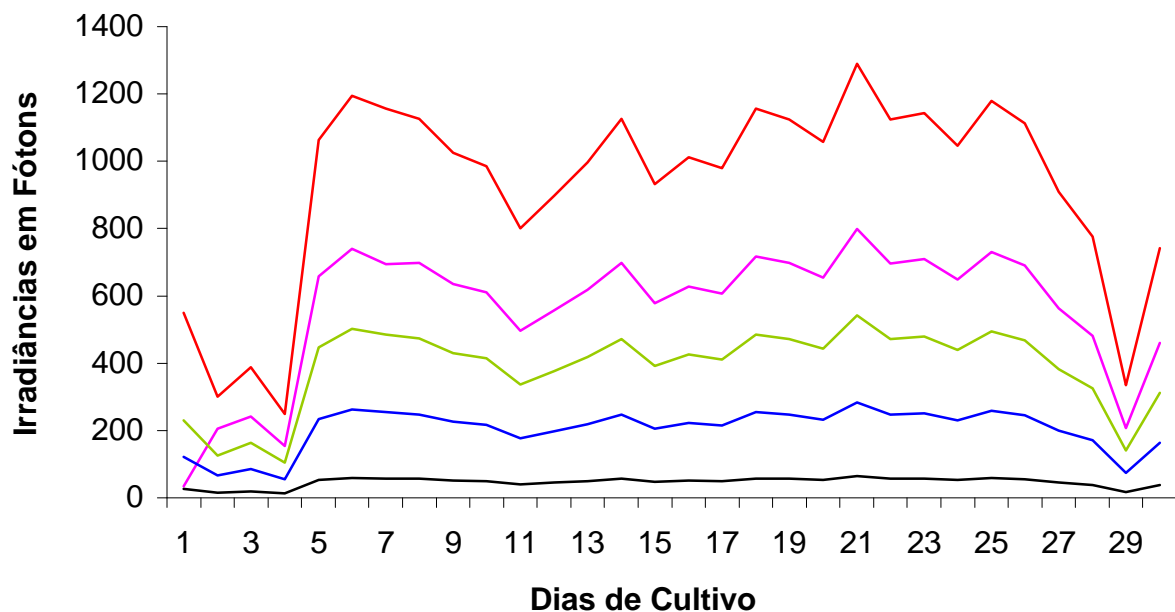


Figura 23 – Gráfico de irradiâncias para as curvas de germinação de *Cyathea delgadii* Sternb., medições em fótons ($\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), por quantômetro LICOR 250, munido de sensor PAR (400 to 700 nm). Irradiâncias: 100% —, 62% —, 42% —, 22% — e 5% —.

A Figura 24 mostra a sobreposição das curvas de germinação sob diferentes irradiâncias, para esporos de *C. delgadii*. Até o 6º dia de cultivo, o único tratamento que diferiu estatisticamente dos demais foi o de 100% de irradiância.

Após 12 dias de cultivo, não houve diferença significativa entre a germinação a 100% e 62 % de irradiância. A porcentagem de germinação a 62 % de irradiância não diferiu da porcentagem a 42% de irradiância, que por sua vez não diferiu da porcentagem a 22% de irradiância. A porcentagem de germinação a 5% de irradiância não diferiu apenas da porcentagem de germinação a 22% de irradiância, sendo estatisticamente superior a todos os outros tratamentos.

Após 18 dias de cultivo, as porcentagens de germinação não diferiram apenas a 5 e 22% de irradiância. Já, as porcentagens de germinação diferiram entre si a 42, 62 e 100% de irradiância.

A partir do 21º dia, as porcentagens de germinação não diferiram estatisticamente entre 100 e 62% de irradiância e entre 22 e 5% de irradiância. A porcentagem de germinação a 42% de irradiância diferiu estatisticamente dos demais tratamentos.

As maiores porcentagens de germinação de *Cyathea delgadii* ocorreram a 22 e 5% de irradiância. Houve uma forte inibição de germinação a 100, 62 e 42% de irradiância.

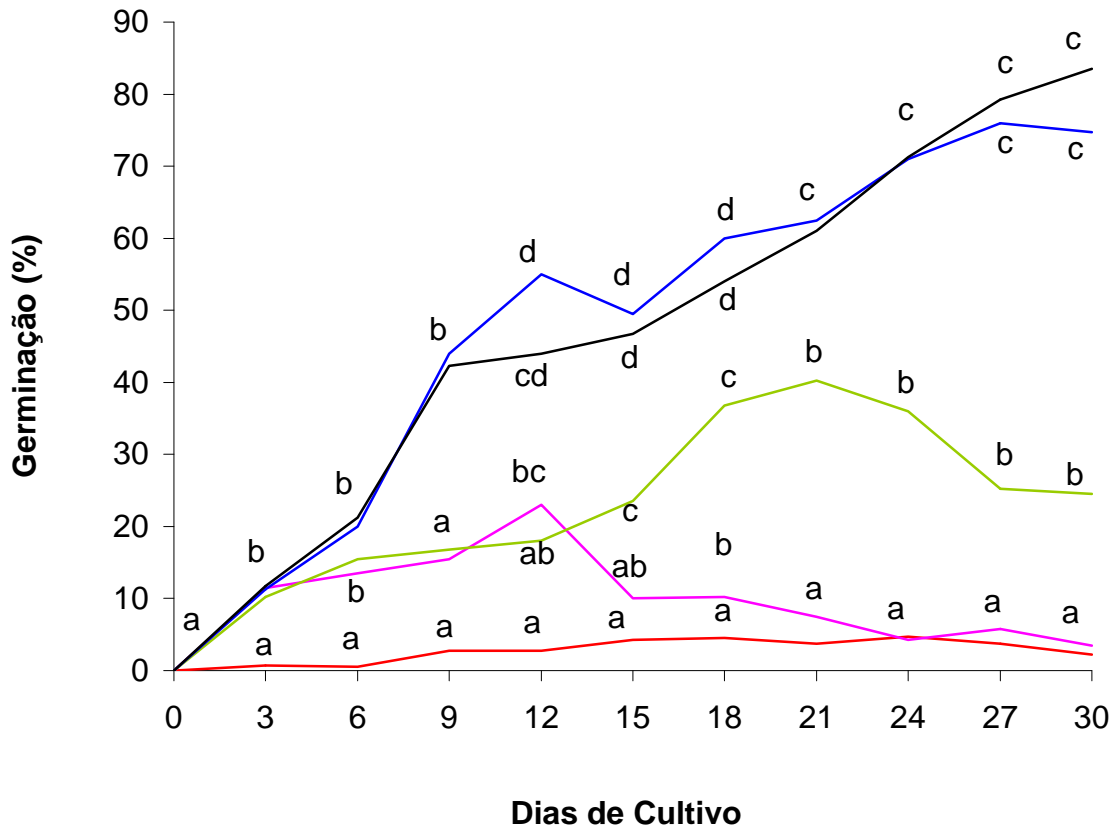


Figura 24 – Efeito de diferentes irradiâncias no mês de abril na germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. Irradiâncias: 100% (vermelha), 62% (magenta), 42% (verde), 22% (azul) e 5% (preta).

A Tabela 1 mostra os tempos médios de germinação (\bar{t}) sob diferentes irradiâncias. Nota-se que o menor tempo médio de germinação foi obtido a 42% de irradiância e o maior a 22% de irradiância que não diferiu de 62% de irradiância. No entanto, a maior porcentagem de germinação foi obtida a 5% de irradiância, cujo tempo médio de germinação não diferiu de 100% de irradiância, que provocou drástica inibição de germinação. O tempo médio de germinação reflete somente a velocidade da germinação, mas é necessário que sejam também levadas em conta as porcentagens de germinação para cada tratamento. A tabela 1 mostra as médias de irradiâncias e também as médias mínimas e máximas de temperaturas durante o mês de abril. A tabela 2 mostra as leituras diárias de temperaturas mínimas e máximas realizadas em cada caixa utilizada para a obtenção das diferentes irradiâncias. Nota-se que as

temperaturas dentro das caixas praticamente não diferiram durante o período. Neste experimento não foram realizadas leituras das temperaturas para a irradiância de 100%.

Tabela 1 – Tempo médio de germinação, CV, porcentagem final de germinação, temperaturas médias e densidade de fluxo de fótons obtidos para *Cyathea delgadii* durante o teste do efeito de irradiâncias na germinação.

Irradiâncias	<i>Cyathea delgadii</i>					
	\bar{t}	C.V.	Porcentagem final de germinação	Médias T °C Mínima	Médias T °C Máxima	Médias Fótons $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
100%	18,93 bc	0,702	2,25	----	----	925,93
62%	13,24 d	1,477	3,50	17,64	31,73	563,70
42%	18,65 c	0,702	24,50	17,20	32,53	388,89
22%	19,74 ab	0,053	74,50	18,15	32,57	203,70
5%	20,16 a	0,131	83,50	17,95	31,15	46,30

Tabela 2 – Temperaturas mínimas e máximas de cada caixa de sombrite utilizada para a obtenção de diferentes irradiâncias. Medidas realizadas diariamente durante o experimento de curva de germinação de *Cyathea delgadii* Sterb.

Dias	62%		42%		22%		5%	
	T °.C	T °.C	T °.C	T °.C	T °.C	T °.C	T °.C	T °.C
	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima
1	21	32	21	34	22	34	21	35
2	21	28	19	25	22	30	15	24
3	20	28	18	31	20	31	18	31
4	18	30	19	26	21	32	19	29
5	19	35	18	36	18	37	18	37
6	17	35	16,5	35	17	35,5	17	36
7	17,7	34	19	32	16	33	18	28
8	19	31	20	32,5	22	34	18	30
9	16	29	18,5	31	19	33	20	32
10	17	27	16	29	18	30	14	26
11	16	32	15	34	17	35	15	29
12	10	31	10	33	11	31	10	31
13	10,5	32	12	33,5	9	29	11	30
14	12	33	11	33	11	34	12	32
15	16	34	14	35	16	32	15	34
16	17	31,5	15	33	16,5	29,5	17	30
17	15,6	32	15	33,5	17,5	30	19	32
18	14	31	13	32	16	32,5	18,5	33
19	15	30	12,5	32,5	14	34	17	33
20	16	31	14,5	32	14,5	33,5	16	32
21	17	30	15	31	15,5	32,5	17	33
22	19	32,5	16	33	18,5	32	19	32
23	22	33	21	35	22	35	21	30
24	21,5	33,5	21	34	21,5	33	20	29,5
25	20,5	33	22	32,5	22,5	32	21	31
26	19,5	34	21,5	33	21	31,5	22,5	30
27	19	33,5	20	34	21,5	32	22	30,5
28	20,5	31,5	21	33	21	32,5	22,5	31
29	21	32	20,5	33,5	21	33	22	31,5
30	21,5	32,5	21	34	22,5	33,5	23	32

A Figura 25 (A-E) mostra o efeito de diferentes irradiâncias na germinação de esporos de *Blechnum brasiliense*. A porcentagem de germinação atingiu aproximadamente 8,5% após 4 dias de cultivo a 100% de irradiância e decaiu gradativamente para zero após 8 dias de cultivo em decorrência da morte dos esporos e gametófitos nessa irradiância. (Figura 25-A). A Figura 25-B mostra o efeito de 62% de irradiância na germinação de esporos de *Blechnum brasiliense*. Após 9 dias de cultivo a porcentagem de germinação atingiu o máximo de 13,75% aproximadamente e decaiu gradativamente para 6% após 19 a 21 dias de cultivo, em decorrência da morte de esporos e gametófitos nessa irradiância. A Figura 25-C mostra que a 42% de irradiância a porcentagem de germinação atingiu o máximo após 18 dias de cultivo, com aproximadamente 36% de esporos germinados. A Figura 25-D apresenta a curva de germinação de esporos de *Blechnum brasiliense* a 22% de irradiância. Nesse tratamento, a máxima porcentagem de germinação (aproximadamente 75%) foi observada pós 12 dias de cultivo, permanecendo estável até o final do experimento. A Figura 25-E mostra a curva de germinação de esporos de *Blechnum brasiliense* a 5% de irradiância. Observa-se que a máxima porcentagem de germinação foi obtida após 17 dias de cultivo (aproximadamente 84%). Durante o início deste experimento os dias eram nublados, mas com decorrer do experimento foram ficando claros (Figura 26), havendo queda da irradiância no 8º dia, devido a mudanças climáticas.

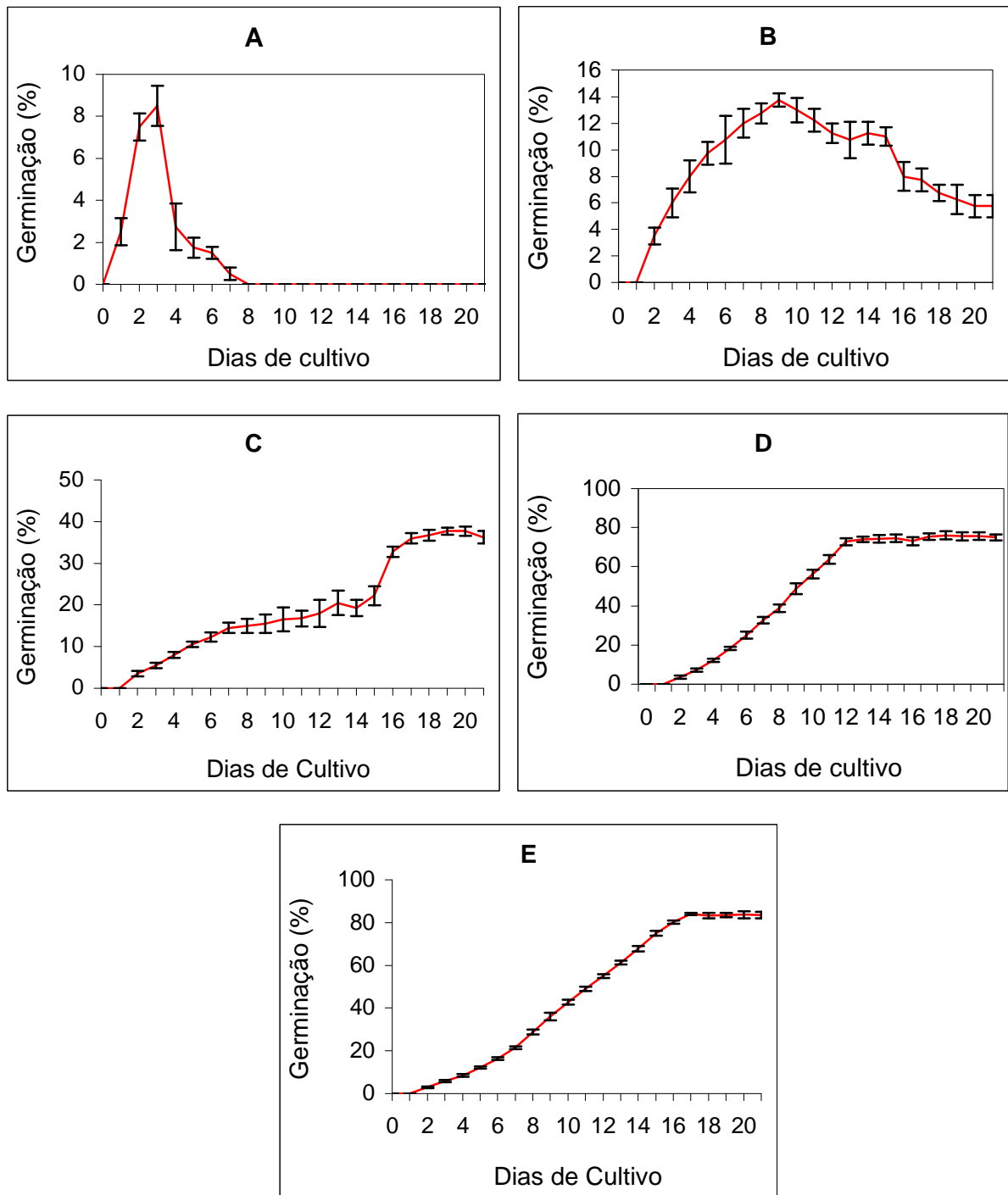


Figura 25 - Curvas de germinação de esporos de *Blechnum brasiliense* Desv. submetidos a diferentes irradiâncias no mês de abril. Irradiâncias: A - 100%, B - 62%, C - 42%, D - 22% e E - 5%. Barras verticais indicam desvios padrões.

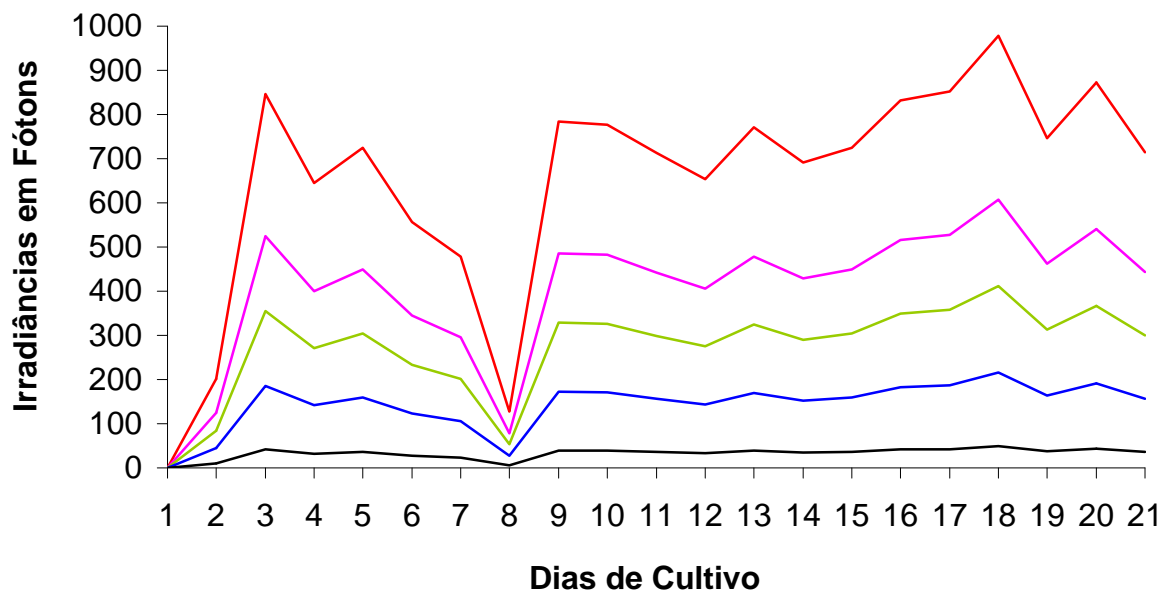


Figura 26 – Gráfico de irradiâncias para as curvas de germinação de *Blechnum brasiliense* Desv., medições em fótons ($\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), por quantômetro LICOR 250, munido de sensor PAR (400 to 700 nm). Irradiâncias: 100% —, 62% —, 42% —, 22% — e 5% —.

A Figura 27 mostra a sobreposição de curvas de germinação a diferentes irradiâncias para esporos de *Blechnum brasiliense*. Até o 3º dia de germinação, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Após o 3º dia de cultivo as maiores porcentagens de germinação foram observadas para 5 e 22% de irradiância que não diferiram entre si apenas no 15º de cultivo. Até o 15º dia de cultivo, as maiores porcentagens de germinação foram observadas a 22% de irradiância. Após o 16º dia de cultivo as maiores porcentagens de germinação foram observadas a 5% de irradiância. Até o 12º dia, as menores porcentagens de germinação foram obtidas a 100, 62% e 42% de irradiância, não diferindo estatisticamente entre si. Porém, após 13 dias de cultivo, as porcentagens de germinação a 100 e 62 % de irradiância não diferiram entre si, mas foram estatisticamente menores do que a porcentagem a 42% de irradiância.

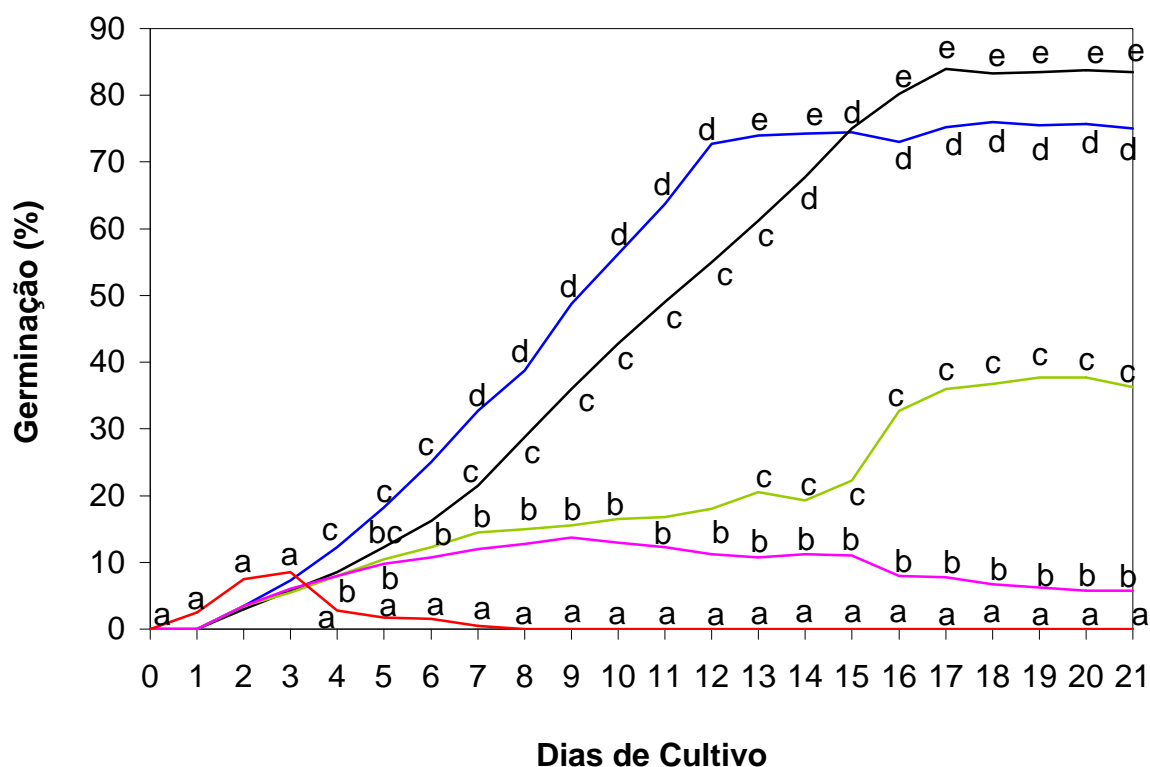


Figura 27 – Efeito de diferentes irradiâncias no mês de abril na germinação de esporos de *Blechnum brasiliense* Desv. Irradiâncias: 100% —, 62% —, 42% —, 22% —, 5% —.

A Tabela 3 mostra que o menor tempo médio de germinação (\bar{t}) de esporos de *Blechnum brasiliense* foi observado a 100% de irradiância. No entanto esse tratamento apresentou uma porcentagem de germinação muito reduzida e culminou com a morte dos esporos e gametófitos. Já, os maiores tempos médios de germinação foram observados a 22 e 5% de germinação, tratamentos que no entanto induziram uma elevada porcentagem de germinação. A tabela 3 mostra também as médias de irradiâncias e as médias mínimas e máximas de temperaturas durante o mês de junho. A tabela 4 mostra as leituras diárias de temperaturas mínimas e máximas realizadas em cada caixa utilizada para a obtenção das diferentes irradiâncias. Nota-se que as temperaturas dentro das caixas praticamente não diferiram durante o período.

Assim como em esporos de *Cyathea delgadii*, as maiores porcentagens de germinação de esporos de *Blechnum brasiliense* ocorreram a 22 e 5% de irradiância. Houve uma forte inibição de germinação a 100, 62 e 42% de irradiância (Figura 26).

Tabela 3 – Tempo médio de germinação, CV, porcentagem final de germinação, temperaturas médias e densidade de fluxo de fótons obtidos para *Blechnum brasiliense* durante o teste do efeito de irradiâncias na germinação.

Irradiâncias	<i>Blechnum brasiliense</i>					
	\bar{t}	C.V.	Porcentagem final de germinação	Médias T °C Mínima	Médias T °C Máxima	Médias Fótons $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
100%	3,99 c	0,220	0,00	16,79	37,14	684,57
62%	7,44 b	0,798	5,75	15,23	28,39	242,44
42%	7,53 b	0,652	36,25	16,36	28,00	287,52
22%	8,36 a	0,072	75,00	16,48	29,00	150,61
5%	8,43 a	0,026	83,50	16,84	28,25	34,23

O efeito de diferentes irradiâncias na germinação de pteridófitas foi também estudado em *Dicksonia sellowiana* Hook. (Filippini *et al.*, 1999). As menores porcentagens de germinação para essa espécie foram observadas em esporos cultivados sob 43 e 2% de irradiância, enquanto os cultivados sob 26, 19 e 4% apresentaram as maiores porcentagens de germinação. Esporos de *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) germinaram sob 72, 54, 17 e 9% de irradiância. Sob 54 e 72% de irradiância total, no mês de Março de 2000, a germinação foi completamente inibida e parcialmente inibida sob 72% de irradiância no mês de Abril. Os menores tempos médio de germinação (\bar{t}) e as maiores porcentagens foram observado sob 9 e 17% de irradiância, nos experimentos realizados em Abril e Agosto de 2000 (Brum & Randi, 2002).

Vários mecanismos poderiam explicar a foto-inibição de germinação causada pelas altas irradiâncias.

Tabela 4 – Temperaturas mínimas e máximas de cada caixa de sombrite utilizada para a obtenção de diferentes irradiâncias. Medidas realizadas diariamente durante o experimento de curva de germinação de *Blechnum brasiliense* Desv.

Dia	100%		62%		42%		22%		5%	
	T °.C	T °.C	T °.C	T °.C	T °.C	T °.C	T °.C	T °.C	T °.C	T °.C
	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima
1	18	25	16	21,5	18,5	24	18	24	18	25
2	18	40	15,5	28	17	29	18	30	19	24,5
3	17,5	40	17,5	29	18	31	17,5	31	18	26
4	17	39,5	18	30	18,5	31	18	30,5	18,5	25,5
5	18,5	40	19	31	17	30	16,5	30	18	26,5
6	19	39,5	17,5	29,5	17,5	29	17	28	19	27
7	18	38	17	30	18	30	18	32	17,5	26
8	17,5	38,5	16,5	30	17,5	31	17,5	31,5	16	26,5
9	18	39	15	31,5	14,5	30	15	32,5	14	24,5
10	17,5	40	14,5	30	15	31,5	14,5	31,5	15,5	25
11	18	40,5	15	32	15,5	30	16,5	29	16	26
12	17,5	40	14	30,5	17	29	17	30,5	16,5	26,5
13	16,5	39,5	15,5	31	16,5	28	18	28,5	17	25,5
14	17	40	14	30,5	17	28,5	18,5	29	18	27
15	16,5	39,5	14,5	31	18	28,5	18	28,5	19	28
16	16	38	15,5	30	17,5	29,5	17,5	29	18,5	27,5
17	17	39	16	29,5	18	28	17	30,5	18	27
18	17,5	40	15,5	30	16,5	30	18,5	30	18,5	28
19	18	40	16,5	30,5	17	29,5	16	28	18	28,5
20	18,5	41	17	30	17,5	30	17,5	28,5	18,5	29
21	18	40	15	29	18	28,5	18	29	19	29,5

A foto-inibição de germinação foi também verificada para algumas sementes de angiospermas que podem ter sua germinação inibida por exposições prolongadas à luz, principalmente se a fluência for alta. A foto-inibição da germinação de sementes é uma manifestação de reações de alta irradiância (RAI), de acordo com Bewley & Black (1994) que sugerem que a foto-inibição da germinação seja um mecanismo que evita a germinação sob alta irradiância no campo, onde a plântula pode se tornar susceptível a condições extremas de altas temperaturas e secas. Shinomura *et al.* (1996) explicam que a germinação de sementes sensíveis à luz é uma resposta de baixa fluência (RBF) controlada pela detecção de mudanças

na taxa vermelho e vermelho-extremo (V/Ve) através do fitocromo B (Phy B). Um comportamento semelhante pode ser proposto para a germinação de esporos de pteridófitas, que poderia garantir o crescimento do gametófito e sua fecundação apenas em condições adequadas com abundante suprimento de água, baixa irradiância e temperaturas amenas (Brum & Randi, 2002).

Os níveis elevados de luz UV e luz azul na luz solar plena e nos menores sombreamentos poderiam ser uma das possibilidades para explicar o efeito das altas irradiâncias na foto-inibição. Sugai *et al.* (1984) trabalhando com esporos de *Pteris vittata* L. e Sugai & Furuya (1985), trabalhando com esporos de *Adiantum capillus-veneris*, observaram uma inibição da germinação promovida pela luz vermelha após aplicação subsequente de luz azul a esporos de samambaias. A luz azul constante ou fornecida a esporos de *Cyathea delgadii*, por períodos de 24, 48 ou 120 horas aplicados após 48 horas de embebição no escuro inibiu a germinação. O espectro fotoacústico mostrou que tanto paredes quanto esporos intactos de *Cyathea delgadii* absorvem certa quantidade de luz azul, como foi observado por Randi & Felipe (1988c), confirmando o que foi observado por Sugai *et al.* (1984) e Sugai & Furuya (1985). Trabalhando com esporos de *Adiantum capillus-veneris* L., Furuya *et al.* (1997), concluem que durante a germinação a primeira mitose que produz uma divisão assimétrica originando uma célula rizoidal e uma célula protonemal é induzida pela luz vermelha através da ação do fitocromo Fve. Essa mitose induzida pela luz vermelha é inibida reversivelmente pelo vermelho-extremo (VE) e irreversivelmente pela irradiação com luz azul ou UV longo. Entretanto, nem a luz azul e nem o VE inibiram a germinação quando os esporos foram irradiados após o início da primeira mitose. A primeira mitose parece ser um passo crucial da foto-indução na germinação de esporos. Por outro lado, observam que o fitocromo Fve induz a primeira mitose, mas a próxima mitose que origina o crescimento do protalo é induzida pelo receptor de luz azul e inibida pela luz vermelha.

A foto-inibição sob altas irradiâncias pode ter sido também influenciada pelo aquecimento do meio de cultura nos tratamentos de luz solar plena. As temperaturas exercem influência sobre os efeitos da luz na germinação de esporos de pteridófitas. Chen *et al.* (1979) observaram que a fase de pré-indução é sensível à temperatura. Tratamentos de 40° C durante 8 horas ou mais, reduzem o desenvolvimento da fotossensibilidade para um nível muito baixo, o que pode ser revertido pela incubação no escuro à 25° C. Temperaturas inferiores a 25° C exercem menor inibição nas fases de pré-indução, e a 30 e 35° C ocorre um estímulo da germinação nos esporos de *Onoclea sensibilis* L. Reynolds (1982) observou que sob altas

temperaturas os esporos de *Sphareopteris cooperi* sofreram inibição da germinação durante a fase da fosforilação oxidativa da respiração. Haupt (1990, 1991, 1992) estudando a inibição da germinação dos esporos de *Dryopteris paleacea* (Sw.) Hand.-Mazz. causada por elevadas temperaturas, observou que aumentos da temperatura para 27^o C e 32^o C causaram inibição tanto na fase de pré-indução, durante a qual ocorre a hidratação das moléculas do fitocromo, quanto da fase de tradução de sinais mediada pelo fitocromo Fve (fitocromo vermelho extremo). Porém, as altas temperaturas não devem ter causado a foto-inibição, quando os esporos germinaram dentro das caixas de sombrite que forneceram as maiores intensidades luminosas, pois como mostram as Tabelas 2 e 4, as temperaturas mínimas e máximas dentro dessas caixas praticamente não diferiram do observado para as demais caixas.

Outro processo observado durante esse trabalho foi a alteração de coloração de gametófitos oriundos da germinação de esporos de *Cyathea delgadii* sob luz solar plena e sob irradiâncias de 62% e 42%. Inicialmente, houve uma baixa porcentagem de germinação nesses tratamentos pois os dias estavam bastante nublados, o que reduziu drasticamente a irradiância (Figura 23). No decorrer do experimento, os dias tornaram-se ensolarados, o que propiciou uma alta incidência de fótons a pleno sol e sob 62% e 42% de irradiância. Esses fatores aparentemente causaram uma oxidação das clorofilas das células protonemais, o que possivelmente causou a morte dos gametófitos. O mesmo fenômeno foi observado para gametófitos de *Blechnum brasiliense*, oriundos de esporos germinados a pleno sol e a 62% de irradiância. É preciso ressaltar que os testes com *Cyathea delgadii* foram realizados no mês de abril. Já, os testes com *Blechnum brasiliense* foram realizados no mês de junho.

4.4 – Aspectos morfológicos dos gametófitos

As Figuras 28 a 31 mostram aspectos de gametófitos das 4 espécies estudadas. Os gametófitos de *Blechnum brasiliense* e *Cyathea corcovadensis* foram cultivados durante 105 dias e os de *Cyathea delgadii* e *Saccoloma inaequale* durante 133 dias.

A Figura 28 mostra aspectos de gametófitos de *Blechnum brasiliense*. As imagens das Figuras 28A a 28D foram obtidas a partir de material fresco. Os gametófitos são cordiformes (Figura 28A). Ocorrem muitos tricomas dispostos nas margens (Figuras 28B e 28C) e sobre a lâmina (Figura 28D), em ambas faces do gametófito. Estes tricomas são glandulares, uni ou bicelulares, e mostram secreções nos ápices. Por vezes, nas observações em material sem uso de reagentes químicos, constatou-se a presença de conteúdo de coloração avermelhada, na região apical dos tricomas, possivelmente devido à deposição de antocianinas. Em microscopia eletrônica de varredura (Figura 28E), constata-se a presença de poros no ápice dos tricomas, indicando assim a natureza secretora destas estruturas. As células da lâmina dos gametófitos, são alongadas, altamente vacuolizadas e ricas em cloroplastos, apresentando-se com aspecto convexo, quando em vista frontal (Figura 28B).

Na Figura 29 são apresentados aspectos de gametófitos de *Cyathea corcovadensis*. As imagens das Figuras 29A a 29D foram obtidas a partir de material fresco. Os gametófitos são cordiformes (Figura 29A). Ocorrem tricomas dispostos nas margens (Figuras 29B, 29C e 29D) e sobre a lâmina, em ambas faces do gametófito. Estes tricomas são glandulares, uni ou bicelulares, sendo geralmente bem evidente a parede celular, que define o limite entre uma célula basal, mais curta, e uma célula apical, mais alongada (Figura 29D). Cabe ressaltar que esta constituição bicelular só é observada, em microscópio óptico, com aumento de pelo menos 400 vezes. Em microscopia eletrônica de varredura, os tricomas apresentaram-se muito colapsados (Figura 29E). As amostras desta espécie foram preparadas da mesma forma que as amostras de *Blechnum brasiliense*, portanto provavelmente o colapso deve ser decorrente da grande fragilidade estrutural desta espécie em relação a anterior. As células da lâmina dos gametófitos, são alongadas, altamente vacuolizadas e ricas em cloroplastos (Figuras 29B, 29C e 29D).

Aspectos dos gametófitos de *Cyathea delgadii* são mostrados na Figura 30. Os tricomas estão dispostos nas margens (Figuras 30B, 30C e 30D) e sobre a lâmina, em ambas faces do gametófito. Estes tricomas são unicelulares, contendo secreção na região apical, portanto são

glandulares. Usando tionina constatou-se reação positiva à presença de mucilagem (cor rosada) nos ápices dos tricomas (Figura 30C). Em microscopia eletrônica de varredura (Figura 30E), destaca-se uma aréola correspondendo ao limite entre a célula que constitui o tricoma e a célula da lâmina do gametófito que originou este tricoma. As células da lâmina são mais isodiamétricas do que nas outras espécies, apresentando-se bastante vacuolizadas e ricas em cloroplastos. Nas paredes destas células, o uso de tionina também revelou presença de mucilagem.

Na Figura 31 são apresentados aspectos de gametófitos de *Saccoloma inaequale*. As imagens das Figuras 31A a 31D foram obtidas a partir de material fresco. Os gametófitos são cordiformes (Figura 31A). Ocorrem tricomas dispostos nas margens (Figuras 31B, 31C e 31D) e sobre a lâmina (Figura 31B), em ambas faces do gametófito. Estes tricomas são glandulares, uni ou bicelulares, sendo geralmente bem evidente a parede celular, que define o limite entre uma célula basal, mais curta, e uma célula apical, mais alongada (Figura 31C). Esta constituição bicelular só é observada, em microscópio óptico, com aumento de pelo menos 400 vezes. Observações em microscopia óptica, sem uso de reagentes, revelam que a secreção localiza-se entre a parede celular e a cutícula, no ápice dos tricomas (Figura 31D). Ressalta-se que a cutícula é extremamente frágil, sendo de difícil preservação durante a preparação do material para análise microscópica. Em microscopia eletrônica de varredura (Figura 31E), constata-se a presença de poros no ápice dos tricomas, indicando assim a natureza secretora destas estruturas. As células da lâmina são isodiamétricas, vacuolizadas e ricas em cloroplastos.

A presença de tricomas apresentando secreções mucilaginosas nos ápices, é comum para muitas espécies de pteridófitas. Por exemplo, gametófitos cordiformes de *Woodwardia radicans* (L.) Sm. apresentam tricomas papilados marginais (Carafa, 1990). Já, para três espécies de *Mohria* Sw. estudadas em microscopia eletrônica de varredura: *M. caffrorum* (L.) Desv., *M. marginalis* (Sav.) J.P. e *M. vestita* Bak, Roux (1993) afirma que podem ocorrer tricomas constituídos de 1 a 3 células. A espécie *Thelypteris rhachiflexuosa* Riba apresenta tricomas unicelulares curtos, com secreção mucilaginosa no ápice (Pérez-García *et al.*, 1994). A presença de tricomas não parece estar relacionada a famílias ou mesmo a gêneros, visto que tricomas aparecem também em *Blechnum cycadifolium* (Colla) Sturm., porém estão ausentes em *Blechnum chilense* (Kaulf.) Mett. (Pérez-García *et al.*, 1996). Tricomas unicelulares capitados, papilados e marginais, são observados em *Thyrsopteris*

elegans Kze. (Pérez-García *et al.*, 1996-1997). *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger apresentam tricomas unicelulares, papilados, comuns às samambaias mais derivadas, nas margens e em ambas as superfícies (Jaramillo *et al.*, 1996). *Microgramma nitida* (J. Sm.) A. R. Sm. apresenta tricomas translúcidos, unicelulares, capitados, marginais e superficiais. Os superficiais são observados apenas na superfície ventral do gametófito (Ramírez & Pérez-García, 1998). Três espécies do gênero *Phlebodium* (R.Br.) J. Sm. estudadas, apresentam gametófitos com tricomas glandulares capitados e unicelulares localizados nas margens e na superfície: *P. araneosum* (M.Martens e Galeotti) Mickel e Beitel, *P. pseudoaureum* (Cav.)Lellinger e *P. decumanum* (Willd.)J. Sm. (Pérez-García *et al.*, 1998). Seis espécies do gênero *Dryopteris* Adans. – *D. cinnamomea* (Cav.)C. Chr., *D. karwinskyana* (Mett.) Kuntze, *D. maxonii* Underw. & C. Chr., *D. munchii* A.R. Sm., *D. rossi* C.Chr. e *D. wallichiana* (Spreng.) Alston & Bonner – apresentam tricomas unicelulares, marginais e superficiais (Pérez-García *et al.*, 1999). Gametófitos de *Arachniodes denticulata* (Sw.) Ching possuem abundantes tricomas unicelulares, longos, capitados e distribuídos tanto na margem como na superfície da lâmina (Mendoza *et al.*,1999). Outras seis espécies de *Dryopteris* – *D. arguta* (Kaulf.) Maxon, *D. futura* A.R. Sm., *D. nubigena* Maxon & C.V. Morton, *D. patula* (Sw.) Underw., *D. pseudofilix-mas* (Fée) Rothm. e *D. rosea* (E. Fourn.) Mickel & Beitel – estudadas por Pérez-García *et al.* (2001), apresentam tricomas unicelulares, marginais e superficiais.

No presente trabalho foram observados, em gametófitos de três espécies – *Blechnum brasiliense*, *Cyathea corcovadensis* e *Saccoloma inaequale*, tricomas constituídos por mais de uma célula. No entanto, a presença de tricomas com mais de uma célula não foi constatado para *Cyathea delgadii*. Tal fato pode ser decorrente da qualidade de resolução óptica e/ou de preparação do material, pois observamos que muitas vezes é difícil a percepção da divisão entre as duas células. Portanto, não se descarta a possibilidade de *C. delgadii* também apresentar tricomas bicelulares, como talvez também tenha ocorrido nas constatações feitas por outros pesquisadores para outras espécies.

Tricomas glandulares foram observados nas quatro espécies estudadas neste trabalho. Nada há na literatura com referência à função desses tricomas em pteridófitas. Constatou-se que, em *Cyathea delgadii*, os tricomas glandulares secretam mucilagens. A mucilagem é substância freqüente em plantas de regiões áridas, com função de reter água, evitando a desidratação da planta, (Mauseth, 1988). Em gametófitos de pteridófitas, exigentes de altos

níveis de água, a presença de mucilagem poderia assegurar proteção contra a desidratação durante períodos de estiagem, em seu ambiente de origem. A presença de mucilagem é descrita, na literatura, para plantas xéricas, como alternativa de diminuir a perda hídrica. Essa secreção também é encontrada em plantas aquáticas, mas com uma função contrária. Sculthorpe (1967) refere que a presença de mucilagem em plantas aquáticas impede a entrada excessiva de água, diminuindo a diferença de potenciais hídricos entre o meio externo e interno e, assim, diminuindo a velocidade de entrada de água no vegetal. Mucilagens atuariam como um agente osmótico, aprisionando e retendo água nos gametófitos.

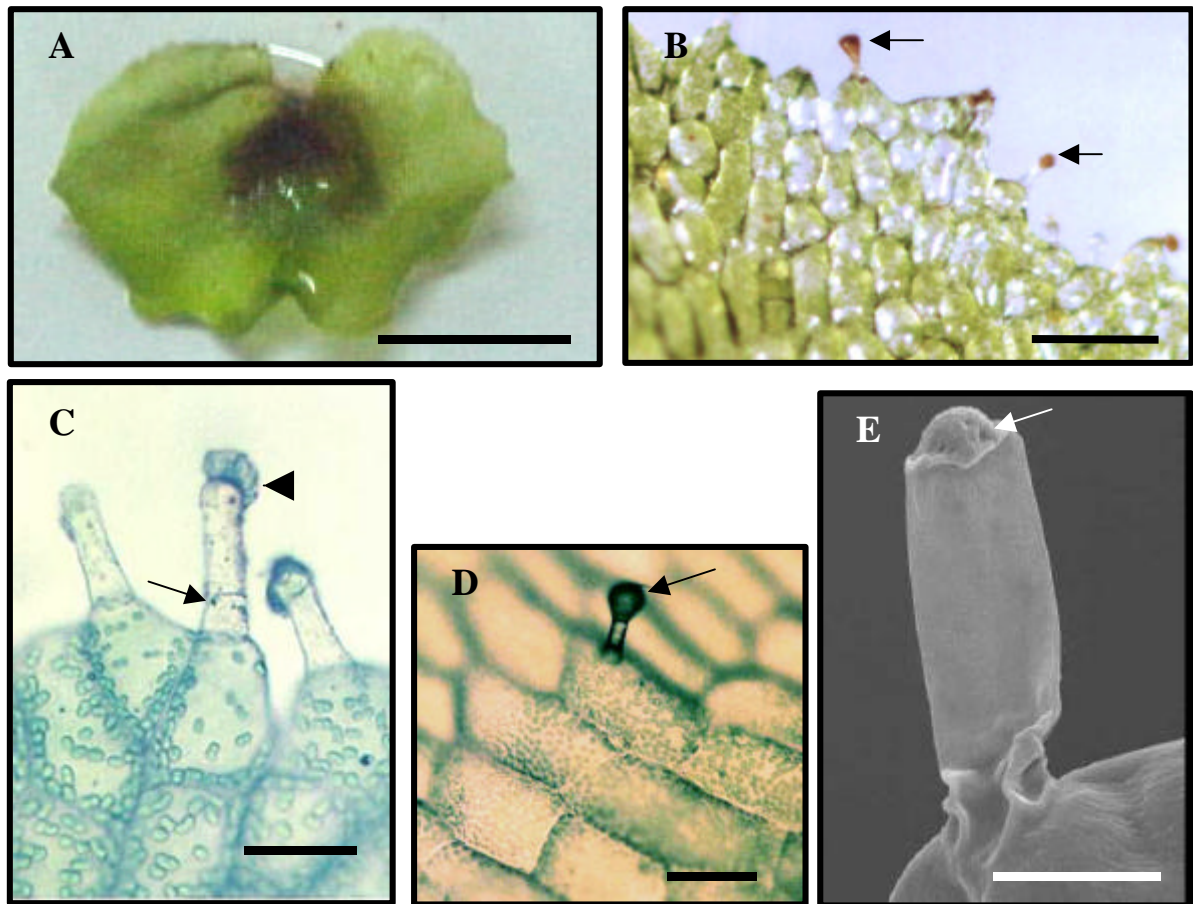


Figura 28 – Gametófitos de *Blechnum brasiliense* Desv. com 133 dias. 28-A: Gametófito na forma cordiforme. Barra: 0,5 cm. 28-B: Células convexas e tricomas glandulares (setas), com provável presença de antocianinas, ao fotomicroscópio estereoscópico (110x). Barra: 200 μm . 28-C: Tricomas glandulares marginais, com secreção nos ápices (cabeça de seta) e um tricoma bicelular, evidenciando a parede entre as duas células (seta), ao microscópio óptico (200x). Barra: 50 μm . 28-D: Tricoma glandular (seta) laminar, ao microscópio óptico (100x). Barra: 100 μm . 28-E: Tricoma glandular, com poros na superfície do ápice (seta), em microscopia eletrônica de varredura (1000x). Barra: 20 μm .

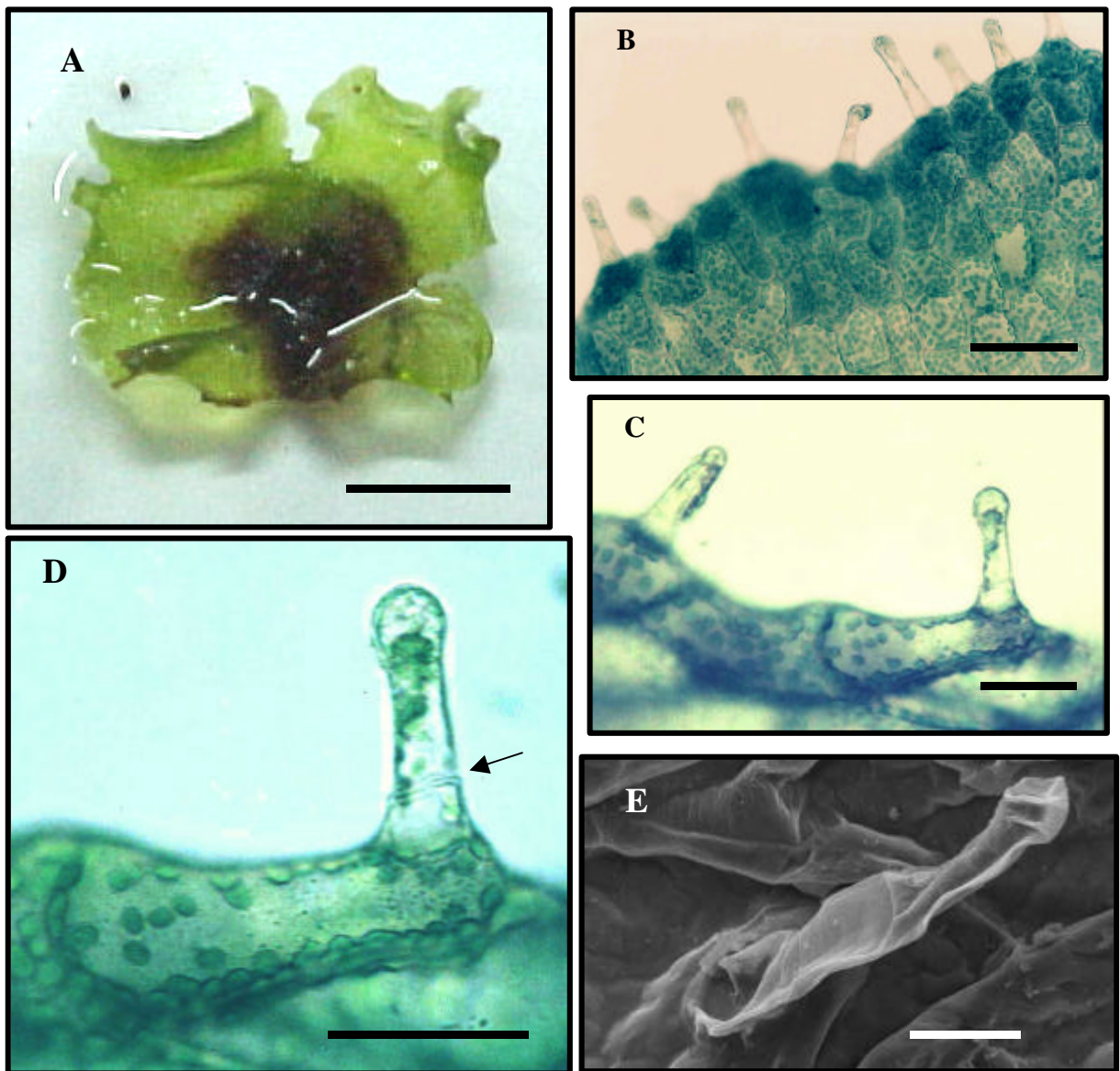


Figura 29 – Gametófitos de *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin. com 105 dias. 29-A: Gametófito na forma cordiforme. Barra: 0,5 cm. 29-B: Tricomas glandulares marginais, ao microscópio óptico (200x). Barra: 100 μm . 29-C: Células marginais com formato abaulado e tricomas glandulares, ao microscópio óptico (200x). Barra: 50 μm . 29-D: Tricoma glandular bicelular, evidenciando a parede entre as duas células (seta), ao microscópio óptico (400x). Barra: 50 μm . 29-E: Tricoma glandular, em microscopia eletrônica de varredura (1000x). Barra: 20 μm .

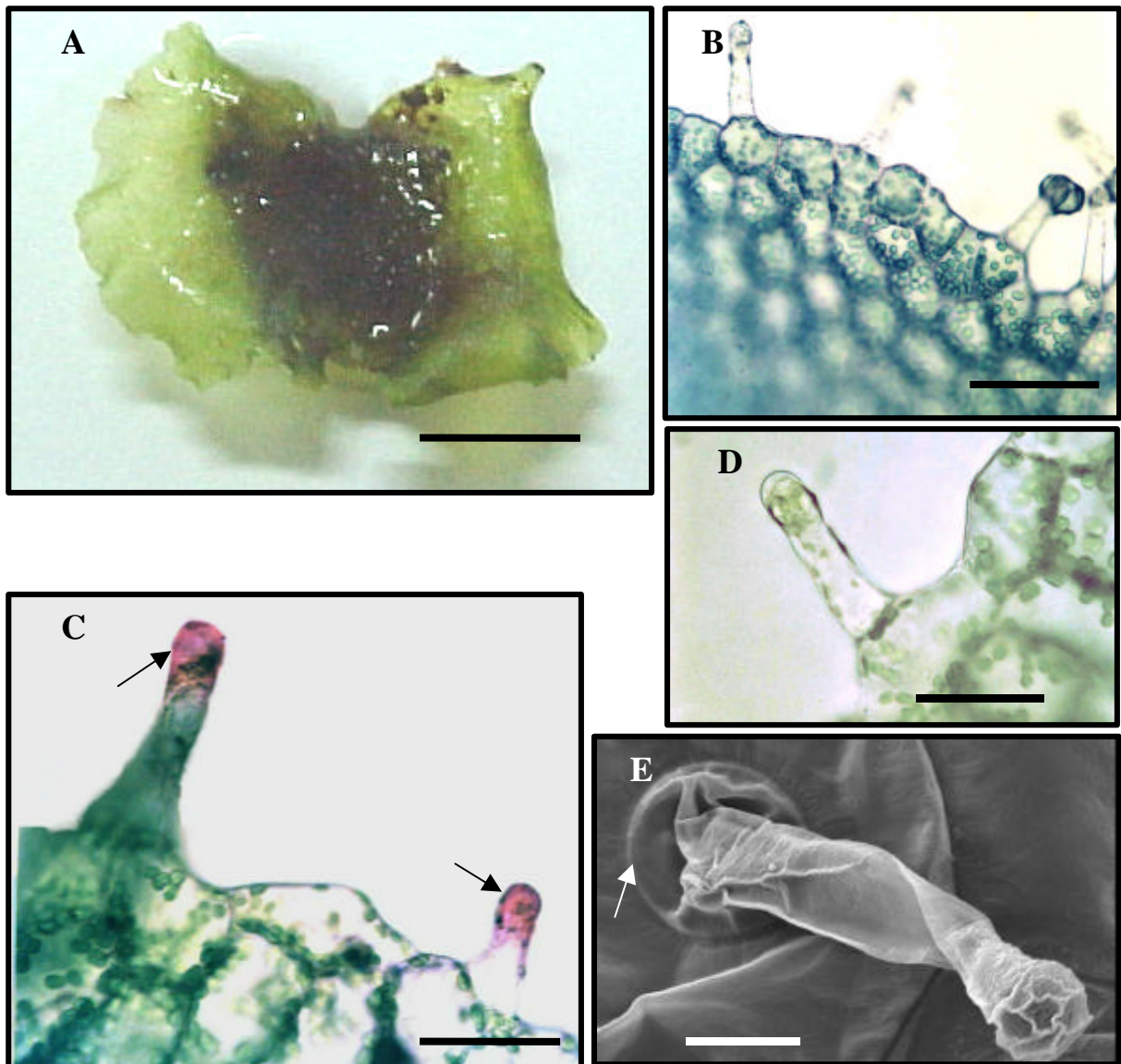


Figura 30 – Gametófitos de *Cyathea delgadii* Sternb. gametófitos com 133 dias. 30-A: Gametófito na forma cordiforme. Barra: 0,5 cm. 30-B: Tricomas glandulares marginais, ao microscópio óptico (200x). Barra: 100 μm . 30-C: Tricoma com mucilagem evidenciada por reação com tionina (setas), ao microscópio óptico (400x). Barra: 50 μm . 30-D: Tricoma glandular marginal, ao microscópio óptico (400x). Barra: 50 μm . 30-E: Tricoma glandular, em microscopia eletrônica de varredura (1000x). Seta indica limite entre tricoma e célula da lâmina. Barra: 20 μm .

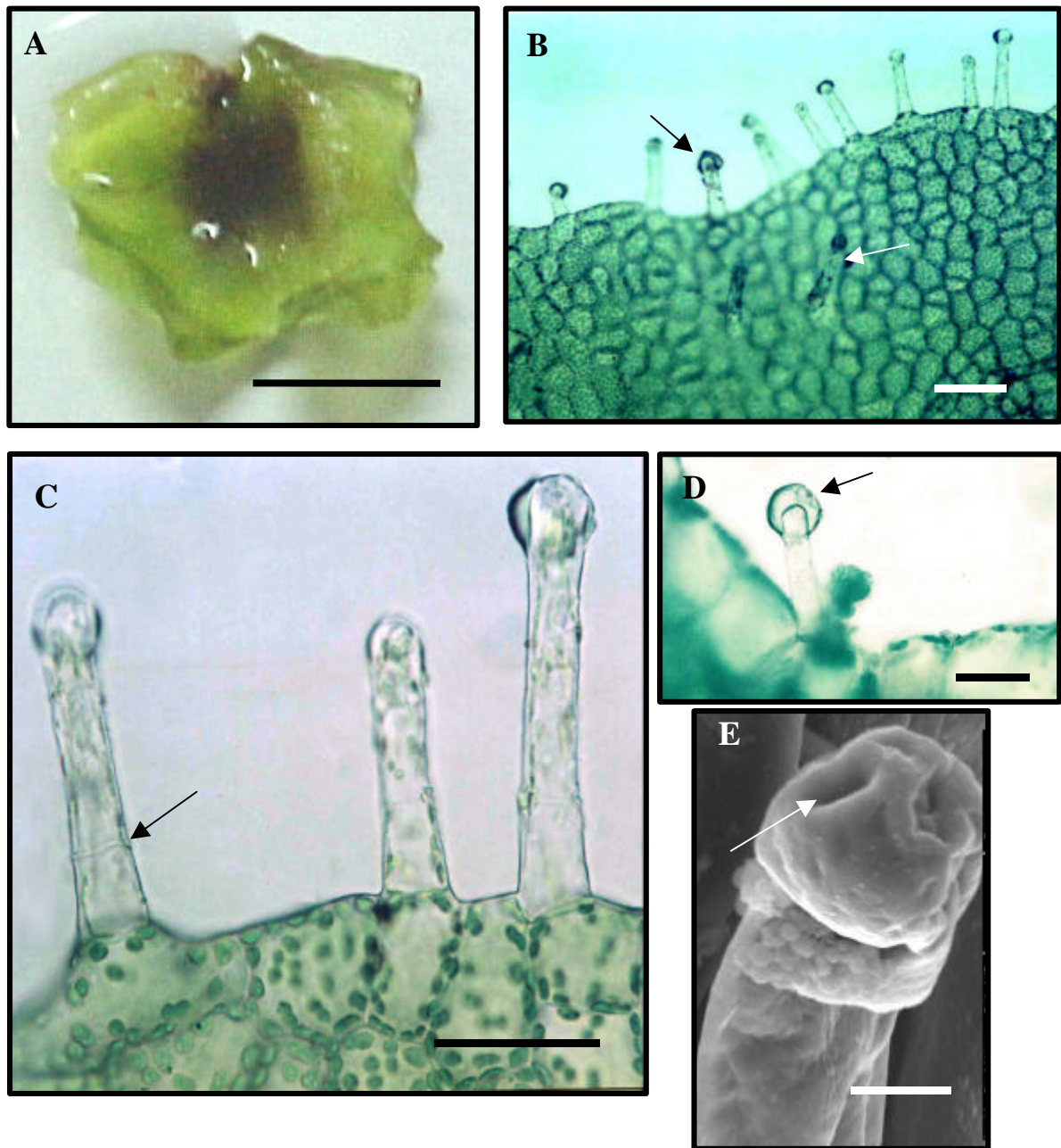


Figura 31 – Gametófitos de *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett com 133 dias. 31-A: Gametófito na forma cordiforme. Barra: 0,5 cm. 31-B: Inúmeros tricomas glandulares, marginais (seta preta) e laminares (seta branca), ao microscópio óptico (100x). Barra: 100 μ m. 31-C: Tricomas glandulares bicelulares marginais, evidenciando a parede entre as duas células (seta), ao microscópio óptico (400x). Barra: 50 μ m. 31-D: Tricoma glandular marginal com secreção no ápice (seta), ao microscópio óptico (200x). Barra: 50 μ m. 31-E: Ápice de um tricoma glandular, evidenciando poros, em microscopia eletrônica de varredura (4000x). Barra: 5 μ m.

4.5 – Curvas de fecundação de gametófitos

A Figura 32 mostra a curva de fecundação de gametófitos de *Blechnum brasiliense*. Os primeiros esporófitos começaram a ser observados após 86 dias de cultivo. Após 303 dias de cultivo, 91,5% dos gametófitos produziram esporófitos. A Figura 36 mostra aspectos de gametófitos e esporófitos.

A Figura 33 mostra a curva de fecundação de gametófitos de *Cyathea corcovadensis*. Os primeiros esporófitos foram observados após 117 dias de cultivo. Aos 264 dias de cultivo, 35,83% dos gametófitos haviam passado para a fase esporofítica. A Figura 37 mostra aspectos de gametófitos e esporófitos.

A Figura 34 apresenta a curva de fecundação de gametófitos de *Cyathea delgadii*. Os primeiros esporófitos começaram a ser observados após 109 dias de cultivo e após 249 dias, 79,16% dos gametófitos haviam produzido esporófitos. A Figura 38 mostra aspectos de gametófitos e esporófitos.

A Figura 35 apresenta os resultados da curva de fecundação de gametófitos de *Saccoloma inaequale*. Os primeiros esporófitos começaram a ser observados após 78 dias de cultivo. Depois de 295 dias, apenas 48,39% dos gametófitos produziram esporófitos. A Figura 39 mostra aspectos de gametófitos e esporófitos.

As duas espécies de *Cyathea* parecem apresentar um início de fecundação mais tardio do que as duas espécies de herbáceas, também estudadas neste trabalho, *Blechnum brasiliense* e *Saccoloma inaequale*. Quando os experimentos foram interrompidos os gametófitos de todas as espécies, que ainda não haviam formado esporófitos, aparentavam vigor, o que indica a potencialidade para formar esporófitos. De acordo com Sakamaki & Ino (1999), os esporófitos em muitos gametófitos de *Thelypteris palustris* (Salisb.) Schott que atingem um certo tamanho. Este é interpretado como sendo um tamanho crítico de gametófitos para a produção de esporófitos. Após a formação de esporófitos, os gametófitos a eles unidos cessam o crescimento em massa seca, mas os gametófitos que não produzem esporófitos continuam a crescer. Tal fato ficou bastante evidenciado neste trabalho para a espécie *Saccoloma inaequale*.

Vários autores analisaram o tempo de aparecimento dos esporófitos. Pérez-Garcia *et al.* (1994), estudando *Metaxya rostrata* (Kunth) C. Presl. (Metaxyaceae) observaram que o tempo de germinação e de 30 a 32 dias, o aparecimento de gametófitos maduros ocorreu após 112 dias e não houve formação de esporófitos após 8 meses de estudo. Pérez-Garcia *et al.* (1994)

estudando a espécie *Lygodium heterodoxum* Kunze (Schizaeaceae) verificaram que a mesma germinava a partir dos 6 a 8 dias, os gametófitos maduros apareciam entre 36 a 80 dias e o aparecimento dos esporófitos ocorria após 2,8 meses. Pérez-Garcia *et al.* (1995), estudando *Lophosoria quadripinnata* (J.F. Gmel.) C. Chr. (Lophosoraceae) verificaram que esta espécie germina após 8 a 10 dias de cultivo, o aparecimento de gametófitos maduros ocorre após 270 a 280 dias e após 36 meses ocorre o aparecimento de esporófitos. Jaramillo *et al.* (1996), estudando *Niphyidium crassifolium* (Polypodiaceae) verificaram que a germinação ocorre que após 10 dias e após 70 dias de cultivo ocorreu o aparecimento de gametófitos maduros sendo que após 3 meses surgem os esporófitos. Pérez-Garcia *et al.* (1997), estudando *Thyrsopteris elegans* Kunze (Thyrsopteridaceae) observaram que o tempo de germinação é de 20-25 dias, o aparecimento de gametófitos maduros ocorreu após 100 a 120 dias e após 6 a 7 meses apareceram os esporófitos. Ramirez *et al.* (1998), estudando *Microgramma nítida* (J. Sm.) A.R. Sm. (Polypodiaceae) verificaram que a germinação ocorre após 6 a 10 dias, após 80 dias aparecem gametófitos maduros e após 8 meses surgem os esporófitos. Pérez-Garcia *et al.* (1998), estudando três espécies da família Polypodiaceae (*Phlebodium araneosum* (M. Martens & Galeotti) Mickel & Beitel, *P. pseudoaureum* (Cav.) Lellinger e *P. decumanum* (Willd.) J. Sm.) observaram que estas germinaram após 7 a 15 dias, o aparecimento de gametófitos maduros ocorreu após 60 a 120 dias e os esporófitos apareceram respectivamente após 5,19 e 3 meses de cultivo. Mendoza *et al.* (1999) estudando *Didymochlaena trucatula* (Sw.) J. Sm. (Dryopteridaceae) observaram que esta espécie germinava após 5 a 8 dias, o aparecimento de gametófitos maduros ocorria após 45 a 50 dias e os esporófitos apareciam a partir de 3 a 4 meses.

De acordo com Suzuki (2003), que utilizou o mesmo solo usado neste trabalho, os esporófitos em *D. sellowiana* Hook., começaram a formar-se após 84 dias de cultivo e aos 259 dias de cultivo, 84,67% dos gametófitos já haviam formado esporófitos.

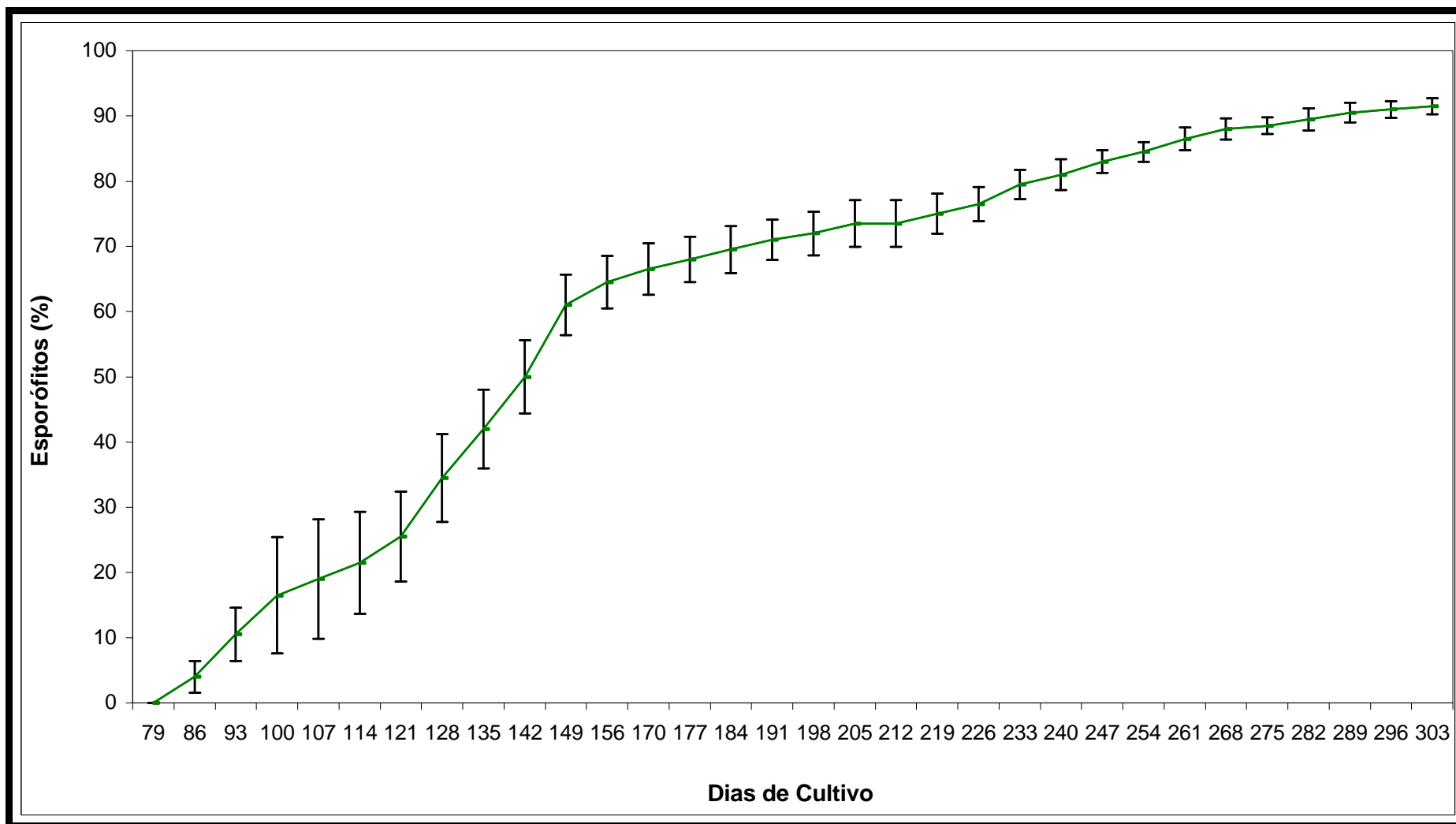


Figura 32 - Curva de fecundação para gametófitos de *Blechnum brasiliense* Desv. cultivados em bandejas transparentes de polietileno 12 x 9 cm, em sala de cultivo $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

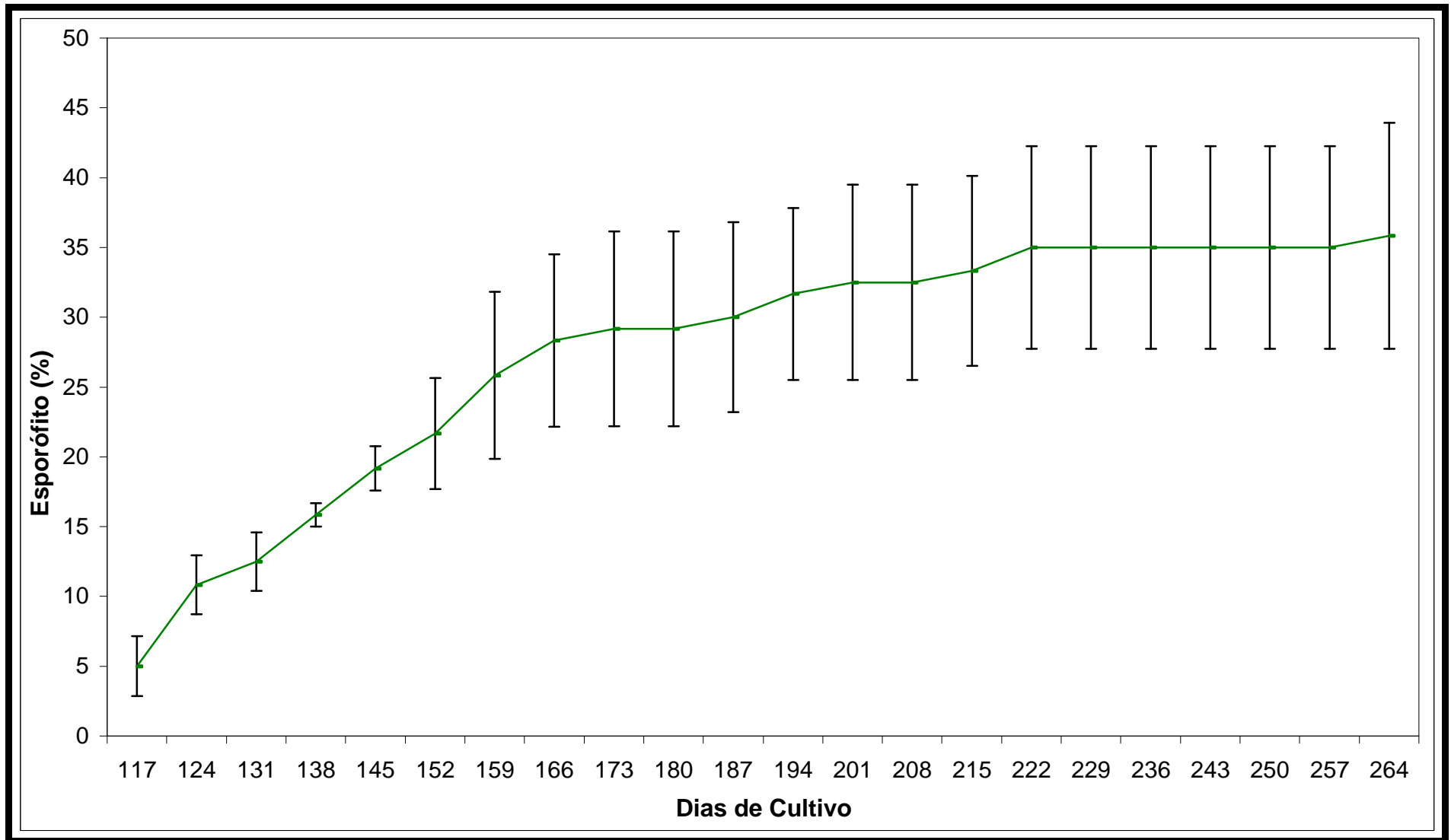


Figura 33 - Curva de fecundação para gametófitos de *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin, cultivados em bandejas transparentes de polietileno 12 x 9 cm, em sala de cultivo $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

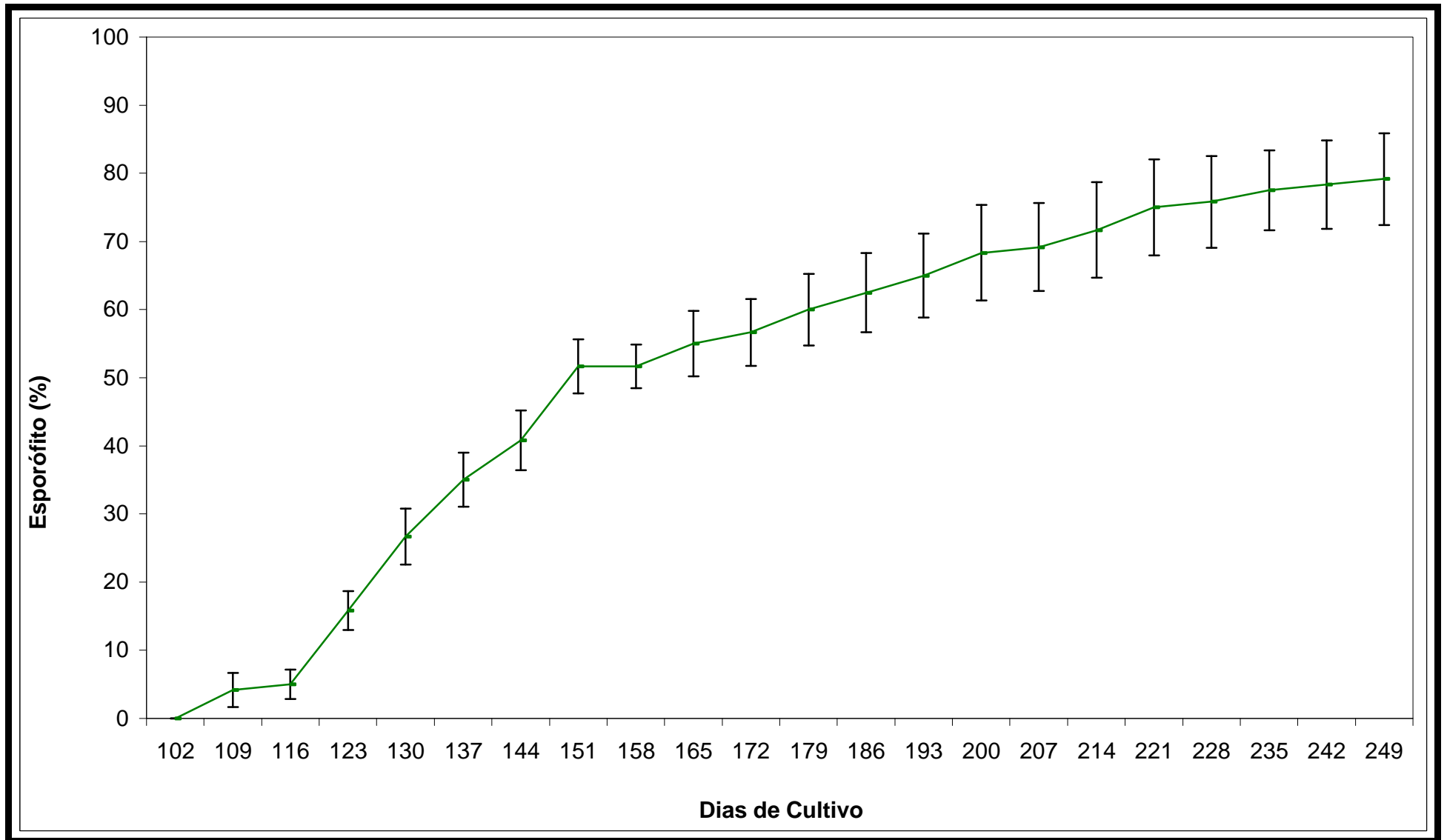


Figura 34 - Curva de fecundação para gametófitos de *Cyathea delgadii* Sternb., cultivados em bandejas transparentes de polietileno 12 x 9 cm, em sala de cultivo $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

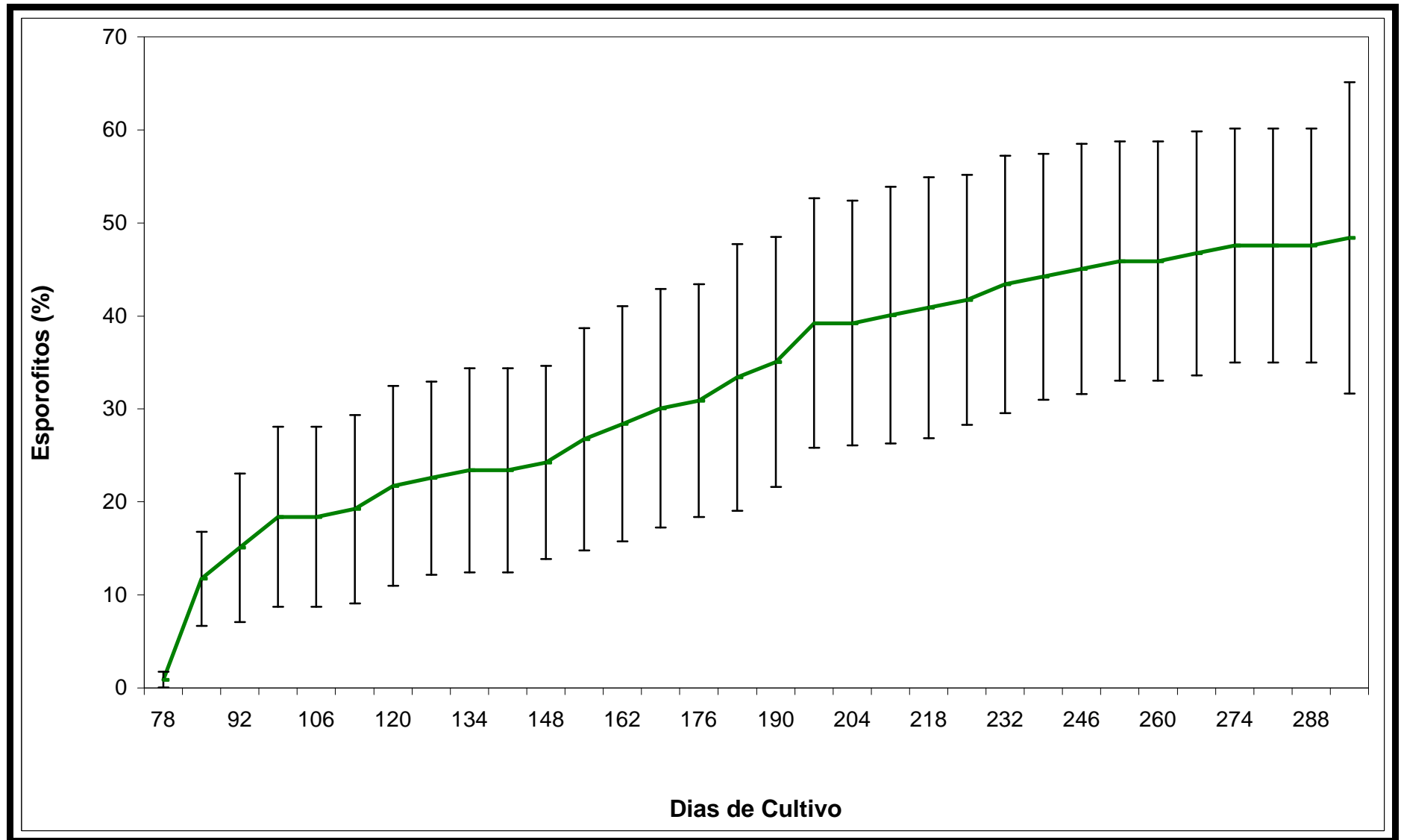


Figura 35 - Curva de fecundação para gametófitos de *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett, cultivados em bandejas transparentes de polietileno 12 x 9 cm, em sala de cultivo $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

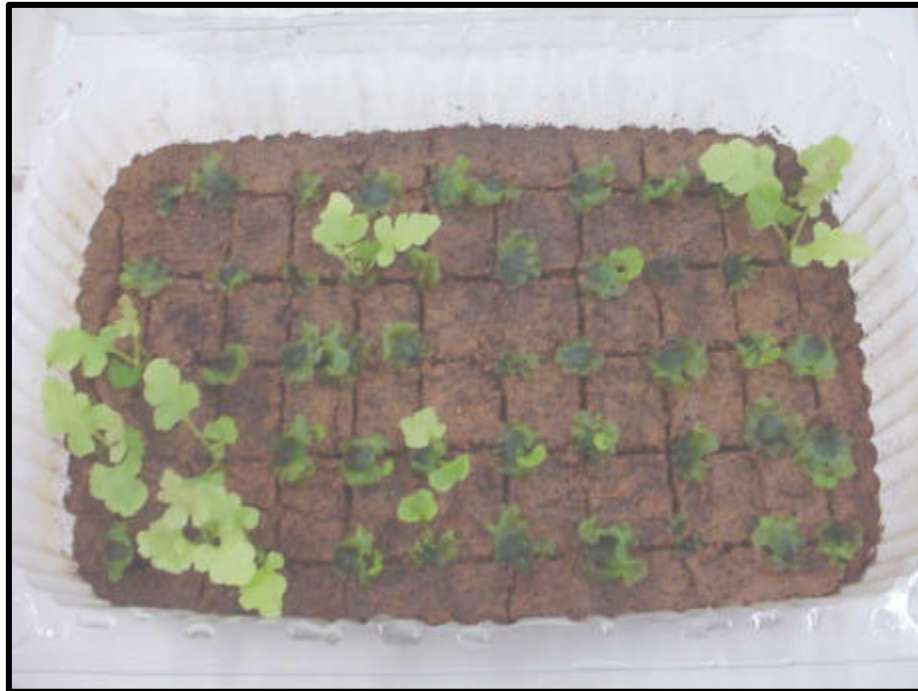


Figura 36 – Gametófitos e esporófitos de *Blechnum brasiliense* Desv. cultivados em bandejas de polipropileno, mantidos em sala de cultivo a $20 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.



Figura 37 – Gametófitos e esporófitos de *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin. cultivados em bandejas de polipropileno, mantidos em sala de cultivo a $20 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.



Figura 38 – Gametófitos e esporófitos de *Cyathea delgadii* Sternb. cultivados em bandejas de polipropileno, mantidos em sala de cultivo a $20 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.



Figura 39 – Gametófitos de *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett. cultivados em bandejas de polipropileno, mantidos em sala de cultivo a $20 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

4.6 – Análise de crescimento

Para as quatro espécies estudadas neste experimento houve diferença estatisticamente significativa a 99% de probabilidade, entre a altura das maiores frondes no tempo 1 e após 60 dias de cultivo (tempo 2) como mostram as Tabelas 5 e 6. Com relação ao número de frondes de *Blechnum brasiliense*, *Cyathea delgadii* e *Saccoloma inaequale*, houve diferença estatisticamente significativa entre o tempo 1 e o tempo 2. No entanto para a espécie *Cyathea corcovadensis* não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de fronde no tempo 1 e no tempo 2, a 99% de probabilidade, de acordo com o teste t.

A Tabela 7 mostra as taxas de crescimento relativo baseadas na altura da fronde maior. Essas taxas variaram de 2,04cm/cm/ano para *Cyathea corcovadensis* a 2,99cm/cm/ano para *Saccoloma inaequale*. Bernabe *et al* (1999) trabalhando com esporófitos jovens (aproximadamente 5cm) de samambaias arbóreas da família *Cyatheaceae*, que ocorrem em uma floresta montana nebulosa do México, encontraram taxas de crescimento relativo que variaram entre 2,42 a 2,53 cm/cm/ano no interior da floresta, onde a irradiância média foi de $18\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ entre 11:00 e 16:00horas. Já, para as plantas que cresceram na borda da floresta, as taxas de crescimento relativo variaram entre 3,53 a 3,68 cm/cm/ano, onde a irradiância encontrada foi de $160\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ entre 11:00 e 16:00horas. Neste trabalho, as plantas cresceram em casa de vegetação e receberam 16 horas de luz e média de irradiância de $33\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Suzuki (2003), trabalhando com plântulas de *Dicksonia sellowiana* Hook. com 2 a 3 cm, observou taxas de crescimento relativo que variaram entre aproximadamente 0,25 a 10% de irradiância, 0,15 a 3% de irradiância e 0,05 a 30% de irradiância no mês de Setembro, sendo a média de irradiância observada de aproximadamente $1300\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ao meio dia. Portanto, as taxas de crescimento encontradas para as espécies estudadas neste trabalho estão de acordo com os dados da literatura para outras espécies.

Tabela 5 – Médias, desvios padrão e t (teste de Student) referente a altura de frondes e número de frondes, nas espécies *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin. e *Cyathea delgadii* Sternb. (T1 – esporos semeados no dia 03 de setembro de 2002 = 337 dias, T2 – 337 dias + 60 dias = 397 dias de cultivo - *C. corcovadensis*); (T1 – esporos semeados no dia 07 de novembro de 2002 = 386 dias, T2 – 386 dias + 60 dias = 446 dias de cultivo - *C. delgadii*).

	<i>Cyathea corcovadensis</i>				<i>Cyathea delgadii</i>			
	Altura de frondes (cm)		Número de frondes		Altura de frondes (cm)		Número de frondes	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
Médias	2,77	6,14	4,73	5,07	4,07	10,06	5,85	8,45
Desvio padrão	0,80	2,16	0,70	2,02	1,03	2,16	1,09	1,36
t	-----	5,66*	-----	0,604	-----	10,70*	-----	6,68*

* - t significativo a 99% de probabilidade.

Tabela 6 – Médias, desvios padrão e t (teste de Student) referente à altura de frondes e número de frondes, nas espécies *Blechnum brasiliense* Desv. e *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett. (T1 – esporos semeados no dia 03 de setembro de 2002 = 270 dias, T2 – 270 dias + 60 dias = 330 dias de cultivo – *B. brasiliense*); (T1 – esporos semeados no dia 12 de novembro de 2002 = 252 dias, T2 = 252 dias + 60 dias = 312 dias de cultivo – *S. inaequale*).

	<i>Blechnum brasiliense</i>				<i>Saccoloma inaequale</i>			
	Altura de frondes (cm)		Número de frondes		Altura de frondes (cm)		Número de frondes	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
Médias	2,98	6,91	4,5	6,95	3,13	9,54	6,0	9,0
Desvio padrão	0,81	1,16	0,76	1,39	1,02	1,89	0,92	1,41
t	-----	12,13*	-----	6,89*	-----	12,95*	-----	7,55*

* - t significativo a 99% de probabilidade.

Tabela 7 – Taxa de crescimento relativo de *Blechnum brasiliense* Desv., *Cyathea corcovadensis* (Raddi) Domin., *Cyathea delgadii* Sternb. e *Saccoloma inaequale* (Kze.) Mett no T1 e T2, cultivados em vasilhinhos de mini-violetas de polietileno, em sala de cultivo $20 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Espécies estudadas	Taxas de Crescimento	Taxas de Crescimento
	Relativo	Relativo
	Cm/cm/mês	Cm/cm/ano
<i>Blechnum brasiliense</i>	0,18	2,19
<i>Cyathea corcovadensis</i>	0,17	2,04
<i>Cyathea delgadii</i>	0,19	2,39
<i>Saccoloma inaequale</i>	0,24	2,99

5 – CONCLUSÕES

1 – A espécie *Blechnum brasiliense* possui esporos monoletes, que apresentam pequenas perfurações, as quais aumentam de tamanho quando próximas da abertura do esporo. Os esporos inviáveis são ocos ou com poucas gotículas de reserva. Os esporos de *Cyathea corcovadensis* são aparentemente lisos, *Cyathea delgadii* apresenta esporos cobertos por filamentos e em *Saccoloma inaequale* os esporos apresentam rugosidades delgadas e dicotômicas, em forma de nervuras, com superfície lisa. Na sua face distal inferior, as rugosidades estão dispostas de modo mais irregular, sendo mais espessas e com depósitos granulados esparsos. As três espécies apresentam esporos triletes e tetraédricos. Nessas três espécies os esporos inviáveis são totalmente ocos ou preenchidos com poucas gotículas de reserva. Diante dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que ainda há muito para se estudar e pesquisar na morfologia de esporos, pois pouquíssima literatura foi encontrada até o momento da realização deste trabalho, tendo-se inclusive dificuldade para a caracterização da morfologia.

2 – Esporos de *Blechnum brasiliense* atingiram aproximadamente 65 % de germinação e o tempo médio de germinação foi de 12,54 dias. A espécie *Cyathea corcovadensis* atingiu 31,75% de esporos germinados e o tempo médio de germinação foi de 15,23 dias. Em *Cyathea delgadii* a germinação atingiu 75% e o tempo médio foi de 12,99 dias. Já *Saccoloma inaequale* atingiu cerca de 60% de germinação e o tempo médio foi de 17,81 dias.

3 – Gametófitos na fase cordiforme (com 180 a 200 dias de cultivo), foram analisados sob microscópio óptico e eletrônico de varredura. Todas as espécies apresentaram tricomas glandulares e com eliminação de secreção. Apenas na espécie *Cyathea delgadii* foi atestado que a secreção da mesma se tratava de mucilagem. Na literatura especializada, não há referência sobre a função dos tricomas glandulares em gametófitos de pteridófitas, nenhuma menção da existência de uma substância secretada, bem como a relação destas estruturas com o gametófito e o meio.

4 – As maiores porcentagens de germinação foram obtidas para as espécies *Blechnum brasiliense* e *Cyathea delgadii*, que ocorreram a 22 e 5% de irradiância. E nas irradiâncias de 42, 62 e 100%, a germinação foi parcialmente ou totalmente inibida.

5 – No estudo da porcentagem de fecundação, a espécie *Blechnum brasiliense* apresentou 91,5% de esporófitos após 303 dias de cultivo. *Cyathea corcovadensis* apresentou 35,83% de esporófitos após 264 dias de cultivo, *Cyathea delgadii* apresentou 79,16% de esporófitos após 249 dias de cultivo e *Saccoloma inaequale*, 48,39 % de esporófitos após 295 dias de cultivo. Nas espécies *Cyathea corcovadensis* e *Saccoloma inaequale*, a baixa porcentagem de germinação e a baixa porcentagem de fecundação respectivamente, sugerem a necessidade de aumentar e ampliar as pesquisas, realizando-se inclusive pesquisas em biotecnologia.

6 – *Blechnum brasiliense* apresentou TCR (Taxa de Crescimento Relativo em altura da maior fronde) de 2,19 cm/cm/ano. *Cyathea corcovadensis* apresentou TCR de 2,04 cm/cm/ano. *Cyathea delgadii* e *Saccoloma inaequale* apresentaram TCR de 2,39 e 2,99 cm/cm/ano respectivamente.

7 – Ainda há muito para se conhecer na pteridoflora brasileira já que a mesma conta com aproximadamente 1.500 espécies. Sendo que destas, nenhuma espécie até o presente momento é totalmente conhecida. Neste trabalho realizou-se algumas contribuições para ampliar um pouco o conhecimento destas plantas e disponibilizou mais uma espécie (*Saccoloma inaequale*) com altíssimo potencial ornamental.

6 – ANEXOS

Quadro 1 – Composição química do Meio de DYER

<u>Ingredientes</u>	<u>Quantidade</u>
Sulfato de Magnésio.....	510 mg/l
Nitrato de Potássio.....	120 mg/l
Nitrato de Cálcio.....	1440 mg/l
Fosfato de Potássio bibásico.....	250 mg/l
Solução de FeSO ₄ . 7H ₂ O e NaEDTA.....	1 mg/l

Água destilada até completar 1 litro.

Preparação: mistura-se todos os ingredientes.

Solução de FeSO₄.7H₂O e NaEDTA:

- 33,2 g de NaEDTA
- 3,65 g de hidróxido de sódio
- 25 g de sulfato de ferro
- Água destilada até completar 1 litro

Preparação: Mistura-se todos os ingredientes.

Quadro 2 – Metodologia para fixação das amostras de gametófitos

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

Ingredientes:

glutaraldeído 25% – 5 ml

tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2..... – 45 ml

Solução A – 2,76 g de Fosfato de sódio monobásico monoidratado
completar com água destilada até 100 ml

Solução B – 5,37 g de Fosfato de sódio dibásico heptaidratado
completar com água destilada até 100 ml

Preparação: Para preparar tampão fosfato de sódios 0,1M, pH 7,2 devem ser misturadas as soluções A e B: A – 28 ml e B – 72 ml (volume final – 100 ml). Depois adicionar os 5 ml de glutaraldeído em 45 ml 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° GL – ½ hora em cada. Pode ser conservado em etanol 70°GL.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrington, D.S. 1978. A revision of the genus *Trichipteris*. **Contr. Gray Herb.**, **208**: 1-93.
- Bernabe, N., Williams-Linera, G. & Palacios-Rios, M. 1999. Tree ferns in the interior and the edge of a Mexican cloud forest remnant: spore germination and sporophyte survival and establishment. **Biotropica**, **31**: 88
- Bewley, J. D. & Black, M. 1994. **Seeds. Physiology of development and germination**. 2^a ed. New York, Plenum Press. 445 p.
- Bozzola, J.J. & Russel, L.D. 1991. **Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists**. Boston, Jones and Barlett Publ. 542 p.
- Carafa, A. M. 1990. Gametophyte development of *Woodwardia radicans* (L.) SM.: effect of population density and antheridiogen on sex expression. **Giorn. Bot. Ital.**, **124**: 571-580.
- Chen, C. & Ikuma, H. 1979. Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores. V. Analysis of germination process by means of temperature. **Plant Physiol.**, **63**: 704-708.
- Chiou, W. & Farrar, D.R. 1997. Comparative gametophyte morphology of selected species of the family Polypodiaceae. **American Fern Journal**, **87**: 77-86.
- Chiou, W., Farrar, D. R., Ranker, T.A. Gametophyte morphology and reproductive biology in *Elaphoglossum*. **Can.J.Bot.**, **76**: 1967-1977.
- De Brum, F.M.R. & Randi, A.M. 2002. High irradiance and temperature inhibit the germination of spores of the fern *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) **Rev. Bras. de Bot.**, **25**: 391-396.
- Dickison, W.C. 2000. **Integrative Plant Anatomy**. USA, Academic Press. 533 p.
- 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. **Rev. Bras. de Bot.**, **8**: 219-222.

- Felippe, G.M., Esteves, L.M. & Randi, A.M. 1989. Lipids, proteins and sugars in spores of *Cyathea delgadii* Sternb., *Polypodium latipes* Langs. & Fisch and *Trichipteris corcovadensis* (Raddi) Copel. **Insula**, **19**: 3-12.
- Fernandez, I. 1997. **Taxonomia e fitogeografia de Cyatheaceae e Dicksoniaceae nas regiões Sudeste e sul do Brasil**. Tese de Doutorado. São Paulo: USP-Instituto de Biociências 435p.
- Filippini, E.C.P., Duz, S.R. & Randi, A. M. 1999. Light and storage in the germination of spores of *Dicksonia selowiana* (Presl.) Hook., Dicksoniaceae. **Rev. Bras. de Bot.**, **22**: 21-26.
- Furuya, M., Kanno, M. Okomoto, H. Fukuda, S. & Wada, M. 1997. Control of mitosis by phytochrome and a blue-light receptor in fern spores. **Plant Physiol.**, **13**: 677-683.
- Haupt, W. 1990. Phytochrome-mediated fern-spore germination: inhibition by elevated temperatures. **Photochemical Photobiology**, **52**: 57-59.
- 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. **J. Plant Physiol.**, **140**: 575-581.
- Jaramilo, R.I. Pérez-García, B. Mendoza, A. 1996. Desarrollo del gametófito y del esporófito joven de *Niphidium crassifolium* (Filicales: Polypodiaceae s. str.). **Rev. Biol. Trop.**, **44**: 485-490.
- Kazmirczak, C. 1999. **A Família Blechnaceae (Presl.) Copel. (Pteridophyta) no Rio Grande do Sul, Brasil**. Tese de Mestrado, UFRGS. Porto Alegre. RG. Brasil. 153 p.
- Labouriau, L.G. 1983. **A germinação das sementes**. Washington, Sec. da OEA-PRDCT. Série de Biologia, Monografia 24. 174 p.
- Marcondes-Ferreira, W. & Felipe, G.M. 1984. Effects of light and temperature on the germination of spores of *Cyathea delgadii*. **Rev. Brasil. Bot.**, **7**: 53-56.
- Mauseth, J. D. 1988. **Plant Anatomy**. Austin, University of Texas. 560 p.
- Mendoza, A. Pérez-García, B. Riba, R. 1999. Morfogénesis de la fase sexual del helecho *Arachniodes denticulata* (Dryopteridaceae). **Rev. Biol. Trop.**, **47**: 791-797.

- Miller, J.H. 1968. Fern gametophytes as experimental material. **Bot. Rev.**, **34**: 361-322.
- Mohr, H. 1956 Die Abhängigkeit des Protonemapolarität bei Farnen von Licht. **Planta**, **47**: 127-158.
- Pérez-García, B. Mendoza, A. Jaramillo, I. R. Riba, R. 1999. Morfogénesis de la fase sexual de seis especies mexicanas del género *Dryopteris* (Dryopteridaceae) **Rev. Biol. Trop.**, **47**: 69-81.
- Pérez-García, B. Mendoza, A. & Riba, R. 1994. Desarrollo gametofítico de *Metaxya rostrata* (Filicales: Metaxiaceae). **Rev. Biol. Trop.**, **42**: 455-60.
- Pérez-García, B. Mendoza, A. Jaramillo, I. R. Riba, R. 2001. Morfogénesis de la fase sexual de seis especies mexicanas del género *Dryopteris* (Dryopteridaceae), Parte II. **Rev. Biol. Trop.**, **49**: 265-278.
- Pérez-García, B. Mendoza, A. Riba, R. Ricci, M. 1996-1997. Morfogénesis del gametófito del helecho *Trysopteris elegans* (Filicales: Thyrsopteridaceae). **Rev. Biol. Trop.**, **44/45**: 59-65.
- Pérez-García, B. Mendoza, A. Ricci, M. 1996. Morfogénesis de la fase sexual de *Blechnum chilense* y *Blechnum cycadifolium* (Pteridophyta: Blechnaceae). **Rev. Biol. Trop.**, **44**: 491-497.
- Pérez-García, B. Riba, R. Mendoza, A. Jaramillo, R.I. 1998. Compared gametophytic development of three species of *Phlebodium* (Polypodiaceae, s.str.). **Rev. Biol. Trop.**, **46**: 1059-1067.
- 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., Frayle, M. E. & Mendoza, A. 1995. Desarrollo del gametofito de *Lophosoria quadripinnata* (Filicales: Lophosoriaceae). **Rev. Biol. Trop.**, **43**: 55-60.
- Pérez-García, B., Orozco-Segovia, A. & RIBA, R. 1994. The effects of white fluorescent light, far-red light, darkness and moisture on spore germination of *Lygodium heterodoxum* (Schizaeaceae). **Amer. J. Bot.**, **81**: 1367-1369.

- 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). **Ann. Bot. Fennici**, **32**: 107-115.
- Raghavan, V. 1993. Cellular and molecular biology of fern haplophase development. **Journal of Plant Research**, **3**: 59-73.
- Ramírez, R. Pérez-García, B. 1998. Fase gametofítica del helecho *Microgramma nitida* (Polypodiaceae). **Rev. Biol. Trop.**, **46**: 587-593.
- Ramírez, R. Pérez-García, B. Jaramillo, R.I. Riba, R. 1999. Morfogénesis de la fase sexual de seis especies mexicanas de helechos del género *Dryopteris* (Dryopteridaceae). **Rev. Biol. Trop.**, **47**: 69-81.
- Randi, A.M. 1987. **Aspectos fotomorfogênicos, bioquímicos e citoquímicos durante a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb.** Tese de doutorado. UNICAMP. Campinas. Brasil. 192 p.
- Ranal, M.A. 1991. Desenvolvimento de *Adiantum radiatum*, *Pteris denticulate* (Pteridaceae) e *Polypodium latipes* (Polypodiaceae) em condições naturais. **Acta Bot. Bras.**, **5**: 17-35.
- Ranal, M.A. 1993. Desenvolvimento de *Polypodium hirsutissimum* Raddi (Pteridophyta, Polypodiaceae) em condições naturais. **Acta Bot. Bras.**, **7**: 3-15.
- Ranal, M.A. 1995. Estabelecimento de pteridofitas em mata mesofila semidecídua do estado de São Paulo. 2. Natureza dos substratos. **Rev. Brasil. Biol.**, **55**: 583-594.
- Randi, A. M. 1996. Photosensitivity, viability and storage reserves in spores of *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch. (Pteridaceae). **Rev. Brasil. Bot.**, **19**: 105-108.
- Randi, A.M. & Felipe. G.M. 1988a. Effect of red light and far red on the germination of spores of *Cyathea delgadii*. **Rev. Bras. Bot.**, **11**: 41-45.
- Randi, A. M. & Felipe, G. M. 1988b. . Germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. Sob luz azul e aplicações longas de vermelho. **Rev. Brasil. Biol.**, **48**: 979-984.
- Randi, A.M. & Felipe. G.M. 1988c. Efeito da pré-umidificação em atmosfera úmida na fotossensibilidade de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. **Hoehnea**, **15**: 20-27.

- Randi, AM. & Crozier, A. 1991. Gibberellins, indole-3-acetic acid and the germination of spores of the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. **Rev. Brasil. Bot.**, **14**: 67-72
- Raven, P. H.; Evert, R. F. & Eichhorn, S. 2001. **Biologia Vegetal**. 6^a ed.. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S.A. p. 434-447.
- Renner, G. D. R. & Randi, A. M. Effects of sucrose and irradiance on germination and early gametophyte growth of the endangered tree fern *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook (Dicksoniaceae) **Rev. Biol. Tropical** (no prelo).
- Reynolds, T.L. 1982. Effects of cyanide, salicylhydroxamic acid, and temperature on respiration and germination of spores of the fern *Sphaeropteris cooperi*. **Plant Physiol.** **54**: 52-57.
- Roux, J. P. 1993. Systematic studies in the genus *Mohria* (Anemiaceae: Pteridophyta). IV. Comparative gametophyte morphology in *Mohria* and *Anemia*. **Bothalia**, **23**: 191-196.
- Santana, D.G. & Ranal, M. A. 2000. Análise estatística na germinação. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, **12**: 205-237.
- Sheffield, E., Douglas, G.E., Hearne, S.J., Huxham, S., Wynn, J.M. 2001. Enhancement of fern spore germination and gametophytes growth in artificial media. **American Fern Journal**, **91**: 179-186.
- Shinomura T., Nagatani, A. Hanzawa, H. Kubota, M., Watanabe, M. & Furuya, M. 1996 Action spectra for phytochrome A and phytochrome B specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National **Academy of Sciences**, **93**: 8129-8133.
- Simabukuro, E. A, Dyer, A. F. & Felipe, G. M. 1998. The effect of sterilization and storage conditions on the viability of spores of *Cyathea delgadii*. **American Fern Journal** **88**: 124-132.
- Simabukuro, E. A. Esteves, L. M. & Felipe, G. M. 1991. Fotoblastismo de pteridófitas da mata ciliar. **Insula**, **22**: 177-186.
- Snedecor, G.N. 1962 **Statistical Methods**. Iowa, Iowa State University Press, 534 p.
- Sugai, M. & Furuya, M. 1967. Photomorphogenesis in *Pteris vittata*. Phytochrome-mediated spore germination and blue light interaction. **Plant Cell Physiol.**, **8**: 737-748.

- Sugai, M. & Furuya, M. 1968. Photomorphogenesis in *Pteris vittata*. II. Recovery from blue-light-induced inhibition of spore germination.. **Plant Cell Physiol.**, **9**: 671-80.
- Sugai, M. & Furuya, M. 1985. Action spectrum in ultraviolet and blue light region for the inhibition of red-light induced spore germination in *Adiantum capillus-veneris* L. **Plant Cell Physiol.**, **26**: 953-56.
- Sugai, M., Tomizawa, K., Watanava, M. & Furuya, M. 1984. Action between 250 and 800 nanometers for the photoinduced inhibition of spore germination in *Pteris vittata*. **Plant Cell. Physiol.**, **25**: 205-12.
- Suzuki, C.C.L.F. 2003. **Desenvolvimento gametofítico e estudo de diferentes níveis de luz no crescimento de plântulas de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Pteridófitas – Dicksoniaceae)**. Tese de mestrado. UFSC. Florianópolis. 62 p.
- Tomizawa, K., Sugai, M. & Manabe, K. 1983. Relationship between germination and Pfr level in spores of the fern *Lygodium japonicum*. **Plant. Cell. Physiol.**, **24**: 1043-1048.
- Towill, L. R., & Ikuma, H. 1975. Photocontrol of germination of *Onoclea* spores. II. Analysis of germination processes by mean of anaerobiosis. **Plant. Physiol.**, **55**: 105-154.
- Tryon, R. M. 1976. A revision of the genus *Cyathea*. **Contrib. Gray Herb.**, **206**: 19-101.
- Tryon, M.R. & Tryon, A.F. 1982 **Ferns and Allied Plants: With Special Reference of Tropical America**. New York, Springer-Verlag., p. 385-386.
- Uchida, K.& Furuya, M. 1997. Control of the entry into S phase by phytochrome and blue light receptor in the first cell cycle of fern spores **Plant Cell Physiol.**, **38**: 1075-1079.
- Whittier, D.P. & Thomas, R.D. 1993. Gametophytes and young sporophytes of *Botrychium jenmanii* in axenic culture. **Int. J. Plant. Sci.**, **154**: 68-74.
- Windsch, P. G. 2002. Pteridófitas do Brasil: Diversidade Decrescente. 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, Editora da Universidade Federal Rural de Pernambuco. 196-198.