

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS – UNISINOS

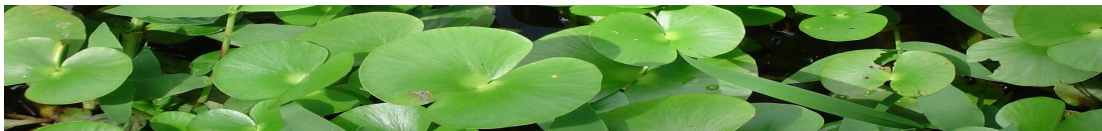
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
Diversidade e Manejo da Vida Silvestre

MESTRADO

**GERMINAÇÃO DE MEGÁSPOROS E
DESENVOLVIMENTO ESPOROFÍTICO INICIAL
DE *REGNELLIDIUM DIPHYLLUM* LINDMAN
(PTERIDOPHYTA, MARSILEACEAE) *IN VITRO*,
NA PRESENÇA DE CROMO E NÍQUEL**

MARIA ANGÉLICA KIELING RUBIO

São Leopoldo, janeiro de 2007



Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS – UNISINOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

Diversidade e Manejo da Vida Silvestre

MESTRADO

**GERMINAÇÃO DE MEGÁSPOROS E DESENVOLVIMENTO
ESPOROFÍTICO INICIAL DE *REGNELLIDIUM DIPHYLLUM*
LINDMAN (PTERIDOPHYTA, MARSILEACEAE) *IN VITRO*, NA
PRESENÇA DE CROMO E NÍQUEL**

MARIA ANGÉLICA KIELING RUBIO

PROF. DR. PAULO GÜNTER WINDISCH

(Orientador)

São Leopoldo, janeiro de 2007

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da
Universidade do Vale do Rio dos Sinos

R896g Rubio, Maria Angélica Kieling
Germinação de megásporos e desenvolvimento esporofítico inicial de
Regnellidium Diphyllum Lindman (Pteridophyta, Marsileaceae) in vitro,
na presença de cromo e níquel / por Maria Angélica Kieling Rubio. --
2007.
65 f. : il. ; 30cm.
Inclui artigo.
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Vale do Rio dos Sinos,
Programa de Pós-Graduação em Biologia, 2007.
"Orientação: Prof. Dr. Paulo Günter Windisch, Ciências da Saúde".
1. Pteridófita - Rio Grande do Sul. 2. Pteridófita - Conservação - Metais
pesados. 3. Ecofisiologia. I. Título.

Catálogo na Publicação:
Bibliotecária Eliete Mari Doncato Brasil - CRB 10/1184

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS – UNISINOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

Área de Concentração: Diversidade e Manejo da Vida Silvestre

A dissertação intitulada: “Germinação de megásporos e desenvolvimento esporofítico inicial de *Regnellidium diphyllum* Lindman (Pteridophyta, Marsileaceae) *in vitro*, na presença de cromo e níquel”, elaborada pela aluna **MARIA ANGÉLICA KIELING RUBIO**, foi julgada adequada e aprovada por todos os membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA**, área de concentração: **Diversidade e Manejo da Vida Silvestre**.

São Leopoldo, 23 de fevereiro de 2007.

Membros da Banca Examinadora da Dissertação:

Presidente da Banca e Orientador: Dr. Paulo Günter Windisch

Dr(a). Áurea Maria Randi

Sumário

| | |
|---|----|
| Dedicatória..... | 7 |
| Agradecimentos | 8 |
| Resumo Geral | 11 |
| Introdução e Contextualização da Proposta de Trabalho | 12 |
| Figura 1..... | 20 |
| Figura 2..... | 20 |
| Figura 3..... | 21 |
| Referências Bibliográficas..... | 22 |
| Publicação a ser submetida à <i>Acta Botanica Brasílica</i> | 28 |
| Resumo | 29 |
| Abstract..... | 30 |
| Introdução | 31 |
| Material e métodos..... | 34 |
| Local do experimento e material biológico | 34 |
| Obtenção dos megásporos | 34 |
| Meio de cultura | 34 |
| A. Germinação..... | 35 |
| B. Desenvolvimento esporofítico inicial | 35 |
| Monitoramento dos experimentos..... | 35 |
| A. Germinação..... | 35 |
| B. Desenvolvimento esporofítico inicial | 36 |
| Análise Estatística | 36 |
| A. Germinação..... | 36 |
| B. Desenvolvimento esporofítico inicial | 36 |
| Resultados..... | 37 |
| A. Germinação..... | 37 |
| B. Desenvolvimento esporofítico | 37 |
| Discussão | 39 |
| Agradecimentos | 42 |

| | |
|---------------------------------|----|
| Referências Bibliográficas..... | 42 |
| Figura 1..... | 47 |
| Figura 2..... | 48 |
| Figura 3..... | 49 |
| Tabela 1. | 50 |
| Tabela 2. | 51 |
| Tabela 3. | 52 |
| Figura 4..... | 53 |
| Figura 5..... | 54 |
| Figura 6..... | 55 |
| Figura 7..... | 56 |
| Figura 8..... | 57 |
| Figura 9..... | 58 |
| Figura 10..... | 59 |
| Figura 11..... | 60 |
| Figura 12..... | 61 |
| Anexo 1..... | 62 |

Dedico

*A Sebastian Domingo dos Santos Rubio,
pelo seu inestimável companheirismo e compreensão ...*

Agradecimentos

Registro aqui, os meus sinceros agradecimentos e minha estima, a todos que, de alguma forma, estiveram participando da elaboração e desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Günter Windisch, pelos seus grandes ensinamentos, sugestões para execução de mais um trabalho, pela sua valiosa amizade.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Biologia, da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, na pessoa da Dra. Lídia Mariana Fiúza, atual coordenadora executiva e a Dra. Ana Leal Zanchet, ex-coordenadora executiva, bem como a secretária Sra. Fernanda Fraga, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento das atividades desenvolvidas neste curso.

A todos os professores e professoras que contribuíram de maneira significativa na complementação de minha formação acadêmica.

A ajuda da CAPES/Prosup, pela concessão da bolsa de mestrado, pois sem a mesma, não teria sido possível a realização deste curso.

À Dra. Annette Droste, pelas valiosas sugestões dadas durante a execução deste trabalho.

À Suzana Seibert, pela sua dedicação exemplar no auxílio dos trabalhos experimentais, pela companhia e amizade durante este período.

Às colegas do Laboratório de Taxonomia Vegetal, Michele Helena Nervo e Kelli Tatiane Bottega Kerber, pela ajuda emergencial nos experimentos e pela amizade.

Às funcionárias do Laboratório de Geoquímica da UNISINOS, Jaqueline Duran, Márcia Vargas e Jalir Torres, pela eficiência na preparação das amostras de soluções dos metais pesados.

Ao Professor Dr. Nelson Ivo Matzembacher, pela agradável companhia nos trabalhos de campo em sua propriedade, na Fazenda São Maximiliano – Guaíba – RS.

À Dra. Lúcia Rebello Dillemburg, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e sua bolsista Luciana Ferla, pela disponibilização do porômetro para aferir a luminosidade das câmaras de crescimento.

À Denise Angela Wunder, pelas sugestões nas atividades experimentais.

Ao meu esposo, Sebastian Domingo dos Santos Rubio que, sem seu carinho, e sua incessante paciência e compreensão em todos os momentos, a realização deste trabalho, não teria sido viabilizada.

À minha família pela minha formação.

A todos aqueles mesmo não citados nominalmente, que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

***“Tudo está relacionado entre si.
Tudo quanto fere a Terra fere também os filhos da Terra.”***

Chefe Seattle, da tribo norte-americana Duwanish

Resumo Geral

A região de ocorrência de *Regnellidium diphyllum* Lindman, (Pteridophyta, Marsileaceae) no Estado do Rio Grande do Sul, é uma das mais impactadas, devido à grande concentração de indústrias e de áreas de cultivos agrícolas. Conseqüentemente, este panorama gera, uma intensa produção de resíduos que apresentam grande carga de contaminantes, como os metais pesados Cromo e Níquel, que são lançados inadequadamente nos ecossistemas, podendo-se encontrar concentrações desses metais pesados, acima dos limites estipulados pelas normas ambientais. Diante disso, realizou-se a análise da ação de Cromo hexavalente (VI) e Níquel, na germinação dos megásporos e no desenvolvimento inicial de esporófitos de *R. diphyllum in vitro*, espécie ameaçada de extinção, ocorrente em ambientes úmidos em algumas regiões do Estado. Os resultados obtidos na presença de Ni e Cr isoladamente nas soluções, indicam uma significativa redução na taxa de germinação a partir da concentração 0,5 mg l⁻¹ para ambos os metais, em relação ao controle. Na presença dos dois metais no mesmo meio de cultura, houve diferenças significativas na germinação dos megásporos em relação ao controle a partir da concentração 10 mg l⁻¹ de Ni e Cr. Os resultados obtidos no desenvolvimento esporofítico, indicam que a espécie apresenta sintomas visíveis de toxicidade, como clorose, diminuição do crescimento e necrose das estruturas esporofíticas, quando cultivadas em soluções nutritivas contendo concentrações superiores a 3,2 mg l⁻¹ de Cr ou Ni. Portanto, os limites de tolerância de *R. diphyllum*, quanto ao desenvolvimento e estabelecimento na presença dos contaminantes Cr e Ni, são relativamente baixos em relação à presença desses elementos nos ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: metais pesados, pteridófitas heterosporadas, conservação e ecofisiologia.

Introdução e Contextualização da Proposta de Trabalho

As pteridófitas constituem um grupo relativamente importante, desde os abundantes registros fósseis do Período Carbonífero até o presente, onde elas são o maior e o mais diversificado grupo de plantas, depois das plantas com flores (Raven *et al.* 2001). Estima-se que no mundo ocorram cerca de 9.000 a 12.000 espécies (Tryon & Tryon 1982, Windisch, 1992), sendo que há estimativas que apontam para um total de 15.000 espécies (Roos, 1995). As Américas concentram aproximadamente 3.250 espécies, destas, 3.000 são encontradas nos Trópicos. Segundo Windisch (1996), aproximadamente 1.150 espécies podem ser encontradas no território brasileiro (principalmente nas regiões Sul e Sudeste), que abrigam um dos centros de endemismo e especiação de pteridófitas do continente.

O estabelecimento das pteridófitas pode ocorrer desde os mais variados ambientes, nas mais distintas regiões da Terra, dos Trópicos até próximo aos círculos polares (Page 1979). No Brasil, segundo Windisch (1992), as pteridófitas podem ser encontradas desde o nível do mar até quase o limite da vegetação altimontana nas regiões tropicais, englobando situações subdesérticas como nas caatingas, ambientes salobros como nos manguezais, florestas pluviais tropicais como na planície amazônica, ou pluviais de encosta como nas Serras do Baturité (Estado do Ceará), da Mantiqueira e do Mar (Sudeste e Sul do Brasil).

Para vegetar em tão vasta gama de regiões e sua multitude de ambientes, as pteridófitas apresentam correspondente gama de adaptações, incluindo plantas terrestres, epífitas, rupícolas, hemiepífitas, trepadeiras e aquáticas (Windisch 1992). Poucos gêneros de pteridófitas apresentam adaptação à vida na água ou próximo a ela, no qual se destacam *Salvinia*, *Azolla*, *Marsilea*, *Pilularia*, *Ceratopteris* e *Regnellidium* (Tryon & Tryon 1982). A alteração de hábitat no mundo tornou cerca de 1700 espécies de pteridófitas ameaçadas de extinção e demais espécies consideradas extintas (Jermy 1990). A questão da conservação de pteridófitas no Brasil é discutida por Windisch (2002).

Um grande número de pteridófitas apresenta importância econômica, como *Rumohra adiantiformis* (G. Forst.) Ching, *Alsophila setosa* Kaulf., *Dicksonia sellowiana* (C. Presl) Hook., e espécies dos gêneros *Adiantum*, *Asplenium*, *Blechnum* e *Marsilea*, usadas na decoração de ambientes e projetos de ajardinamento. Já, algumas espécies dos gêneros *Lycopodium*, *Adiantum*, *Equisetum* e *Adiantopsis* são utilizados com fins medicinais. No setor da biotecnologia ambiental, muitas espécies se mostraram tolerantes e acumuladoras de metais pesados, capazes de removê-los do ambiente em que são

encontrados, como *Pteris vitata* L., tolerante e hiperacumuladora de arsênio (Tu & Ma 2002, Bondada & Ma 2003, Cai *et al.* 2004), *Salvinia minima* Bak., tolerante a concentrações de cobre, (Al-Hamdani & Blair 2004) e a associação simbiótica *Azolla-Anabaena* que é utilizada como adubação verde em culturas de arroz, por apresentar uma considerável capacidade de fixação de nitrogênio (Kondo *et al.* 1989). Testes de fitotoxicidade utilizando *Azolla pinnata* R. Br., comprovaram eficiência do vegetal como biofiltro contra uma série de metais pesados (Lales *et al.* 1993, Querubin *et al.* 1993, Gaur *et al.* 1994, Forni *et al.* 2001, Cohen-Shoel *et al.* 2002).

Muitas plantas ocupantes de ambientes aquáticos, pantanosos e úmidos encontram-se nas listas de espécies ameaçadas de extinção (Sota 1977). No Rio Grande do Sul, *Regnellidium diphyllum* Lindman consta na lista de espécies ameaçadas de extinção (Rio Grande do Sul 2003), como vulnerável e *Pilularia americana* A. Br., como provavelmente extinta, ambas pertencentes à família Marsileaceae.

As samambaias aquáticas constituem duas ordens heterosporadas, *Masileales* e *Salviniales* (Tryon & Tryon 1982), que são estruturalmente muito diferentes uma da outra e que quase certamente derivaram de diferentes ancestrais terrestres. A primeira composta pela família Marsileaceae, apresenta cerca de 80 espécies, constituída pelos gêneros *Marsilea*, *Pilularia* e o gênero monotípico *Regnellidium* (Johnson 1955). Membros desta família atraíram a atenção devido aos seus diferentes atributos, incluindo movimentos foliares noturnos (Darwin 1880) e heterofilia (Hildebrand 1870), já Labouriau (1952 a) aponta a latescência de *Regnellidium diphyllum* como mais uma evidência da posição filogenética isolada na família, enquanto que White (1961) destaca a presença dos elementos de vaso no xilema, além de traqueídeos típicos das pteridofitas.

Higinbotham (1941) afirma que *Regnellidium* é relacionado com *Marsilea* e *Pilularia* devido ao desenvolvimento gametofítico e embriológico. No entanto, conclui que devido às características apresentadas ocupa uma posição intermediária entre os dois gêneros.

R. diphyllum apresenta distribuição restrita, sendo considerada endêmica no sul do Brasil, com ocorrência em Santa Catarina (Sombrio) (Sehnem 1979) e Rio Grande do Sul, nas áreas mais baixas, próximas à Lagoa dos Patos (Schultz 1949, Laboriau 1952 b, Vianna 1973 e 1974, Sehnem 1979). Também há registros para o Uruguai (Paz & Bassagoda 2002) e Argentina (Corrientes) (Sota & Mitchell 1970). Lupia *et al.* (2000) encontraram um esporocarpo fóssil na América do norte e após estudo comparativo com os

esporocarpos de *Regnellidium*, *Marsilea* e *Pilularia*, concluíram que, possivelmente, existiu outra espécie do gênero *Regnellidium* no período do Cretáceo.

R. diphyllum, na fase esporofítica adulta (Fig. 1), apresenta folhas bilobadas com lâminas flabeladas (Fig. 2 e 3A), constituídas por um sistema dicotômico de venação fechada (Warmbrodt & Evert 1978), caule rizomatoso preso à superfície do solo e numerosas raízes adventícias. De acordo com observações em campo, em locais alagados, as lâminas das folhas podem ser encontradas sobre a água ou flutuando com seus pecíolos curvados, mas a espécie também pode ocorrer como terrícola em locais úmidos ou periodicamente alagáveis.

Existe um número considerável de espécies de pteridófitas heterosporadas, sendo que as pertencentes às famílias Marsileaceae e Salviniaceae constituem as principais representantes adaptadas à vida na água, podendo ser totalmente aquáticas ou semi-aquáticas, sendo que as últimas também são denominadas de anfíbias. Os representantes das famílias Selaginellaceae e Isoetaceae também apresentam heterosporia. As demais espécies de pteridófitas apresentam homosporia caracterizada pela produção de um único tipo de esporo, que dará origem a um gametófito bissexuado, sendo que as espécies heterosporadas produzem micrósporos e megásporos que originarão gametófitos masculinos (microsporângios) (Fig.3C) e femininos (megasporângios) (Fig. 3D), respectivamente. Os esporos de pteridófitas heterosporadas diferem dos de pteridófitas homosporadas principalmente nos aspectos funcionais, pois são melhor dispersos em meio aquático do que aéreo, e os gametófitos são endospóricos (incluídos no interior da parede rompida dos esporos) (Higinbotham 1941, Tryon & Tryon 1982, Gifford & Foster 1996).

Schneider & Pryer (2002), relatam que a família Marsileaceae apresenta esporos altamente especializados e com características únicas que esclarecem as modificações morfológicas das estruturas envolvidas na biologia reprodutiva, necessárias à transição do ambiente terrestre para o ambiente aquático.

Schultz (1949) observou que os esporocarpos de *R. diphyllum* em seu habitat natural, quando maduros, desprendem-se dos pecíolos nos meses de setembro a novembro, e ficam flutuando na superfície da água ou sobre o solo, perdendo paulatinamente o revestimento piloso. Também constatou que, cada esporófito pode produzir dezenas de esporocarpos e cada esporocarpo dá origem entre 260 a 630 megásporos e 22.400 a 50.200 micrósporos.

Durante as observações realizadas nas diferentes coletas de esporocarpos de *R.*

diphyllum (Fig. 3B), nas populações das cidades de Guaíba (Fig. 1) e Triunfo, para o banco de germoplasma da Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS, verificou-se que o período de amadurecimento e posterior desprendimento dos esporocarpos, teve início em dezembro estendendo-se até março, diferente da época de amadurecimento citado por Schultz (1949).

Os esporos de *R. diphyllum* são formados no interior de esporocarpos, que apresentam grande resistência e longevidade, permanecendo viáveis após 130 anos de armazenagem seca (Bharwaja, 1978).

O rompimento dos esporocarpos, com posterior liberação dos megásporos e micrósporos, ocorre normalmente em áreas úmidas, onde a liberação dos mesmos se dá em uma matriz mucilaginosa. As filicíneas heterosporadas desenvolvem a fase gametofítica com grande rapidez e os gametófitos são muito reduzidos (Kramer 1990). Estes gametófitos tornam-se maduros num período de aproximadamente 24 horas sob temperatura de 20-24°C (Higinbotham 1941).

A germinação e o desenvolvimento são eventos subseqüentes à maturação e liberação dos esporos pelos esporocarpos. Estes processos podem ser estimulados ou inibidos por vários fatores, que segundo Larcher (2000), são: a água, a temperatura, a luz e os nutrientes, que constituem os componentes fundamentais para o metabolismo dos vegetais. De acordo com Miller (1968), nas pteridófitas, a água, a luminosidade e a temperatura são consideradas essenciais ao desencadeamento do processo da germinação, uma vez que os próprios esporos contêm os nutrientes necessários para que este processo ocorra, sendo que o desenvolvimento do esporófito depende da disponibilidade de nutrientes do meio.

A germinação dos megásporos viáveis de *Regnellidium*, *Marsilea* e *Pilularia* é acompanhada pelo desenvolvimento de um conjunto células de verdes almofadadas portando rizóides e abrigando o arquegônio. Em *R. diphyllum* foi constatada a formação de esporófitos, mesmo na ausência de micrósporos, relatando a ocorrência de partenogênese (Mahlberg & Baldwin 1975). A partenogênese ou apogamia é caracterizada pela formação e desenvolvimento de um embrião sem que ocorra a fecundação do arquegônio do megagametófito, caracterizando assim uma reprodução assexuada (Fig. 3 D-E).

Até o presente momento alguns estudos foram realizados sobre o desenvolvimento de *R. diphyllum*, ao nível nacional, iniciando com os trabalhos pioneiros de Schultz (1949) já citado anteriormente. Laboriau (1952 a, 1952 b) apresentou em seu estudo indicando a

produção de látex por *R. diphyllum* como sendo uma das evidências para a posição filogenética isolada da espécie, na família Marsileaceae.

Vianna (1973) fez observações sobre a morfologia e a disposição das primeiras folhas de *R. diphyllum*, apresentando dados referentes a correlação numérica entre folha e raiz; correlação de velocidade de crescimento entre folha e raiz; venação circinada; a película, os pêlos epidérmicos e as brotações laterais do caule. A mesma autora em (1974), observou que o desenvolvimento embrionário de *R. diphyllum* em meios de cultura com baixas concentrações de sais minerais, foi favorecido, sendo o principal fator inibidor ao desenvolvimento a elevada concentração de sais das soluções nutritivas de Knop e de Meyer.

Cardoso (2002) constatou que os esporocarpos apresentam uma resistência muito grande quanto ao congelamento e ao aquecimento até 100°C, não afetando a germinabilidade dos megásporos contidos nesta estrutura. A autora também apresentou dados referentes à exposição de megásporos que revelaram tolerância em meios contendo concentrações de 1g a 5g l⁻¹ de NaCl. Já, em meios com concentrações superiores a 10 g l⁻¹ de NaCl, ocorreu o bloqueio da germinação após serem transferidos para uma solução nutritiva sem NaCl.

Estudos sobre o desenvolvimento inicial de *R. diphyllum* sob a ação de contaminantes ambientais, foram realizados por Cassânego (2004) que apresentou dados referentes a ação dos herbicidas 2,4 – D e glifosato sobre a espécie *R. diphyllum*. A espécie *R. diphyllum* foi afetada significativamente na germinação dos megásporos, formação dos esporófitos e no comprimento da raiz e das folhas, quando cultivada em solução nutritiva, contendo concentrações de 9,6 e 19,2 mg l⁻¹ dos herbicidas. Desta forma, o uso indiscriminado destes herbicidas poderá interferir negativamente no estabelecimento de populações de *R. diphyllum* em habitats sujeitos a contaminação por estes contaminantes.

Wunder (2005) dando seqüência aos estudos dos contaminantes ambientais que agem sobre o estabelecimento de *R. diphyllum*, constatou que a espécie apresenta uma certa tolerância à presença de Cádmiio em concentrações superiores (0,78 mg l⁻¹) aos encontrados normalmente em ecossistemas aquáticos caracterizados como não poluídos (0,01 mg l⁻¹). No mesmo estudo, verificou que a presença de sulfato de cobre em concentrações a partir de 12,5 mg l⁻¹, interfere negativamente no estabelecimento da espécie. Portanto, a autora faz um alerta quanto ao uso constante de produtos como herbicidas, fungicidas, algicidas e fertilizantes, que apresentam altas concentrações de

cobre em suas formulações, representando assim, uma ameaça ao estabelecimento da espécie em áreas sujeitas à eventual contaminação por resíduos tóxicos provenientes principalmente de atividades agrícolas.

No Rio Grande do Sul, *R. diphyllum* pode ser encontrado em áreas úmidas, que sofrem alterações antrópicas, como atividades agrosilvopastoris e industriais. As alterações do habitat natural de espécies aquáticas têm se agravado (Sota 1977). Smith (1993) cita que dentre os diversos contaminantes que geralmente ocorrem em ambientes aquáticos, os metais pesados têm recebido atenção especial por se tratarem de contaminantes conservativos, não sendo biodegradados ou biotransformados, podendo permanecer como contaminantes persistentes dentro de ecossistemas e cadeias alimentares específicas.

O uso intensificado de metais pesados aumentou a poluição, causando de forma indiscriminada efeitos prejudiciais aos padrões naturais dos ciclos biogeoquímicos. Cooney (1995) cita que além da ação direta sobre a biota, os contaminantes derivados de atividades antrópicas afetam o uso dos ecossistemas aquáticos em outros níveis (econômico, recreacional e agrícola, por exemplo), além dos riscos de contaminação de águas servidas às populações, tanto para consumo direto, quanto pelo consumo de alimentos contaminados.

A descarga de metais pesados em ambientes aquáticos pode levar a inúmeras respostas físicas, químicas e biológicas, que segundo Moore & Rammamorthy (1984) podem ser classificadas em duas categorias principais: (1) os efeitos do ambiente no metal e (2) os efeitos dos metais no ambiente. A primeira categoria enfatiza que as condições nas águas receptoras podem conduzir a uma mudança na especiação e na toxicidade dos metais. Tais condições incluem diferentes contribuições de matérias de origem geoquímica e antropogênica, qualidade de efluentes industriais e concentração de queladores e sólidos em suspensão. Já, na segunda categoria, as respostas biológicas são também freqüentemente diversas. Dependendo das condições ambientais pode haver mudanças na densidade, diversidade, estrutura da comunidade e composição das espécies da população.

Contudo, a complexidade da exposição dos organismos à contaminação por metais-traço não se restringe apenas aos elementos metálicos e à concentração da exposição, mas também à forma e ao tempo de exposição. Dois tipos de efeitos podem ser observados com a exposição de organismos aquáticos a metais: efeitos agudos, gerados por uma exposição curta a concentrações altas e letais de uma determinada substância tóxica; efeitos crônicos, causados por uma exposição de longa duração geralmente em concentrações baixas

(subletais) desta substância (Rand *et al.* 1995).

Os despejos de resíduos industriais são as principais fontes de contaminação das águas dos rios com metais pesados. O cromo é um componente bastante usado em indústrias coureiro-calçadistas, como curtumes, especificamente nos processos de curtimento e recurtimento de couros, e também na indústria metalúrgica. O níquel, por sua vez, é comumente usado na produção do aço e ligas metálicas, como também é aplicado em tintas, cosméticos e na produção de peças de máquinas e componentes elétricos.

Na região das bacias hidrográficas do Rio dos Sinos, Caí, Taquari e Gravataí, o setor coureiro-calçadista é o maior responsável pela carga bruta de cromo, devido ao grande número de empresas existentes e a alta vazão dos efluentes, correspondendo a 76% da carga bruta gerada na região. As cargas de cromo lançadas nos mananciais hídricos são originadas principalmente nas indústrias do couro (46%) e metalúrgica (34%). As indústrias mecânicas e metalúrgicas são as principais responsáveis pela geração da carga bruta de níquel, totalizando aproximadamente 90% desta carga, sendo que 80% é originada da indústria metalúrgica (FEPAM 2001).

Vários estudos já foram feitos para diagnosticar a qualidade dos mananciais de água no Estado do Rio Grande do Sul, onde os resultados não foram nada favoráveis do ponto de vista da preservação ambiental.

De acordo com Robaina, Formoso & Pires (2002), o estudo realizado no Vale do Rio dos Sinos, abrangendo principalmente os municípios de Campo Bom, Novo Hamburgo e São Leopoldo, sobre metais pesados em uma das áreas mais industrializadas e urbanizadas do Rio Grande do Sul, mostrou que a contaminação por cromo apresenta condições de risco ambiental moderado até muito alto em quase todas as drenagens afluentes do Rio dos Sinos. A contaminação por níquel por sua vez, apresentou risco moderado a partir do curso médio do Arroio Luiz Rau, revelando que os processos de industrialização e urbanização estão diretamente associados com a alta concentração desses metais.

Naime e Fagundes (2005) revelam que a presença do metal pesado cromo, nas águas do arroio Portão apresenta concentrações que merecem destaque, indicando desta maneira, que a remoção de cromo efetuada nos curtumes, não vem apresentando bons resultados. Contudo, verifica-se que o tratamento dos resíduos antes de serem lançados nos corpos hídricos, provavelmente não está de acordo com os parâmetros de metais pesados previstos nas normas ambientais, pois a atual Resolução CONAMA nº 357/05 que revoga a

Resolução CONAMA nº 020/86 as águas doces da Classe Especial, Classe 1 e Classe 2, destinadas à preservação e proteção das comunidades aquáticas, prevê como limite máximo 0,05 mg l⁻¹ de cromo total, e para Ni, 0,025 mg l⁻¹ o que na prática não vem acontecendo, podendo ser encontrados até 4,0 mg l⁻¹ de cromo em alguns corpos hídricos do Estado.

A fitotoxicidade induzida pelo cromo, segundo Panda & Choudhury (2005), gera um estresse oxidativo, que envolve peroxidação de lipídeos em plantas, o que causa danos severos às membranas celulares, degradação de pigmentos fotossintéticos, levando à diminuição do crescimento da planta, como também, de acordo com Poschenrieder *et al.* (1991), resulta na inibição da germinação de sementes e degradação de pigmentos. Em relação ao Ni, os sintomas de toxidez não estão bem definidos para os estádios iniciais de toxicidade, porém nos estádios moderados e agudos, a toxidez produz clorose, geralmente semelhante aos sintomas de deficiência de ferro (Berton *et al.* 2006). Além desses fatores limitantes para o estabelecimento da espécie, há o suprimento inadequado de nutrientes minerais, ou o estado trófico do ecossistema (Espíndola *et al.* 2003). Portanto, esta associação de fatores limitantes pode ter impactos negativos sobre o estabelecimento das espécies mais sensíveis.

Como *R. diphyllum*, é uma das espécies sensíveis e possivelmente vulneráveis devido as mudanças dos ambientes naturais geradas pela ação antrópica, objetivou-se para este estudo, analisar a reprodução a partir megásporos e o estabelecimento da fase esporofítica de *R. diphyllum*, verificando a taxa de germinação de megásporos e o desenvolvimento inicial de esporófitos em culturas *in vitro* sob influência dos metais pesados cromo (forma hexavalente) e níquel em diferentes concentrações.

Com o intuito de gerar informações pertinentes à conservação e ao manejo da espécie em estudo, os resultados obtidos são apresentados na forma de um artigo, sob o seguinte título: “Germinação de megásporos e desenvolvimento esporofítico inicial de *Regnellidium diphyllum* Lindman (Pteridophyta, Marsileaceae) *in vitro* na presença de Cromo e Níquel”, apresentado segundo as normas do periódico “Acta Botanica Brasílica”.



Fig. 1. Área úmida, Fazenda São Maximiliano – Guaíba, RS., com população de *Regnellidium diphyllum* Lindman.

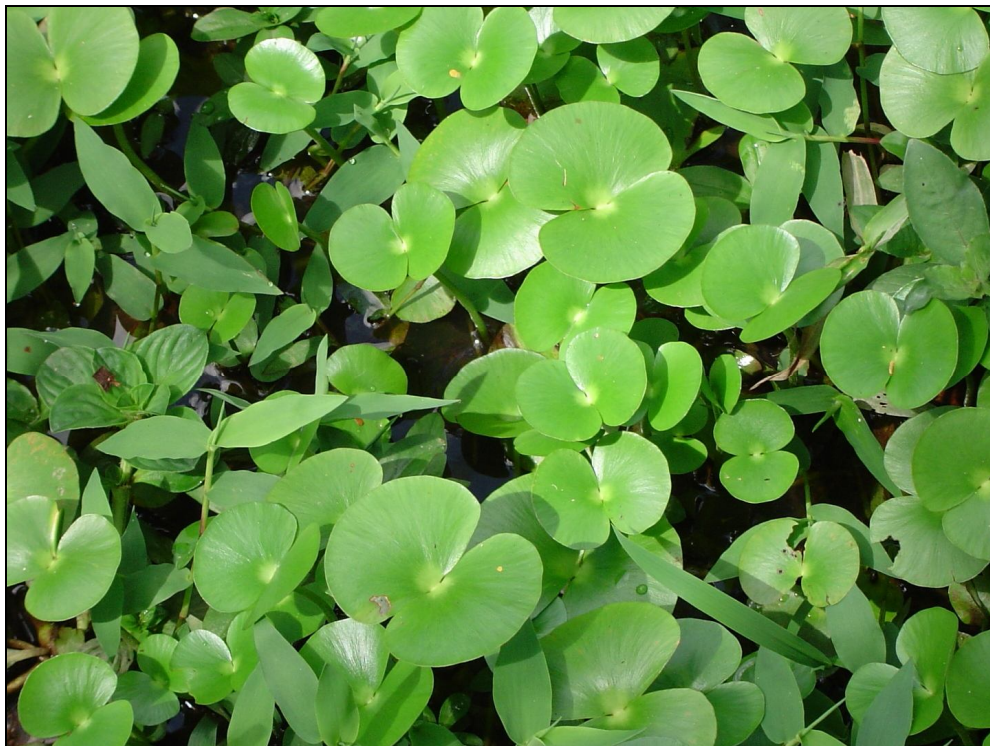


Fig. 2. Planta adulta em seu ambiente natural com destaque às folhas flabeladas.

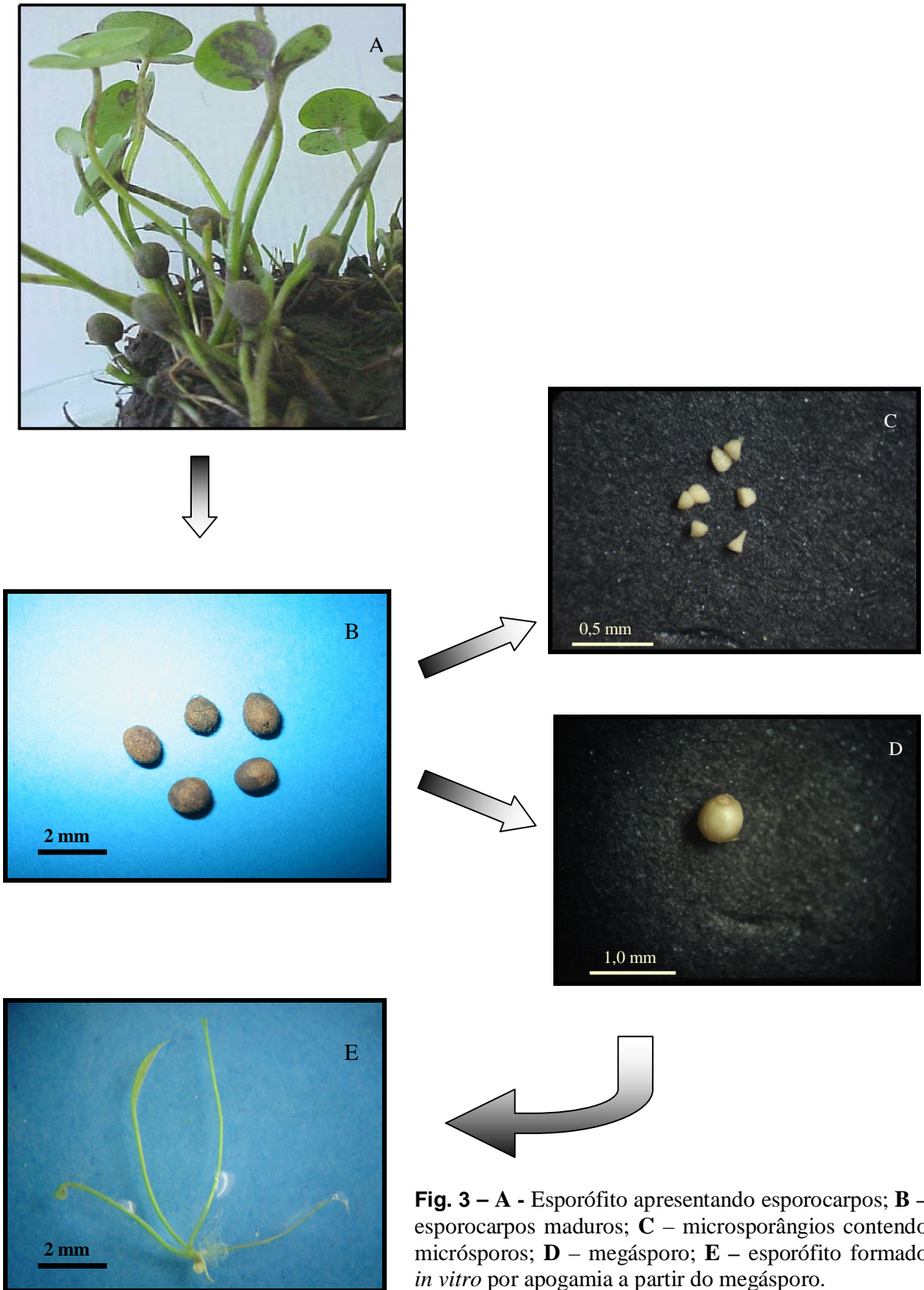


Fig. 3 – **A** - Esporófito apresentando esporocarpos; **B** – esporocarpos maduros; **C** – microsporângios contendo micrósporos; **D** – megásporo; **E** – esporófito formado *in vitro* por apogamia a partir do megásporo.

Referências Bibliográficas

- Al-Hamdani, S.H. & Blair, S.L. 2004. Influence of copper on selected physiological responses in *Salvinia minima* and its potencial use in copper remediation. **American Fern Journal** **94** (1): 47-56.
- Bharwaja, T. N. 1978. Recent advances in our knowledge of water fern Marsilea. **Aspects of Plant-Sciences** (II):39-62.
- Berton, R.S.; Pires, A.M.M.; Andrade, S.A.L.; Abreu, C.A.; Ambrosano, E. & Silveira, A.P.D. 2006. Toxicidade do níquel em plantas de feijão e efeitos sobre a microbiota do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **8** (41)1305-1312.
- Bondada, B.R. & Ma, L.Q. 2003. Tolerance of heavy metals in vascular plants: arsenic hyperaccumulation by chinese brake fern (*Pteris vittata* L.) pp. 397-420. In: Chandra, S. & Srivastava, M. (eds.). **Pteridology in the new millenium**. Kluwer Academic Publishers.
- Cai, Y.; Su, J. & Ma, L. Q. 2004. Low molecular weight thiols in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* upon exposure to arsenic and other trace elements. **Environmental Pollution** **129**: 69-78.
- Cardoso, N. 2002. **Aspectos ecofisiológicos da germinação de megásporos e do desenvolvimento inicial de esporófitos de *Regnellidium diphyllum* Lindman (Pteridophyta, Marsileaceae)**. Dissertação de mestrado. Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo/RS.
- Cassanego, M.B. 2004. **Ação de herbicidas na germinação de megásporos e no desenvolvimento inicial de esporófitos de *Regnellidium diphyllum* Lindman (Pteridophyta-Marsileaceae) *in vitro***. Dissertação de mestrado. Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo/RS.
- Cohen-Shoel, N.; Barkay, Z.; Ilzyer, D.; Gilath, I. & Tel-Or, E. 2002. Biofiltration of toxic elements by *Azolla* biomass. **Water, Air, and Soil Pollution** **135**: 93-104.
- CONAMA. Resolução n. 20, de 18 de junho de 1986. Dispõe sobre a classificação das

águas e estabelece os limites máximos das substâncias potencialmente prejudiciais. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Diário Oficial da União**, 30 de julho de 1986.

CONAMA. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Diário Oficial da União**, 18 de março de 2005.

Cooney, J.D. 1995. Freshwater Tests. P. 71-98, In. G. M. Rannnd ed). **Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. Taylor & Francis, Washington, USA.

Darwin, C. 1880. **The power of movements in plants**. 1st. Ed. John Murray, London.

Espíndola, E.L.G.; Branco, M.B.C.; Fracácio, R.; Guntzel, A. M.; Moretto, E.M.; Pereira, R.H.G.; Rietzler, A.C.; Rocha, O.; Rodgher, S.; Smith, W.S. & Tavares, K.S. 2003. Organismos aquáticos pp. 201-238. In: Rambaldi, D.M. & Oliveira, D.A.S. de. **Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas – biodiversidade 6**. Brasília: MMA/SBF, 510p.

FEPAM (Fundação Estadual de Proteção Ambiental). 2001. **Diagnóstico da poluição hídrica industrial na região hidrográfica do Guaíba**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Forni, C., Chen, J., Tancioni, L. & Caiola, M.G. 2001. Evaluation of the fern *Azolla* for growth, nitrogen and phosphorus removal from wastewater. **Water Research** **35**:1592-1598.

Gaur, J.P., Noraho, N. & Chauhan, Y.S. 1994. Relationship between heavy metal accumulation and toxicity in *Spirodella polyrhiza* (L.) Schleid and *Azolla pinnata* R. Br. **Aquatic Botany** **49**:183-192.

Gifford, E.M. & Foster, A. S. 1996. **Morphology and evolution of vascular plants**. 3^a ed. New York: Freeman and company. 626p.

Higinbotham, N. 1941. Development of the gametophytes and embryo of *Regnellidium*

- diphyllum*. **American Journal of Botany** **28** (4): 282-300.
- Jermy, A.C. 1990 Conservation of pteridophytes. In.: Kramer, K. U. & Green, P. S. **The families and genera of vascular plants – I pteridophytes and gymnosperms**. Berlin: Springer-Verlag. p. 180-183.
- Kondo, M., Kobayashi, M. & Takahashi, E. 1989. Effect of phosphorous in *Azolla* and its utilization in rice culture in Niger. **Plant and Soil** **120**:165-170.
- Kramer, K.U. 1990. Marsileaceae. In.: Kramer, K. U. & Green, P. S. **The families and genera of vascular plants – I pteridophytes and gymnosperms**. Berlin: Springer-Verlag. p. 180-183.
- Laboriau, L.G. 1952a. On the látex of *Regnellidium diphyllum* Lindm. **Oyton** **2** (2)7:57-74.
- Laboriau, L.G. 1952b. *Regnellidium diphyllum* Lindm., a lactescent fern. **Revista Brasileira de Biologia** **12** (2):181-183.
- Lales, J.S., Paywall, P.C., Querubin, L.J. & Pagapas, V. 1993. *Azolla* as biological scavenger of geothermal ions III. Arsenic and boron uptake under field conditions. **Philippine Agriculturist** **76**:185-191.
- Larcher, W. 2000. **Ecofisiologia vegetal**. Trad. Prado, C. H. & Franco, A. C. São Carlos: Rima.486 p.
- Lupia, R.; Schneider, H.; Moeser, G. M.; Pryer, K.M. & Crane, P. R. 2000. Marsileaceae sporocarps and spores from the Late Cretaceous of Georgia, U.S.A. **International Journal of Plant Sciences** **161**:975-988.
- Mahlberg, P.G. & Baldwin, M. 1975. Experimental studies on megaspore viability, partenogenesis and sporophyte formation in *Marsilea*, *Pilularia* and *Regnellidium*. **Botanical Gazette** **136** (3): 269-273.
- Miller, J.H. 1968. Ferns gametophytes as experimental material. **Botanical Gazette** **136** (3):269-273.
- Moore, J.W. & Rammamorthy, S. 1984. **Heavy Metals in Natural Waters**. **Applied**

- Monitoring and Impact Assessment.** Springer – Verlag, New York. 268p.
- Naime, R. & Fagundes, R.S. 2005. Controle da qualidade da água do Arroio Portão – Portão, RS. **Pesquisas em Geociências** 32 (1):27-35.
- Page, C.N. 1979. Experimental aspects of fern ecology pp. 552-589. In: Dyer, A. F. (ed.). **The experimental biology of ferns.** Academic Press, London.
- Panda, S.K. & Choudhury, S. 2005. Chromium stress in plants. **Journal Plant Physiology** 17 (1):95-102
- Paz, A. & Bassagoda, M. J. 2002. Revisión de las Marsileaceae del Uruguay y primera cita de *Pilularia americana* A. Braun. **Comunicaciones Botánicas-Museos Nacionales de Historia Natural y Antropología** 125 (6):18.
- Poschenrieder, C.; Vazquez, M.D.; Bonet, A. & Barcelo, J. 1991. Chromium III iron interaction in iron sufficient and iron deficient bean plants. II ultrastructural aspects. **Journal Plant Nutrition** 14:415-428.
- Querubin, L.J., Pagapas, V., Centeno, J.R. & Ilaó, P.I. 1993. Azolla as biological of geothermal íons II. Boron and arsenic uptake under greenhouse conditions. **Philippine Agriculturist** 76:185-191.
- Rand, G. M. Wells, P. G. & Mc Carty, L. S. 1995. Introduction to Aquatic Toxicology. P. 1-70, In G. M. Rannd ed). **Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment.** Taylor & Francis, Washington, USA.
- Raven, P.H., Evert, R. F. & Einchhorn, S. 2001. **Biologia Vegetal.** 6ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A. p. 434-447.
- Rio Grande do Sul. Decreto nº 42.099, de 31 de dezembro 2002. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção do Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. **Diário Oficial do Rio Grande do Sul**, ano LXII, nº1, p. 1-6, 2003.
- Robaina, L.E., Formoso, M.L.L. & Pires, C.A.F. 2002. Metais pesados nos sedimentos de corrente, como indicadores de risco ambiental – Vale do Rio dos Sinos, RS. **Revista do**

Instituto Geológico 23 (2):35-47.

Roos, M.C. 1995. **Charting tropical plant diversity: Europe's contribution and potential.** Working document European Science Foundation/Linnean Society/Rijksherbarium Hortus Botanicus/Systematics Association workshop "Systematics Agenda 2000: the challenge for Europe", Leiden.

Schneider, H. & Pryer, K.M. 2002. Structure and function of spores in the aquatic heterosporous ferns family Marsileaceae. **International Journal of Plant Sciences** **163**:485-505.

Schultz, A.R. 1949. Contribuições ao conhecimento de *Regnellidium diphyllum* Lindman. **Lilloa XVII**: 139-144.

Sehnm, A. 1979. Marsiliáceas. In: Reitz, r. (ed). **Flora Ilustrada Catarinense.** Itajaí, Herb. Barbosa Rodrigues. p.1-12.

Smith, R.P. 1993. **A primer of environmental toxicology.** Lea & Fabiger pub. p. 142-150.

Sota, E.R. de la. 1977. The problems of threatened and endangered plant species and plant communities in Argentina pp. 240-244. In: Prance, G.T. & T.S. Elias (eds.). **Extinction is Forever.** New York Botanical Garden, Bronx.

Sota, E.R. & Mitchell, D. S. 1970. Sobre la presencia de *Regnellidium diphyllum* Lindman (Marsileaceae-Pteridophyta) en Argentina. **Darwiniana** **16** (1-2):408-409.

Tryon, R.M. & Tryon, A.F., 1982. **Fern and Allied Plants.** Springer Verlag. New York. 896 p.

Tu, C. & Ma, L.Q. 2002. Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator ladder brake. **Journal of Environmental Quality** **31**:641-647.

Vianna, E.C. 1973. Observações sobre o desenvolvimento morfológico do esporófito de

- Regnellidium diphyllum* Lindm. (Hydropteridinae). **Iheringia – Série Botânica 18**:27-37. Porto Alegre, RS.
- Vianna, E.C. 1974. Nota sobre o desenvolvimento de *Regnellidium diphyllum* Lind. (Marsileaceae). **Iheringia - Série Botânica 19**:25-30. Porto Alegre, RS.
- Warmbrodt, R.D. & Evert, R. F. 1978. Comparative leaf structure of six species of heterosporous Ferns. **Botanical Gazette 139** (4):393-429.
- Windisch, P.G. 1992. **Pteridófitas da região norte-ocidental do estado de São Paulo**. São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 110p.
- Windisch, P.G. 1996. Towards assaying biodiversity in Brazilian Pteridophytes pp. 109-117. In: Bicudo, C. E. M. & Menezes, N. A. (eds.). **Biodiversity in Brazil – a first approach**. CNPq, São Paulo.
- Windisch, P.G. 2002. Fern conservation in Brazil. **Fern Gazette. 16** (6,7&8):295-300.
- White, R.A. 1961. Vessel in roots of Marsilea. **Science 133**:1073-1074.
- Wunder, D.A. 2005. **Estudo da germinação de megásporos e do desenvolvimento inicial de esporófitos de *Regnellidium diphyllum* Lindman (Pteridophyta-Marsileaceae) in vitro sob ação de cádmio, cobre e deficiências minerais**. Dissertação de mestrado. Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo/RS.

**GERMINAÇÃO DE MEGÁSPOROS E DESENVOLVIMENTO
ESPOROFÍTICO INICIAL DE *REGNELLIDIUM DIPHYLLUM*
LINDMAN (PTERIDOPHYTA, MARSILEACEAE) *IN VITRO*, NA
PRESENÇA DE CROMO E NÍQUEL.**

Trabalho a ser submetido à publicação na *Acta Botanica Brasilica**

* De acordo com as normas gerais para publicação da *Acta Botanica Brasilica*

**GERMINAÇÃO DE MEGÁSPOROS E DESENVOLVIMENTO
ESPOROFÍTICO INICIAL DE *REGNELLIDIUM DIPHYLLUM*
LINDMAN (PTERIDOPHYTA, MARSILEACEAE) *IN VITRO*, NA
PRESENÇA DE CROMO E NÍQUEL.**

Maria Angélica Kieling-Rubio¹²

Paulo Günter Windisch¹

RESUMO – (Germinação de megásporos e desenvolvimento esporofítico inicial de *Regnellidium diphyllum* Lindman (Pteridophyta, Marsileaceae) *in vitro*, na presença de Cromo e Níquel). A germinação de *R. diphyllum* foi analisada em meio líquido contendo 0,05 mg l⁻¹ até 125 mg l⁻¹ de Cromo (na forma hexavalente) e Níquel. O desenvolvimento das estruturas primárias de esporófitos formados por apogamia foi analisado em meios contendo de 0,025 a 4,8 mg l⁻¹ de Cr e Ni (separados ou juntos no mesmo meio de cultura). Os experimentos foram conduzidos em câmara de germinação/crescimento a 24± 1°C, sob densidade de fluxo de fótons 77 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 12 horas, durante três e quatro semanas, respectivamente. As taxas médias de germinação decresceram isoladamente a partir da concentração 0,5 mg l⁻¹ de Ni e Cr isoladamente. Na presença de Cr e Ni em proporções iguais, na mesma solução, houve diferenças significativas na germinação dos megásporos a partir da concentração de 10 mg l⁻¹ de Cr e Ni. No desenvolvimento esporofítico, a presença de Ni a partir da concentração 4,8 mg l⁻¹, influenciou significativamente o desenvolvimento da raiz primária e secundária e o desenvolvimento da folha primária e secundária. Na presença de Cr, em concentrações a partir de 3,2 mg l⁻¹, diferenças similares foram observadas no desenvolvimento esporofítico. O desenvolvimento esporofítico na presença dos dois metais em proporções iguais apresentou diferenças significativas a partir da concentração 3,2 mg l⁻¹. Considerando a poluição por Cr e Ni em algumas áreas de ocorrência natural de *R.*

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, Av. Unisinos 950, CEP 93022-000, São Leopoldo, RS, Brasil.

² Autor para correspondência: angelicakieling@brturbo.com.br

diphyllum, estes dados indicam que as baixas taxas de reprodução e desaparecimento das espécies em perigo de extinção podem ser esperadas nestas áreas afetadas.

Palavras-chave: poluição, germinação, reprodução, metais pesados, conservação.

ABSTRACT — (Megaspore germination and initial sporophytic development *in vitro* of *Regnellidium diphyllum* Lindman (Pteridophyta, Marsileaceae) in the presence of Chromium and Nickel. The germination of *R. diphyllum* in liquid growth media with 0.05 mg l⁻¹ and up to 125 mg l⁻¹ of Chromium (hexavalent form) and Nickel was analysed. The development of the first structures of apomytically formed sporophytes were analyzed using concentrations from 0.025 mg l⁻¹ to 4.8 mg l⁻¹ of Cr and Ni (individually or mixed in equal amounts). The experiments germination/growth chamber at 24± 1°C, with average photon flux density of 77 μmol m⁻² s⁻¹ and 12 hours photoperiod was used, during three (germination) and four (development) weeks. Germination rates decreased in media with concentrations of 0.5 mg l⁻¹ and higher of Ni as well as Cr. In the presence of equal amounts of Ni and Cr combined in the same culture media significant differences in the germination rates were observed at concentrations of 10 mg l⁻¹ and higher of Cr and Ni. In the sporophytic development, the presence of Ni in concentrations of 4.8 mg l⁻¹ and higher, significantly influenced the growth of the primary and secondary roots as well as the development of primary and secondary leaves. In the presence of Cr at concentrations of 3.2 mg l⁻¹ and higher similar differences were observed in the sporofitic development. The sporofitic development in the presence of both Ni and Cr in equal proportions presented significant differences at concentrations of 3.2 mg l⁻¹ and higher. Considering the pollution by Cr and Ni in some parts of the *R. diphyllum* natural distribution range, these data indicate that low reproduction rates and disappearance of this endangered species can be expected in the affected areas.

Key words: pollution, germination, reproduction, heavy metals, conservation.

Introdução

O número de substâncias empregadas pelo homem, está perto de 70.000 e cresce a razão de 1000 por ano (Branco 1991). Os metais pesados, como mercúrio (Hg), chumbo (Pb), cádmio (Cd), prata (Ag), cromo (Cr), níquel (Ni) e estanho (Sn), entretanto, não têm função biológica conhecida e podem ser encontrados em quantidades tóxicas a uma grande variedade de organismos.

A toxidez dos metais pesados reside principalmente na sua capacidade de interferir em processos enzimáticos, e na sua pouca mobilidade no organismo. Isso faz com que os metais pesados se acumulem, provocando profundas modificações no metabolismo, podendo até mesmo ocasionar a morte do organismo afetado (Esteves, 1988).

Elementos-traço são os elementos químicos que ocorrem na natureza de um modo geral em pequenas concentrações, da ordem de partes por bilhão (ppb) ou partes por milhão (ppm). As principais fontes de elementos-traço para o ambiente aquático continental são o intemperismo de rochas e a erosão de solos ricos nestes materiais. Mais recentemente outras fontes de elementos-traço têm assumido grande importância, como atividades industriais, através de efluentes sólidos lançados diretamente na atmosfera e líquidos que são lançados em pequenos córregos ou diretamente em rios e lagos; efluentes domésticos e águas superficiais provenientes de áreas cultivadas com adubos químicos e principalmente daquelas em que são utilizados defensivos agrícolas (Esteves 1988).

Com o aumento da industrialização e da demanda crescente de recursos minerais cada vez mais diversificados, várias substâncias tóxicas têm sido concentradas em determinadas regiões do planeta, provocando em alguns casos, sérios problemas ambientais.

Dentre os contaminantes que geralmente ocorrem em ambientes aquáticos, os metais-pesados têm recebido atenção especial por se tratarem de contaminantes conservativos, não sendo biodegradados ou biotransformados, permanecendo como contaminantes persistentes dentro de ecossistemas e cadeias alimentares específicas (Smith 1993). Frente à expansão do aporte de metais, sua presença nos ecossistemas aquáticos tem despertado interesse sob vários aspectos, incluindo a avaliação do destino e os efeitos desses contaminantes, sua distribuição nas cadeias alimentares e sua ciclagem biogeoquímica (Reinfelder *et al.* 1998).

Estima-se que, em todo mundo, anualmente são adicionadas aos solos em torno de 106 mil a 544 mil toneladas de Ni e 480 mil a 1300 mil toneladas de Cr, originadas de atividades metalúrgicas, da combustão de combustíveis fósseis e da adição de lodo de esgoto e de compostos industriais (Nriagu & Pacyna 1988).

Os valores médios de concentrações de metais pesados, no âmbito mundial, são bastante heterogêneos. Entre os metais pesados Cd, Pb, Ni e Cr têm sido normalmente associados à poluição e ao risco ecológico (Ross 1994). Para o Brasil, as concentrações de Cr e Ni naturalmente encontradas em algumas classes de solos por Fadigas *et al.* (2002), variam respectivamente de 9,6 a 75 mg kg⁻¹ e 2,7 a 29,9 mg kg⁻¹. De acordo com a legislação brasileira, as concentrações de cromo e níquel nas diferentes classes de água variam de 0,05 mg l⁻¹ a 1,1 mg l⁻¹ e 74 µg l⁻¹ a 2,0 mg l⁻¹, respectivamente.

No Estado do Rio Grande do Sul a gestão adequada dos recursos hídricos está se tornando uma necessidade em função do aumento da população e conseqüentemente do setor industrial, principal responsável pela deposição de resíduos sólidos com a presença de contaminantes ambientais.

Naime & Fagundes (2005) constataram a ineficiência dos processos de tratamentos dos resíduos contaminados com metais pesados, oriundos da indústria coureiro-calçadista, antes da deposição nos corpos hídricos, pois em alguns pontos do arroio Portão, situado na Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos, foram verificadas concentrações superiores a 3 mg l⁻¹ e Cromo total. Dados similares foram verificados nos sedimentos de corrente no Vale do rio dos Sinos, onde os arroios Luiz Rau, Pampa e Gauchinho apresentaram condições de risco moderado a extremo, para o metal pesado Cromo, provavelmente devido a grande atividade de indústrias de curtimento e risco moderado para Níquel, no arroio Luiz Rau (Robaina *et al* 2002). Soares *et al* (2004), indicaram em seu trabalho que o arroio Salso, situado na cidade de Porto Alegre, apresenta considerável a alta contaminação por Níquel, principalmente nas regiões de lançamento direto dos efluentes domésticos.

Na natureza o cromo pode ser encontrado sob a forma trivalente e hexavalente. A forma hexavalente de cromo é dez vezes mais tóxica que a trivalente, tendo efeito de toxicidade crônica. Estudos comparativos entre os efeitos de cromo trivalente (III) e hexavalente (VI) têm demonstrado que o cromo (VI) é um forte oxidante: embora não cause danos diretos no tecido, é considerado um agente mutagênico, carcinogênico e teratogênico (Mitteregger-Junior *et al.* 2006).

A fitotoxicidade de Cu, Cr, Cd, Ni, Mn, Zn e Pb misturados em várias

concentrações foram analisados por Montvydiene & Marciulioniene (2004) em *Lepidium sativum* (Brassicaceae) e a macrófita aquática *Spirodela polyrrhiza* (Lemnaceae).

A fitotoxicidade induzida pelo cromo, segundo Panda & Choudhury (2005), gera um estresse oxidativo, que envolve peroxidação de lipídeos em plantas, o que causa danos severos às membranas celulares, degradação de pigmentos fotossintéticos, levando à diminuição do crescimento da planta. A contaminação por cromo de acordo com Poschenrieder *et al.* (1991), pode resultar em inibição da germinação de sementes e degradação de pigmentos. Em relação à contaminação por Ni, verificou-se a ação no fotossistema, causando distúrbios no ciclo de Calvin e inibição do transporte elétrico por causa das quantidades excessivas de ATP e NADPH acumuladas pela deficiência das reações de escuro. Berton *et al* (2006) indicou que os sintomas de toxidez não estão bem definidos para os estádios iniciais de toxicidade, porém nos estádios moderados e agudos, a toxidez produz clorose, geralmente semelhante aos sintomas de deficiência de ferro.

Segundo Bolt & Bruggenwert (1978), o papel do Ni no crescimento das plantas não é conhecido, como também não é considerado essencial a elas, embora possa estar normalmente presente.

Regnellidium diphyllum Lindman é uma pteridófita heterosporada, que se desenvolve em ambientes aquáticos, terrestres e palustres, sendo considerada por alguns autores, planta anfíbia, visto que, parte de seu desenvolvimento ocorre em ambiente aquático. No Estado do Rio Grande do Sul, ocorre em áreas úmidas, próximo à Lagoa dos Patos (Schultz 1949), e atualmente podem ser localizadas populações nos município de Gravataí, Guaíba, Triunfo e Viamão. Em Santa Catarina, é encontrada na região de Sombrio, como também pode ser encontrada na Argentina em Corrientes (Sota & Mitchell 1970) e Uruguai (Paz & Bassagoda 2002). Desde 2003, encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção do Rio Grande do Sul, sendo incluída na categoria de espécies vulneráveis (Rio Grande do Sul 2003).

A análise química realizada pelo Laboratório de Geoquímica da UNISINOS, de amostras de água colhidas junto as populações naturais de *R. diphyllum* no município de Guaíba, revelou que naquela localidade a concentração dos metais pesados Cr e Ni é menor que 0,1 mg l⁻¹

Diante da intensa e continua agressão que o ambiente natural vem sofrendo devido à presença de poluentes e para verificar a suscetibilidade da espécie *R. diphyllum*, foi realizado o presente estudo, visando verificar *in vitro* níveis de tolerância da espécie aos

metais pesados Cr e Ni, na germinação dos megásporos, formação do megagametófito e o desenvolvimento esporofítico inicial de *R. diphyllum*, verificando os limites de tolerância da espécie a estes contaminantes.

Material e métodos

Local do experimento e material biológico – o experimento foi conduzido no Laboratório de Criopreservação Vegetal e no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS. Os esporocarpos utilizados no experimento foram coletados no Banhado dos Pachecos, município de Viamão, RS, no ano de 2002. Estes se encontravam armazenados em frascos plásticos em temperatura ambiente, no banco de germoplasma da Universidade. Visando a uniformização das culturas e considerando a propriedade da espécie de poder formar esporófitos através do processo de apogamia, optou-se por utilizar apenas os megásporos sem a presença de micrósporos.

Obtenção dos megásporos e esterilização de material – grupos de 20 esporocarpos foram lavados em água corrente, enxaguados em álcool a 70%, conduzidos à câmara de fluxo laminar, imersos por 10 min em solução de hipoclorito de sódio comercial (2% de cloro ativo) a 50% acrescida de duas gotas de detergente Tween 20, em seguida foram lavados com água destilada autoclavada e secos sobre papel filtro autoclavado. Após a secagem, os esporocarpos foram rompidos com um alicate para a liberação dos megásporos e micrósporos neles contidos. Os megásporos extraídos dos esporocarpos foram separados dos micrósporos com o auxílio de um estereomicroscópio e logo após, misturados para a homogeneização da amostra.

Meio de cultura – no experimento utilizou-se a solução nutritiva de Meyer, indicada por Vianna (1974) e de acordo com Dyer (1979), com os seguintes componentes: 1,0 g/l KH_2PO_4 ; 1,0 g/l NH_4NO_3 ; 0,3 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,06 g/l CaCl_2 ; 0,1 g/l NaCl e 0,01 g/l $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Após a preparação e a autoclavagem do meio foram adicionadas diferentes concentrações de Ni e Cr hexavalente (VI), individualmente ou combinados entre si em iguais proporções. A adição dos metais foi realizada a partir da diluição da solução padrão

de Titrisol 1000 mg l⁻¹ no caso de Ni, no caso do Cr foi utilizada a forma hexavalente (K₂Cr₂O₇). As soluções foram preparadas pelo Laboratório de Geoquímica da UNISINOS e adicionadas ao meio de cultura previamente preparado.

A. Germinação – O experimento foi separado em três blocos, cujo bloco A foi constituído dos seguintes tratamentos: zero (controle); 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 30; 50; 80; 100 e 125 mg l⁻¹ de Ni; o bloco B foi constituído dos tratamentos: zero (controle); 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 30; 50; 80; 100 mg l⁻¹ de Cr; e o bloco C 12,5 ml do meio de cultura contendo a presença de Ni e 12,5 ml do meio de cultura contendo Cr, se constituindo dos seguintes tratamentos:(controle); 0,1; 0,5; 1; 5;10; 15; 20; 30; 50; 80 e 100 mg l⁻¹ de Ni e Cr. Em cada um dos tratamentos nos três blocos, foram feitas quatro repetições, armazenadas em frascos de vidro (4,5 x 10 cm) contendo 25 megásporos cada, inoculados em 25 ml do meio de cultura.

B. Desenvolvimento esporofítico inicial - nesta etapa, foram definidas as concentrações: zero (controle); 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 e 4,8 mg l⁻¹, tanto para os blocos A e B que continham unicamente Ni ou Cr, como também para o bloco C que apresentava os dois metais conjugados no mesmo meio, sendo a quantidade do meio de cultura proporcional: 10 ml de solução nutritiva contendo Ni e 10 ml contendo Cr. Foram utilizados quinze megásporos para cada repetição, dispostos em frascos de vidro previamente autoclavados, contendo 20 ml das soluções, com cinco repetições por tratamento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, onde as culturas foram dispostas aleatoriamente em câmara de germinação do tipo BOD, com fotoperíodo de 12 horas, sob densidade de fluxo de fótons de 74 a 80 µmol m⁻² s⁻¹, verificada por meio de um quantômetro (Li-1600, Li-cor, Inc., Lincoln, NE), onde a radiação medida é a fotossinteticamente ativa (RFA) e a temperatura de 24±1°C.

Monitoramento dos experimentos

A. Germinação - as observações foram realizadas uma vez por semana, durante um período de três semanas, para registro dos dados e posterior análise estatística. A cada semana foram retirados de cada repetição, três indivíduos germinados. Foram considerados germinados, os megásporos que emitiram estrutura globosa clorofilada e envolta por uma

coroa de rizóides, ou aqueles que já apresentavam raiz e folhas (Mahlberg & Baldwin 1975). Após três semanas totalizou-se o percentual de megásporos germinados.

B. Desenvolvimento esporofítico inicial - as observações e o registro dos dados foram semanais, se estendendo por um período de quatro semanas. Para verificar o desenvolvimento do esporófito de *R. diphyllum*, na primeira semana foram retirados aleatoriamente de cada uma das repetições dos diferentes tratamentos 10 indivíduos, desta maneira, restaram somente cinco indivíduos. Nestes cinco indivíduos foram registradas semanalmente as medidas das estruturas esporofíticas, por meio de papel milimetrado e auxílio de um estereomicroscópio, onde foram considerados o comprimento da raiz primária, secundária e o comprimento da primeira, segunda terceira e quarta folha. Para a análise estatística foram desconsiderados os dados das folhas terciária e quaternária. O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar, para que não houvesse contaminação das amostras. Os indivíduos dos diferentes tratamentos foram fotografados e após o experimento, fixados em álcool etílico 70% .

Análise Estatística

A. Germinação - na análise estatística dos dados, foram considerados os resultados coletados após três semanas. Os dados foram analisados através do teste de ANOVA para comparação das médias das doses e dos tratamentos. A normalidade e a homogeneidade dos dados por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov e teste de Levene (Santana & Ranal 2004), sendo o nível de significância adotado de 5%. Os dados foram analisados pelo “Software SPSS 12.0”.

B. Desenvolvimento esporofítico inicial - para análise estatística dos dados, foram considerados os dados coletados na primeira e na quarta semana, referentes à raiz primária, folha primária e secundária. Verificou-se a normalidade e a homogeneidade dos dados de comprimento das estruturas esporofíticas pelos testes de Kolmogorov-Smirnow e teste de Levene, respectivamente (Santana & Ranal 2004). Aos dados que se adequaram à normalidade e à homogeneidade, aplicou-se o teste de Anova, sendo que a diferença entre as médias foi verificada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para os dados que não seguiram à normalidade e à homogeneidade, se utilizou o teste de Kruskal-Wallis, sendo feitas às comparações múltiplas através do teste de Dunn a 5% de probabilidade (Zar 1999). Os dados foram analisados pelo software SPSS 12.0 e o nível de significância

adotado foi de 5%.

Resultados

A. Germinação - As diferentes concentrações de Ni influenciaram significativamente a porcentagem média de germinação dos gametófitos com formação de esporófitos de *R. diphyllum* ($F=68,393$; $gl=11,24$; $P<0,001$). Este efeito foi significativo em baixas concentrações do metal na germinação de megásporos, sendo que a partir da concentração $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de Ni, verificou-se uma redução na porcentagem da germinação em relação ao controle que apresentou um percentual de 78% de megásporos germinados (Fig. 1 e 4). A inibição total da germinação ocorreu a partir da concentração 50 mg l^{-1} . (Fig.4).

Ao compararmos as diferentes concentrações de Cr hexavalente, agindo sobre a germinação dos megásporos com formação de esporófitos de *R. diphyllum*, verificou-se que houve influência significativa do Cr, onde ($F=42,229$; $gl=9,24$; $P<0,001$), havendo diferença significativa entre as médias de germinação, a partir da concentração $0,5 \text{ mg l}^{-1}$, quando comparadas com o controle (Fig. 2 e 5). Já, os dados da concentração 80 mg l^{-1} de Cr, foram excluídos da análise estatística, devido à inibição total do processo de germinação.

Na análise estatística dos dados sobre a aplicação conjunta de Cr e Ni, constatou-se influência significativa entre as doses sobre o percentual médio de germinação de megásporos ($F=66,310$; $gl=8,24$; $P<0,001$) em relação ao controle que apresentou 78% de megásporos germinados. Concentrações acima de 10 mg l^{-1} de Cr e Ni inibiram o processo de germinação com formação de esporófitos (Fig. 3 e 6).

B. Desenvolvimento esporofítico inicial - O Ni interferiu significativamente no desenvolvimento da raiz primária, tanto na primeira semana ($H=30,478$; $gl=9,24$; $P<0,001$), quanto na quarta semana ($H=26,061$; $gl=9,24$; $P=0,002$). Após a primeira semana em cultura, nas diferentes concentrações de Ni, ocorreu uma significativa redução na média de crescimento da raiz primária de *R. diphyllum*, no meio contendo $4,8 \text{ mg l}^{-1}$ de Ni, sendo a média do comprimento da estrutura, diferente do controle. Resultados similares foram verificados na mesma concentração na quarta semana.

O crescimento da folha primária também foi influenciado significativamente pela adição de Ni ao meio de cultura ($H=32,972$; $gl=9,24$; $P<0,001$), onde a concentração crítica para o desenvolvimento da estrutura foi de $4,8 \text{ mg l}^{-1}$ de Ni; nas demais concentrações do

metal, as médias de comprimento da folha primária foram similares ao tratamento controle após uma semana, e não diferiram do controle ao término das quatro semanas. (Tab. 1).

O crescimento da folha secundária sob diferentes dosagens de Ni, foi influenciado significativamente na média de comprimento da estrutura, na primeira semana ($H=20,66$; $gl=8,24$; $P=0,014$) e na quarta semana ($H= 18,208$; $gl=9,24$; $P= 0,033$), visto que a concentração crítica para o desenvolvimento foliar foi de $4,8 \text{ mg l}^{-1}$, cujo valor diferiu significativamente do controle. (Fig. 7).

Nas concentrações a partir de $3,2 \text{ mg l}^{-1}$ de Ni, após quatro semanas em cultura, as plântulas apresentaram sinais visíveis de reação à toxicidade, como: clorose das folhas e necrose de algumas estruturas, sendo esta, mais evidente na concentração de $4,8 \text{ mg l}^{-1}$ (Fig. 8).

A interferência de Cr foi significativa estatisticamente, no desenvolvimento da raiz primária nas diferentes concentrações após sete dias em cultura ($H=37,752$; $gl=9,24$; $P<0,001$), sendo consideradas críticas as concentrações a partir do tratamento $3,2 \text{ mg l}^{-1}$, para o desenvolvimento da estrutura. O mesmo foi constatado na quarta semana ($H=37,016$; $gl=9,24$; $P<0,001$) (Tab.2), onde a partir da concentração $3,2 \text{ mg l}^{-1}$ houve redução significativa na média do comprimento ou até necrose da estrutura (Fig. 9-10).

Cromo também interferiu negativamente na média do comprimento da folha primária nos diferentes tratamentos, após a primeira semana ($H=36,703$; $gl=9,24$; $P<0,001$), verificando-se, portanto, uma acentuada diferença a partir da concentração $3,2 \text{ mg l}^{-1}$, ao compará-las com o controle. O mesmo pode ser verificado na quarta semana em cultura ($H=36,571$; $gl=9,24$; $P<0,001$).

A média do comprimento da folha secundária, sob a ação de Cr, na primeira semana não diferiu do controle até a concentração $1,6 \text{ mg l}^{-1}$. Nas demais concentrações, a germinação do megásporo não foi verificada ou o tecido esporofítico necrosou logo após a emissão da estrutura ($H=31,894$; $gl=7,24$; $P<0,001$). Na quarta semana constatamos que novamente as concentrações a partir de $3,2 \text{ mg l}^{-1}$ de Cr, foram as que influenciaram negativamente o desenvolvimento da estrutura ($H=30,838$; $gl=7,24$; $P<0,01$), quando comparadas ao controle isento do metal.

A ação conjunta de Cr e Ni no mesmo meio de cultura, em diferentes concentrações teve influência significativa na média do comprimento da raiz primária ($H=36,231$; $gl=9,24$; $P<0,001$) durante a primeira semana, onde as concentrações desfavoráveis ao desenvolvimento da estrutura, foram $3,2 \text{ mg l}^{-1}$ e $4,8 \text{ mg l}^{-1}$ de Cr e Ni, pois diferiram

significativamente da média de comprimento do controle. Dados similares foram encontrados na quarta semana ($H=34,763$; $gl=9,24$; $P<0,001$), onde novamente as duas maiores concentrações foram consideradas críticas ao desenvolvimento da estrutura em questão (Tab. 3).

O desenvolvimento da folha primária sob a ação dos dois metais, também foi influenciada significativamente já na primeira semana ($H=38,108$; $gl=9,24$; $P<0,001$) e após quatro semanas ($H=32,702$; $gl=9,24$; $P<0,001$). A partir da concentração $3,2 \text{ mg l}^{-1}$ de Cr e Ni na solução nutritiva, o crescimento da folha primária foi afetado significativamente, na primeira e na quarta semana, quando comparadas com o controle. Nas concentrações inferiores a $3,2 \text{ mg l}^{-1}$ de Cr e Ni, as médias de comprimento da folha primária não diferiram estatisticamente do tratamento controle.

O crescimento da folha secundária foi influenciado significativamente nas diferentes concentrações de Cr e Ni na primeira semana ($H=38,777$; $gl=9,24$; $P<0,001$), como também na quarta semana ($H=28,283$; $gl=9,24$; $P=0,001$). As concentrações limite ocorreram a partir de $3,2 \text{ mg l}^{-1}$ de Cr e Ni, diferenciando-se intensamente do controle (Fig.11-12).

Nos três blocos de experimentos (**A** –Níquel, **B** – Cromo e **C** – Cromo e Níquel), foram verificados visíveis sinais de toxicidade, evidenciados pela perda da coloração verde das folhas, passando a amarelada, bem como, a necrose da raiz. Além disto, também se verificou o reduzido crescimento e a inibição da formação de novas estruturas em concentrações superiores a $1,6 \text{ mg l}^{-1}$.

Discussão

Em trabalhos ecofisiológicos a germinação de esporos é definida pela emergência de alguma estrutura. No caso de megásporos é importante ressaltar que a emergência de material pode ser devida ao processo de germinação formando uma estrutura globosa (apresentando curtos rizóides) correspondendo à parte do megagametófito (megaprótalo) emergente da parede do esporo rompido. Contudo, com o grande volume de material no megásporo, poderia ocorrer a extrusão de material no processo de embebição, sem se iniciar a germinação propriamente dita. Neste tipo de experimento fica difícil distinguir se a emergência do material ocorreu por embebição ou pela formação de tecido gametofítico. A formação de tecido gametofítico também pode ter ocorrido seguida da morte sob a ação

dos metais pesados. Esta possibilidade precisa ser considerada na análise das situações ilustradas nas figuras 4-I; 5-F, G, H; 6-G, H, I.

A germinação do megásporo com formação de esporófito em baixas concentrações de níquel, verificada no nosso estudo com *R. diphyllum*, também foi encontrada na germinação das sementes de *Cicer arietinum* pré-tratadas com Ni (Sing 1984).

A redução do crescimento das estruturas esporofíticas, clorose e ou necrose em *R. diphyllum* sob ação de Ni, confirmam a toxidez do metal (Fig. 8-J). Sintomas de toxicidade foram apresentados por várias angiospermas cultivadas em solo ou em solução nutritiva com a adição de Ni, onde Nickel Institute (2006) relata que o a clorose é um dos sintomas decorrentes da deficiência de ferro, induzida pelo Ni. Liu & Wang (1993) determinaram a fitotoxicidade de Ni em arroz e milho e concluíram que houve redução de produção com as doses de Ni entre 14 e 403 mg kg⁻¹ de solo, sendo este efeito mais acentuado para o milho. Piccini & Malavolta (1992) avaliaram a toxidez de Ni em diferentes cultivares de feijão, utilizando solução nutritiva. Esta produção de feijão foi inversamente proporcional à concentração de Ni na solução. Na dose máxima, 4 mg l⁻¹ de Ni em solução, os cultivares não produziram sementes. Berton *et al* (2006), constataram como letal para o cultivo de feijão, a dose de 210 mg kg⁻¹ de Ni no solo, já que causou a morte de todas as plantas de feijão na ausência de calcário. Também verificaram que a concentração de Ni dos grãos aumentou com o incremento de Ni no solo.

Uma resenha sobre a ecotoxicidade de Ni, tanto em ecossistemas aquáticos e terrestres, pode ser encontrada (Nickel Institute 2006).

A fitotoxicidade de Cromo hexavalente (VI) pode resultar na inibição da germinação das sementes, conforme visto por (Barcelo & Poschenrieder 1997, Panda & Patra 1997, Panda 2003). O mesmo foi constatado em nossos experimentos em relação à germinação de megásporos de *R. diphyllum* (Fig.5-F,G,H).

A influência significativa de Cr na redução do crescimento das estruturas esporofíticas, raiz primária, folha primária e secundária de *R. diphyllum*, quando comparada com o controle isento do metal (Tab. 2), também foi verificada em outras espécies de macrófitas aquáticas, como: *Myriophyllum spicatum* onde o crescimento máximo ocorreu até a concentração 50 µg l⁻¹ de Cr e concentrações acima de 1000 µg l⁻¹ causaram uma redução linear no peso e comprimento das plântulas (Guillizzoni *et al* 1984). Nichols *et al.* (2000), também verificaram um decréscimo significativo na média de crescimento de *Salvinia minima*, a partir de 1 mg l⁻¹ de Cr.

Em plântulas de soja foi observada a diminuição da produção de matéria seca da parte aérea e radicular, constatada, na presença de concentrações superiores a 5 mg l⁻¹ de Cr, assim como a redução da fixação biológica de nitrogênio e a absorção de fósforo, potássio, cálcio e magnésio (Castilhos *et al.* 2001).

Vários autores afirmam que a acumulação de Cr pelas plantas, pode induzir a uma redução de crescimento, clorose em folhas jovens, redução de pigmentos, alteração de enzimas funcionais, danos celulares nas raízes e modificações na estrutura dos cloroplastos e membranas celulares (Mc Grath 1985, Panda & Patra 1997, Panda & Dash 1999, Panda 2003, Panda *et al.* 2003).

Manifestações similares às encontradas no presente trabalho em *R. diphyllum* (Fig. 10), foram detectados por Garg *et al.* (1994), na macrófita aquática *Limnanthemum cristatum*: a redução do comprimento das raízes, a falta de coloração ou uma coloração parda e não esverdeada como a do controle, além de significativas mudanças morfológicas, como a produção de raízes atrofiadas e de coloração castanha, quando submetida ao desenvolvimento em meio contendo 1 ppm de Cr, visto que o controle apresentava raízes alongadas e de coloração esverdeada. Wilson e Al-Hamdani (1997) relataram que Cr induziu alterações similares no crescimento de *Azolla caroliniana*.

A inibição do crescimento decorrente da fitotoxicidade por Cr é atribuída a uma série de eventos, como a redução na captura de nutrientes (Nichols, Couch e Al-Hamdani 2000); o estresse oxidativo que inicia a degradação dos pigmentos fotossintéticos (Panda & Choudhury 2005); e a ausência da divisão celular, provavelmente devido a aberrações cromossômicas (Liu *et al.* 1993).

Os resultados dos experimentos com a mistura de Cr (VI) e Ni, numa primeira análise parecem contraditórios se comparados com os testes de Cr e Ni isoladamente. Contudo, há indicações de que a bioabsorção de Cr (VI) e Ni (entre outros metais pesados) está também relacionada com o pH da solução, temperatura e concentração inicial de íons metálicos (Ozer & Ozer 2003). A assimilação de Cr ou Ni pela biomassa de algas do gênero *Ecklonia* Hornemann (Lessoniaceae, Laminariales) diminui na presença de um ou do outro metal pesado. Um outro fator é a possibilidade da redução do cromo hexavalente (VI) a trivalente, que é uma forma relativamente inócua e menos móvel que a hexavalente (Cervantes *et al.* 2001). O Cr (VI) uma vez reduzido a Cr (III), pode reagir com o Ni, formando um novo composto (Yu *et al.* 1988). A precipitação do metal e a possibilidade da sua reação com outros elementos incluindo o Ni (Park *et al.* 2006), também pode alterar o

resultado da mistura combinada de Cr e Ni, em relação à ação isolada de cada um deles.

O crescente desenvolvimento industrial sem o necessário cuidado no tratamento e disposição de resíduos e eflúvios está levando a um aumento do carreamento de poluentes prejudiciais aos ecossistemas. Por isso, estudos sobre a ação destes contaminantes se tornam cada vez mais necessários, para que possamos avaliar, quantificar e definir níveis toleráveis ao desenvolvimento dos organismos vivos.

Considerando o impacto negativo dos metais pesados Cr e Ni na germinação de megásporos e desenvolvimento inicial de *R. diphyllum*, sugere-se um controle mais rigoroso no lançamento de efluentes contendo estes contaminantes, sendo esta, uma estratégia necessária para o estabelecimento e conservação de populações de *R. diphyllum*, visto que, a espécie já é considerada como ameaçada.

Agradecimentos

Os autores expressam seus agradecimentos, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia – UNISINOS, pela oportunidade da realização deste trabalho; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Prosup), pela concessão da bolsa de mestrado, concedida à primeira autora; ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) pela bolsa e auxílio ao segundo autor.

Referências Bibliográficas

- Barcelo, J. & Poschenrieder, C. 1997 Chromium in plants. pp.101-129 In: Carati, S.; Tottarelli, F. & Seqmi, P.(eds)., **Chromium Environmental Issue**,. Francotangati Press, Milan.
- Berton, R.S.; Pires, A.M.M.; Andrade, S.A.L.; Abreu, C.A.; Ambrosano, E. & Silveira, A.P.D. 2006. Toxicidade do níquel em plantas de feijão e efeitos sobre a microbiota do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 8 (41)1305-1312.
- Bolt, G.H. & Bruggenwert, M.G.M. (ed). 1978. **Soil Chemistry. Part A - Basic Elements**. Amsterdam, Elsevier, 317p.
- Branco, S.M. 1991. Caracterização da qualidade da água. In ABRH (ed) **Hidrologia**

Ambiental (3):27-65.

Castilhos, D.D.; Costa, C.N.; Passianoto, C.C.; Lima, A.C. R. & Muller, V. 2001. Adição de cromo hexavalente no crescimento, nodulação e absorção de nutrientes em soja.

Ciência Rural 6:6-13.

Cervantes, C.; Campos-Garcia, J.; Devars, S.; Gutiérrez-Corona, F.; Loza-Tavera, H. Torres-Guzmán, J.C. & Moreno-Sánchez, R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. **FEMS Microbiology Reviews** 3 (25):335-347.

Esteves, F. A. 1988. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência – FINEP.

Fadigas, F. de S.; Amaral-Sobrinho, N. M. B. do.; Mazur, N.; Anjos, L. H. C. dos & Freixo, A. A. 2002. Concentrações naturais de metais pesados em algumas classes de solos brasileiros. **Bragantia** 61 (2): 151-159.

Garg, P.; Chandra, P. & Devi, S. 1994. Chromium (VI) induced morphological changes in *Limnanthemum cristatum* Griseb.: A possible bioindicator. **Phytomorphology** 44 (3-4):201-206.

Guillizzoni, P.; Adams, M.S. & N. McGaffey. 1984. The effect of chromium on growth and photosynthesis of a submerged macrophyte, *Meriophyllum spicatum*. pp. 90-96. In: Rasmussen (ed.), **Ecotoxicology: Proceedings of the third Oikos Conference**. Ecological Bulletins. Stockholm.

Liu, C.L. & Wang, Y.P. 1993 Effect of nickel contamination in different soils on the growth of crops. **Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society** 31:172-182.

Mahlberg, P. G. & Baldwin, M. 1975. Experimental studies on megaspore viability, partenogenesis and sporophyte formation in *Marsilea*, *Pilularia* and *Regnellidium*. **Botanical Gazette** 136 (3): 269-273.

Mc Grath, S.P. 1985 Chromium and nickel. pp.139-155. In Alloway, B.J. (eds). **Heavy metals in soil**. Chapman and Hall, London, UK.

Mitteregger-Junior, H.; Ferraz-Dias, J.; Lúcia-Yonema, M.; Arenzon, A.; Silva J. & Pegas-

- Henriques, J.A. 2006. Avaliação das atividades tóxicas e mutagênicas da água e do sedimento do arroio Estância Velha, região coureiro-calçadista, utilizando *Allium cepa*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology** 2 (1):147-151.
- Montvydiene, D. & Marciulioniene, D. 2004. Assessment of toxic interactions of heavy metal in a multicomponent mixture using *Lepidium sativum* and *Spirodela polyrrhiza*. **Environmental Toxicology** 19 (4):351-358
- Naime, R. & Fagundes, R.S. 2005. Controle da qualidade da água do Arroio Portão – Portão, RS. **Pesquisas em Geociências** 32 (1):27-35.
- Nichols, P.B.; Couch, J.D. & Al-Hamdani, S.H. 2000. Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. **Aquatic Botany** 68:313-319.
- Nickel Institute. Ecotoxicity of Nickel-Containing Substances. The Basic Science Papers. Disponível na Internet: http://www.nickelinstitute.org/index.cfm/ci_id/100la_id/1.htm. Arquivo capturado em 20 de dezembro de 2006.
- Nriagu, J. O. & Pacyna, J. M. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, waters, and soils with trace metal. **Nature** 333:134-139.
- Ozer, A. & Ozer, D. 2003. Comparative study of the biosorption of Pb(II), Ni(II) and Cr(VI) ions onto *S. cerevisiae*: determination of biosorption heats. **J. Hazard. Mater.** 100 (1-3):219-229.
- Panda, S. K. & Choudhury, S. 2005. Chromium stress in plants. **Brazilian Journal Plant Physiology** 17 (1):95-102
- Panda, S. K; Chaudhury, I. & Khan, M. H. 2003. Heavy metals induced lipid peroxidation and affects antioxidants in wheat leaves. **Biol. Plant.** 46:289-294.
- Panda, S.K. & Dash, M. 1999. Regulation of senescence by Cr (VI) ions in excise wheat leaves. **J. Nat. Bot. Soc.** 53:35-37.
- Panda, S.K. & Patra, H.K. 1997. Physiology of chromium toxicity in plants – A review. **Plant Physiology and Biochemistry.** 24 (1):10-17.

- Panda, S.K. 2003. Heavy metal phytotoxicity induced oxidative stress in *Taxithelium* sp. **Current Science** **84**:631-633.
- Park, D.; Yun, Y.S.; Yim, K.H. & Park, J.M. 2006. Effect of Ni(II) on the reduction of Cr(VI) by *Ecklonia* biomass. **Bioresour Technology** **97** (14):1592-1598.
- Paz, A. & Bassagoda, M. J. 2002. Revisión de las Marsileaceae del Uruguay y primera cita de *Pilularia americana* A. Braun. **Comunicaciones Botánicas-Museos Nacionales de Historia Natural y Antropología** **125** (6):18.
- Piccini, D. F. & Malavolta, E. 1992 Effect of nickel on two common bean cultivars. **Journal of Plant Nutrition** **15**:2343-2350.
- Poschenrieder, C.; Vazquez, M.D.; Bonet, A. & Barcelo, J. 1991. Chromium III iron interaction in iron sufficient and iron deficient bean plants. II ultrastructural aspects. **Journal of Plant Nutrition** **14**:415-428.
- Reinfelder, J.R.; Fisher, N. S.; Luoma, S. N.; Nichols, J. W. & Wang, W.X. 1998. Trace elements trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. **The Science of the Total Environment** **219**:117-135
- Rio Grande do Sul. Decreto n° 42.099, de 31 de dezembro 2002. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção do Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. **Diário Oficial do Rio Grande do Sul**, ano LXII, nº1, p. 1-6, 2003.
- Robaina, L.E., Formoso, M.L.L. & Pires, C.A.F. 2002. Metais pesados nos sedimentos de corrente, como indicadores de risco ambiental – Vale do Rio dos Sinos, RS. **Revista do Instituto Geológico** **23** (2):35-47.
- Roos, M.C. 1995. **Charting tropical plant diversity: Europe's contribution and potential.** Working document European Science Foundation/Linnean Society/Rijksherbarium Hortus Botanicus/Systematics Association workshop "Systematics Agenda 2000: the challenge for Europe", Leiden.

- Santana, D. G. & Ranal, M. A. 2004. **Análise da germinação: um enfoque estatístico**. Brasília: UNB, 248p.
- Schultz, A. R. 1949. Contribuições ao conhecimento de *Regnellidium diphyllum* Lindman. **Lilloa XVII**: 139-144.
- Sing, S.N.1984. Effects of nickel on germination and growth, total nitrogen and phosphate levels of *Cicer arretinum* L. seedlings. **Tropical Ecology 1** (25):90-94.
- Smith, R.P. 1993. **A primer of environmental toxicology**. Lea & Fabiger pub. p. 142-150.
- Soares, M.C.C.; Mizusaki, A.M.P. & Vignol, M.L. 2004. Análise geoquímica dos sedimentos de fundo do arroio Salso, Porto Alegre - RS – Brasil. **Pesquisas em Geociências 31** (1):39-50.
- Sota, E.R. & Mitchell, D. S. 1970. Sobre la presencia de *Regnellidium diphyllum* Lindman (Marsileaceae-Pteridophyta) en Argentina. **Darwiniana 16** (1-2):408-409.
- Wilson, G.; Al-hamdani, S. 1997. Effects of chromium (VI) and humic substances on selected physiological responses of *Azolla caroliniana*. **American Fern Journal** (87):17-27.
- Yu, P.; Yves, J. & Kahn, O. 1989. Ferromagnetic interactions between t_{2g}^3 and e_g^2 magnetic orbitals in a $Cr^{III}Ni^{II}_3$ tetranuclear compound. **Inorganic Chemical 28**:100-103.
- Zar, J. H. 1999. **Biostatistical analyses**. 4^a ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall. 931p.

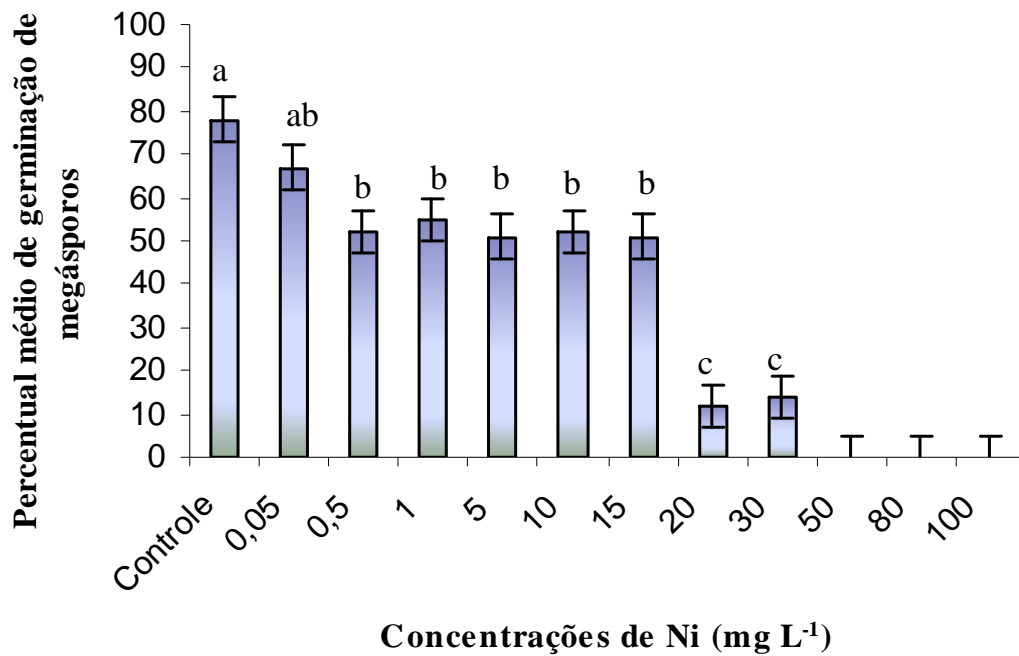


Fig. 1 - Porcentagem média de germinação de megásporos com formação de esporófitos de *Regnellidium diphyllum* Lindman em diferentes concentrações de Ni, após três semanas de tratamento. (F=68,393; gl=11,24; P<0,001) (n=4x25).

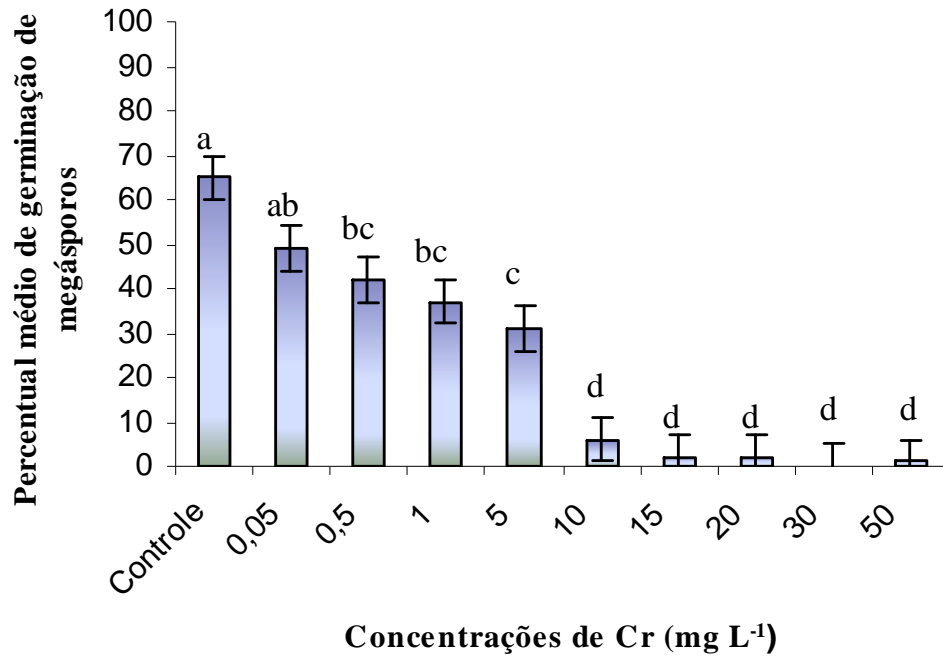


Fig. 2 - Percentual médio de germinação de megásporos com formação de esporófitos de *Regnellidium diphyllum* Lindman em diferentes concentrações de Cr, após três semanas de tratamento. (F=42,229; gl=9,24; P<0,001) (n=4x25).

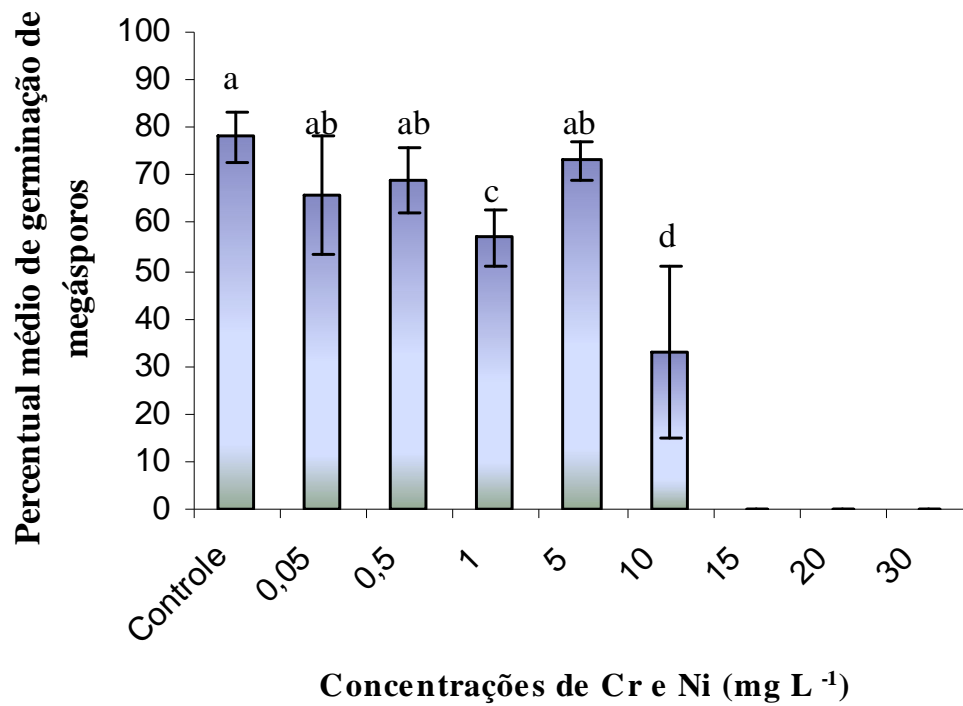


Fig. 3 - Percentual médio de germinação de megásporos com formação de esporófitos de *Regnellidium diphyllum* Lindman, em diferentes concentrações de Cr e Ni na mesma solução, após três semanas de tratamento. (F=66,310; gl=8,24; P<0,001) (n=4x25).

Tabela 1. Influência de diferentes concentrações de Ni, no crescimento de *Regnellidium diphyllum* Lindman. Média do comprimento da raiz, folha primária e folha secundária, após uma e quatro semanas em cultura. O valor de H corresponde ao teste de Kruskal Wallis. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Dunn a 5% de probabilidade.

| Ni mg L ⁻¹ | Comp. raiz primária (mm) | | Comp. folha primária (mm) | | Comp. folha secundária (mm) | |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|
| | 1 ^a semana | 4 ^a semana | 1 ^a semana | 4 ^a semana | 1 ^a semana | 4 ^a semana |
| 0,0 | 5,72 ± 1,30 ab | 6,80 ± 0,72 a | 8,0 ± 0,86 a | 10,12 ± 0,50 a | 0,86 ± 0,43 a | 9,04 ± 0,75 a |
| 0,025 | 4,14 ± 2,57 abc | 4,88 ± 3,03 ab | 6,62 ± 3,80 ab | 8,28 ± 4,24 a | 0,86 ± 0,64 ab | 8,45 ± 4,60 a |
| 0,05 | 3,01 ± 0,67 bcd | 4,36 ± 1,26 ab | 5,28 ± 1,47 ab | 7,32 ± 2,11 a | 0,46 ± 0,31 ab | 7,72 ± 1,80 a |
| 0,1 | 4,22 ± 0,92 abc | 5,42 ± 1,68 a | 11,1 ± 28,75 a | 9,36 ± 1,44 a | 0,54 ± 0,36 a | 9,56 ± 1,51 a |
| 0,2 | 3,62 ± 0,72 abcd | 4,80 ± 0,88 ab | 6,06 ± 0,62 ab | 8,64 ± 1,08 a | 0,44 ± 0,32 ab | 8,86 ± 1,03 a |
| 0,4 | 2,42 ± 0,68 cd | 3,30 ± 1,40 ab | 5,40 ± 1,18 ab | 7,96 ± 1,60 a | 0,50 ± 0,32 ab | 8,44 ± 1,63 a |
| 0,8 | 5,46 ± 0,81 abc | 6,66 ± 0,70 a | 8,68 ± 0,59 a | 10,56 ± 1,29 a | 0,86 ± 0,33 a | 9,66 ± 2,02 a |
| 1,6 | 6,14 ± 2,05 a | 7,04 ± 2,25 a | 9,06 ± 1,93 a | 10,92 ± 2,69 a | 0,90 ± 0,53 a | 8,60 ± 1,32 a |
| 3,2 | 3,24 ± 1,80 abcd | 4,26 ± 1,87 ab | 4,46 ± 1,81 ab | 6,26 ± 1,98 ab | 0,26 ± 0,37 ab | 6,04 ± 2,44 ab |
| 4,8 | 0,64 ± 1,43 d | 1,16 ± 2,59 b | 1,02 ± 2,28 b | 1,52 ± 3,40 b | _____ | 1,68 ± 3,76 b |
| | H=30,478; gl=9,24; | H=26,061; gl=9,24; | H=32,972; gl=9,24; | H=28,441; gl=9,24; | H=20,66; gl=8,24; | H=18,208; |
| | P<0,001 | P<0,001 | P<0,001 | P<0,001 | P=0,014 | gl=9,24; P=0,033 |

Tabela 2. Influência de diferentes concentrações de Cr, no crescimento de *Regnellidium diphyllum* Lindman. Média do comprimento da raiz, folha primária e folha secundária, após uma e quatro semanas em cultura. O valor de H corresponde ao teste de Kruskal Wallis. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Dunn a 5% de probabilidade.

| Cr mg L ⁻¹ | Comp. raiz primária (mm) | | Comp. folha primária (mm) | | Comp. folha secundária (mm) | |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | 1ª semana | 4ª semana | 1ª semana | 4ª semana | 1ª semana | 4ª semana |
| 0,0 | 5,72 ± 1,30 a | 6,80 ± 0,72 a | 8,0 ± 0,86 a | 10,12 ± 0,50 a | 0,86 ± 0,43 a | 9,04 ± 0,75 a |
| 0,025 | 5,04 ± 1,17 a | 6,10 ± 2,69 ab | 8,36 ± 1,66 a | 6,42 ± 2,20 ab | 0,54 ± 0,34 a | 9,20 ± 0,65 a |
| 0,05 | 2,02 ± 0,67 cd | 2,46 ± 0,40 cde | 4,32 ± 0,44 b | 4,84 ± 1,45 bc | 0,12 ± 0,22 a | 6,04 ± 0,93 ab |
| 0,1 | 4,24 ± 1,20 abc | 5,10 ± 1,11 abc | 7,60 ± 1,46 a | 6,60 ± 2,66 ab | 0,08 ± 0,13 a | 8,80 ± 2,35 a |
| 0,2 | 2,06 ± 0,77 cd | 2,48 ± 1,23 cde | 4,82 ± 2,02 b | 4,40 ± 2,98 bcd | 0,16 ± 0,22 a | 6,28 ± 1,28 ab |
| 0,4 | 2,49 ± 1,40 bcd | 3,14 ± 1,53 cde | 8,72 ± 0,44 a | 8,16 ± 0,97 ab | 0,83 ± 0,63 a | 7,0 ± 1,05 a |
| 0,8 | 4,86 ± 1,47 ab | 5,46 ± 1,16 abc | 8,72 ± 0,44 a | 10,40 ± 0,60 a | 0,85 ± 0,54 a | 9,0 ± 1,24 a |
| 1,6 | 3,96 ± 2,12 abc | 3,72 ± 3,00 bcd | 8,18 ± 1,68 a | 8,40 ± 3,57 ab | 0,80 ± 0,76 a | 8,64 ± 3,38 a |
| 3,2 | 0,15 ± 0,16 d | 0,00 ± 0,00 e | 0,62 ± 0,84 c | 0,00 ± 0,00 d | _____ b | _____ c |
| 4,8 | 0,38 ± 0,55 d | 0,56 ± 0,78 d | 1,18 ± 1,81 c | 1,64 ± 2,48 cd | _____ b | 2,48 ± 4,08 cd |
| | H=37,752; gl=9,24; P<0,001 | H=37,016; gl=9,24; P<0,001 | H=36,703; gl=9,24; P<0,001 | H=36,571; gl=9,24; P<0,001 | H=31,894; gl=7,24; P<0,001 | H=30,838; gl=8,24; P<0,001 |

Tabela 3. Influência de Cr e Ni em proporções iguais na mesma solução, no crescimento de *Regnellidium diphyllum* Lindman. Média do comprimento da raiz, folha primária e folha secundária, após uma e quatro semanas em cultura. O valor de H corresponde ao teste de Kruskal Wallis. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Dunn a 5% de probabilidade.

| Cr e Ni mg L ⁻¹ | Comp. raiz primária (mm) | | Comp. folha primária (mm) | | Comp. folha secundária (mm) | |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | 1ª semana | 4ª semana | 1ª semana | 4ª semana | 1ª semana | 4ª semana |
| 0,0 | 5,72 ± 1,30 ab | 6,80 ± 0,72 a | 8,0 ± 0,86 abc | 10,12 ± 0,50 a | 0,86 ± 0,46 a | 9,04 ± 0,75 a |
| 0,025 | 5,70 ± 1,73 ab | 6,58 ± 1,84 a | 8,86 ± 2,02 ab | 10,68 ± 1,10 a | 0,80 ± 0,29 ab | 9,48 ± 0,84 a |
| 0,05 | 4,48 ± 1,56 abc | 6,16 ± 1,90 ab | 7,42 ± 1,07abc | 10,04 ± 0,99 a | 0,30 ± 0,19 bcd | 9,72 ± 1,68 a |
| 0,1 | 3,78 ± 1,93 bcd | 5,64 ± 2,60 ab | 5,86 ± 1,59cd | 8,76 ± 2,41 a | 0,02 ± 0,04 d | 11,08 ± 2,63 a |
| 0,2 | 2,46 ± 0,96 cde | 3,40 ± 0,88 bc | 5,80 ± 1,78 cd | 8,72 ± 1,59 a | 0,12 ± 0,18 cd | 8,60 ± 1,69 a |
| 0,4 | 3,26 ± 0,96 bcde | 4,56 ± 1,02 ab | 6,72 ± 1,40 bc | 10,12 ± 0,89 a | 0,04 ± 0,09 d | 9,24 ± 0,48 a |
| 0,8 | 5,32 ± 1,02ab | 6,64 ± 1,14 a | 9,40 ± 0,35 ab | 11,34 ± 0,66 a | 0,58 ± 0,16 abc | 11,32 ± 0,48 a |
| 1,6 | 6,58 ± 1,32 a | 6,86 ± 1,32 a | 9,96 ± 0,33 a | 10,92 ± 0,86 a | 1,02 ± 0,44 a | 11,28 ± 0,81 a |
| 3,2 | 1,22 ± 0,43 de | 0,88 ± 0,92 c | 3,62 ± 1,44 d | 2,60 ± 2,38 b | 0,06 ± 0,09 d | 3,68 ± 3,59 b |
| 4,8 | 0,79 ± 0,41 e | 0,64 ± 0,92 c | 3,10 ± 1,50 d | 1,92 ± 2,10 b | 0,04 ± 0,09 d | 2,72 ± 4,59 b |
| | H=36,231; gl=9,24; P<0,001 | H=34,763; gl=9,24; P=0,001 | H=38,108; gl=9,24; P<0,001 | H=32,702; gl=9,24; P<0,001 | H=38,777; gl=9,24; P<0,001 | H=28,283; gl=9,24; P=0,001 |

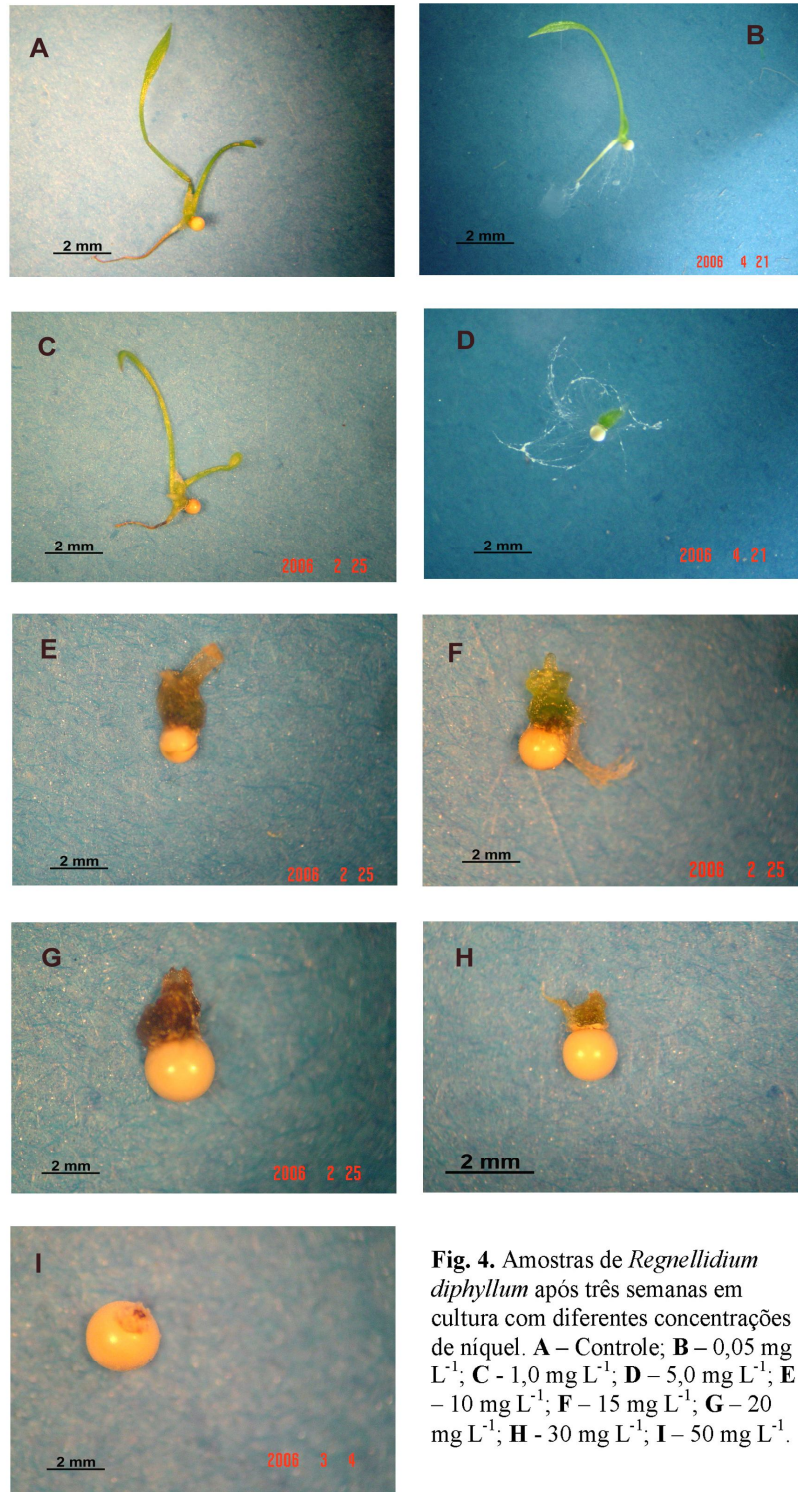


Fig. 4. Amostras de *Regnellidium diphyllum* após três semanas em cultura com diferentes concentrações de níquel. **A** – Controle; **B** – 0,05 mg L⁻¹; **C** - 1,0 mg L⁻¹; **D** – 5,0 mg L⁻¹; **E** – 10 mg L⁻¹; **F** – 15 mg L⁻¹; **G** – 20 mg L⁻¹; **H** - 30 mg L⁻¹; **I** – 50 mg L⁻¹.

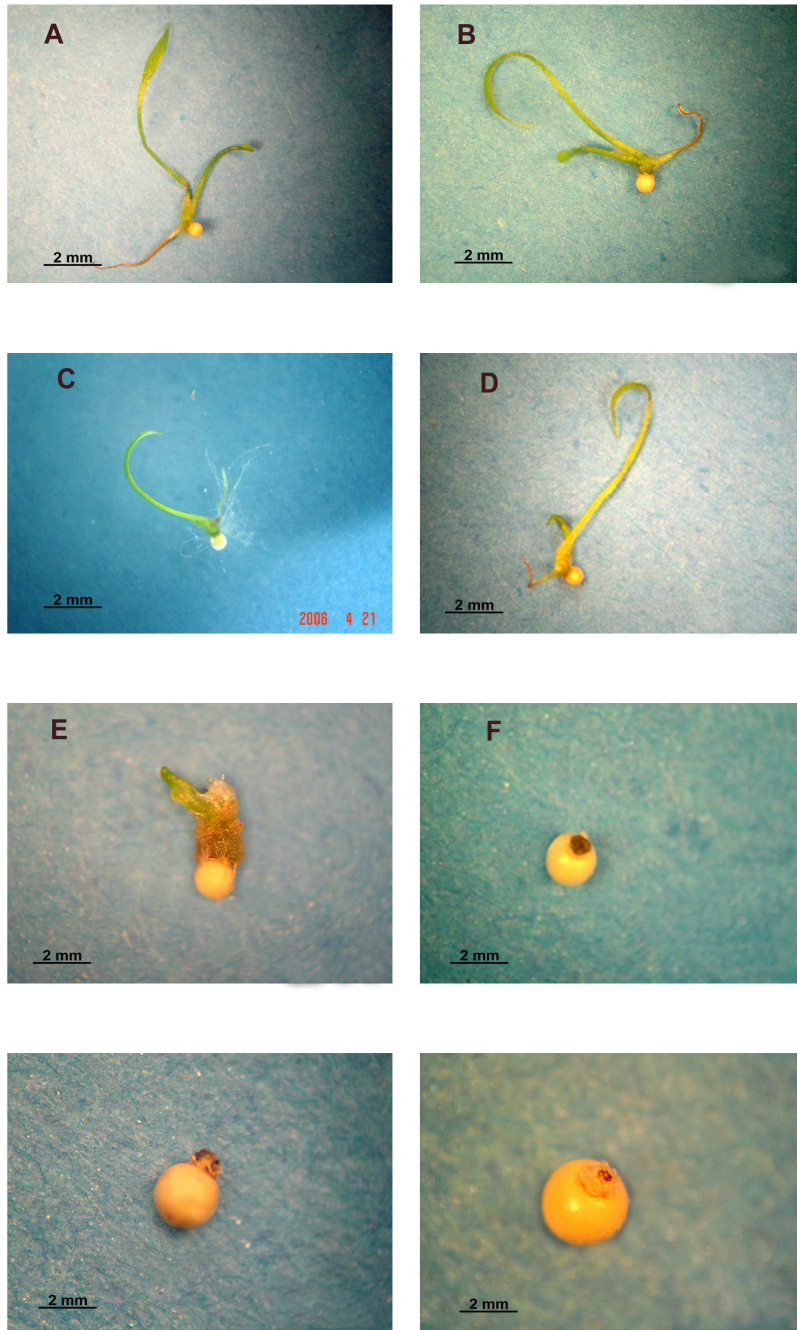


Fig. 5. Amostras de *Regnellidium diphyllum* após três semanas em cultura com diferentes concentrações de cromo. **A** – Controle; **B** – 0,05 mg L⁻¹; **C** - 0,5 mg L⁻¹; **D** – 1,0 mg L⁻¹; **E** – 10 mg L⁻¹; **F** – 15 mg L⁻¹; **G** – 20 mg L⁻¹; **H** - 30 mg L⁻¹.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)