

WASHINGTON MARCONDES FERREIRA NETO

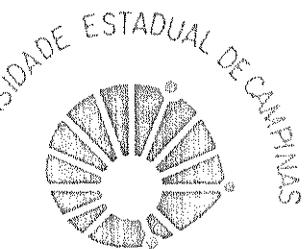
EFEITO DE LUZ E TEMPERATURA NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE
Cyathea delgadii Sternb.

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

Orientador: Dr. Gil M. Felipe

Campinas

1983



COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

UNICAMP

AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PREÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: **Washington Marcondes Ferreira Neto**

Nº de Identificação: **815401**

Endereço para Correspondência: **Av. José de Sousa Campos, 476**

Curso: **Biologia Vegetal**

Nome do Orientador: **Gil Martins Felipe**

Título da Dissertação ou Tese: **Efeito de luz e temperatura na germinação de esporos de Cyathea delgadii Sternb.**

Data proposta para a Defesa: **25/02/83**

(O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir desta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

Data

assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

Data

assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consulte, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o fornecimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a interessados.

07/01/83
Data

Washington Marcondes Ferreira Neto
assinatura do aluno

De acordo
Orientador

Gil Martins Felipe

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Gil Martins Felipe pela sua orientação durante todo este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

A todos os professores, colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal pelo auxílio dado e pela amizade.

Em especial quero agradecer à MS Vera Maxemiuc Naccache, da Seção de Fitoecologia do Instituto de Botânica, São Paulo pela sua orientação na parte sobre extração de lipídios.

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	11
Material	11
Métodos	12
Temperatura	13
Temperaturas constantes e períodos curtos a 5 e 45°C	13
Temperaturas alternadas	14
Luz fluorescente branca	15
Períodos curtos de luz branca	15
Intensidade luminosa	15
Fotoperíodo	16
Vermelho, azul e vermelho-extremo	16
Consumo de oxigênio	18
Determinação de lipídios	18
Análise estatística	20
RESULTADOS	21
Germinação	21
Germinação de esporos em água destilada e solução de Knop	21
Curva de germinação a 25°C	21
Efeito do tipo de armazenamento	24
Efeito de temperatura	24
1. Temperaturas constantes	24

	Página
2. Temperaturas alternadas	28
3. Efeito de períodos de temperaturas baixas e altas	31
3.1. Diferentes períodos de temperatura de 5°C e 45°C	31
3.2. Choque de 60 minutos a 5°C e 45°C após diferentes períodos de embebição	31
Efeito de luz	31
1. Efeito da intensidade luminosa	31
2. Efeito do fotoperíodo	35
3. Efeito de luz fluorescente branca	35
3.1. Diferentes períodos de luz branca após 48 h de embebição	35
3.2. Períodos de 48, 3 e 1 hora de luz branca após diferentes períodos de embebição	38
4. Efeito de vermelho, vermelho-extremo e azul	40
4.1. Efeito de um choque de vermelho, vermelho-extremo e azul	40
4.2. Reversão do efeito do vermelho pelo vermelho-extremo	40
4.3. Efeito de choques diários de uma hora de vermelho, vermelho-extremo, azul e suas combinações	43
Consumo de oxigênio pelos esporos	45
Determinação de lipídios dos esporos	45
DISCUSSÃO	48
RESUMO	56
BIBLIOGRAFIA	58

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> em água destilada e solução de Knop	22
Tabela 2. Germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> armazenados por períodos diferentes e em temperaturas diferentes	25
Tabela 3. Germinação de esporos recém coletados de <i>Cyathea delgadii</i> , em várias temperaturas constantes	26
Tabela 4. Germinação em temperaturas constantes, de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , armazenados a 4°C por 7 meses	27
Tabela 5. Germinação de esporos recém coletados e armazenados por 7 meses a 4°C de <i>Cyathea delgadii</i> , em temperaturas constantes, em luz fluorescente branca constante	29
Tabela 6. Germinação em temperaturas alternadas de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , armazenados a 4°C por 7 meses	30
Tabela 7. Efeito de diferentes períodos de temperatura a 5°C ou a 45°C na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> mantidos a 25°C em escuro constante	32

Tabela 8. Efeito de períodos de 60 minutos a 5°C ou a 45°C, após diferentes períodos de embebição a 25°C no escuro, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i>	33
Tabela 9. Efeito de luz fluorescente branca, de diferentes intensidades, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i>	34
Tabela 10 Efeito de diferentes fotoperíodos na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i>	36
Tabela 11 Efeito de períodos diferentes em luz branca, após embebição por 48 horas, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> mantidos no escuro	37
Tabela 12 Efeito de um período de 1, 3 ou 48 horas de luz fluorescente branca, após diferentes períodos de embebição, em esporos de <i>Cyathea delgadii</i> mantidos sob condição de escuro ...	39
Tabela 13 Efeito de períodos de vermelho, azul e vermelho-extremo na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> após 24 ou 48 horas de embebição no escuro	41
Tabela 14 Reversão do efeito de choques diários de vermelho (V) pelo vermelho-extremo (VE) na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i>	42

Tabela 15 Efeitos de choques diários de 1 hora de vermelho (V), vermelho-extremo (VE) e azul e suas combinações na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i>	44
Tabela 16 Determinação de lipídios em esporos de <i>Cyathea delgadii</i>	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Curva de germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> recém coletados	23
Figura 2. Consumo de oxigênio por esporos de <i>Cyathea delgadii</i> durante os primeiros dias da germinação	46

INTRODUÇÃO

O efeito da luz sobre a germinação vem sendo estudado há muito tempo, tanto em sementes como em esporos.

É bem sabido que esporos de diversas samambaias homósporas germinam em número substancial somente após exposição a luz de comprimentos de onda relativamente específicos. Poucas espécies de samambaias têm esporos capazes de germinar no escuro, e, entre as que apresentam germinação no escuro, muitas requerem tratamentos indutivos especiais (Miller, 1968).

O comportamento de uma população de esporos após exposição a comprimentos de onda específicos, varia de espécie para espécie. Algumas vezes a variação é até intraespecífica. Por causa desta variedade de respostas, é difícil de se desenvolver um modelo simples para explicar o papel da luz na germinação de esporos de samambaias. Para a construção de tal modelo, é necessário o conhecimento dos efeitos da luz na germinação de diversas espécies (Huckaby e Raghavan, 1981).

Towill e Ikuma (1975a) dividem o processo de germinação de esporos de samambaia, controlado pela luz, em três fases: pré-indução, indução e a fase de pós-indução.

A fase de pré-indução no escuro, é conseguida através de exposição à água e condições aeróbicas. O tempo de hidrata-

ção do esporo varia de 3 a 36 horas, dependendo da espécie e das condições ambientais (Miller, 1968).

Alguns estudos realizados com *Onoclea sensibilis* em atmosfera de nitrogênio, mostraram que um meio aeróbico é essencial para que se possa mostrar a fotorreversibilidade em esporo (Towill e Ikuma, 1975a). Com a remoção da atmosfera de nitrogênio para a de oxigênio, a recuperação da anaerobiose é rápida, sendo repetidamente reversível entre ar e nitrogênio, o que sugere que o oxigênio molecular participa diretamente no desenvolvimento e manutenção da fotossensibilidade (Howland e Edwards, 1979). Uma outra explicação para a necessidade de oxigênio na pré-indução é o possível acúmulo, sob condições anaeróbicas, de um inibidor como o etanol, que é, em altas concentrações, tóxico a células vegetais (Howland e Edwards, 1979).

A sensibilidade do esporo à luz, é perdida na presença de 0,1 mM de cicloheximida, um inibidor de síntese protéica. Se os esporos embebidos em condições aeróbicas são tratados com cicloheximida por tempos crescentes antes da indução pela luz, a redução da fotossensibilidade é de 1% por minuto. A metade da inibição é alcançada em 45 minutos de incubação e a inibição máxima é atingida em 2 horas. Pode-se concluir que proteínas são sintetizadas durante a pré-indução no escuro e que estas proteínas são necessárias para a manutenção da fotossensibilidade. A germinação é recuperada quando os esporos são lavados com água destilada para retirar a cicloheximida, indicando que a síntese de proteínas é reiniciada quando o inibidor é removido. Estes dados indicam que as enzimas ou proteínas necessárias para a manutenção da fotossensibilidade, são continuamente sintetizadas durante o período de pré-indução, e a taxa de síntese pode ser

maior que a de sua utilização (Towill e Ikuma, 1975b). Os esporos não são injuriados pelo tratamento anaeróbico e um processo oxidativo é necessário para o desenvolvimento e manutenção da sensibilidade dos esporos à irradiação (Towill e Ikuma, 1975a).

A fase de pré-indução é sensível à temperatura. Tratamentos a 40°C no escuro por 8 ou mais horas, diminuem a fotossensibilidade, mas esta diminuição pode ser revertida se os esporos forem colocados a 25°C no escuro. Temperaturas abaixo de 25°C causam pouca inibição e de 30 e 35°C estimulam a germinação (Chen e Ikuma, 1979).

A fase de indução é a que tem recebido maior atenção dos pesquisadores. Durante esta fase há absorção de luz e é acionado o processo de germinação. Esta fase consta de reação fotoquímica independente da temperatura e oxigênio (Towill e Ikuma, 1975a). Os esporos sensíveis à luz para germinar são, à semelhança de sementes, denominados fotoblásticos.

Esta denominação foi criada por Evenari (1965) para sementes. São chamadas de fotoblásticas positivas aquelas sementes que necessitam de luz para germinar e de fotoblásticas negativas as sementes cuja germinação é inibida pela luz branca. O fotoblastismo é bastante comum, por exemplo, em sementes de ervas invasoras, como foi mostrado por Polo e Felipe (1981) e Polo e Felipe (1983). Em algumas sementes, a necessidade de luz para germinar somente ocorre logo após a colheita; em outras, como por exemplo *Epilobium parviflorum*, o fotoblastismo persiste por mais de um ano (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975). Em outras espécies, como *Cucumis anguria*, a semente passa de indiferente à luz a fotoblástica negativa, à medida que se aumenta o período de armazenamento (Noronha *et al.* 1976).

Flint e McAlister (1935, 1937) trabalhando com sementes fotoblásticas positivas de alface, mostraram que a maior promoção da germinação ocorria na região vermelha do espectro e que a inibição máxima ocorria na região do espectro que mais tarde foi chamada de vermelho-extremo. Em 1952, Borthwick *et al.*, utilizando sementes fotoblásticas de alface, postularam a existência de um pigmento único, responsável pela germinação dessas sementes sensíveis à luz. Em 1959, Butler *et al.*, isolaram este pigmento a partir de plântulas estioladas de milho, que foi denominado fitocromo.

O fitocromo é encontrado nas plantas sob duas formas interconversíveis pela luz: a forma Fv cujo pico de absorção está a 660 nm (vermelho) e a forma Fve, cujo pico de absorção está a 730 nm (vermelho-extremo). A forma fisiologicamente ativa é a Fve. Quando as sementes são postas para germinar em luz vermelha, o fitocromo na forma Fv absorve este comprimento de onda e se transforma em Fve, promovendo a germinação. Se as sementes forem postas para germinar em vermelho-extremo, o fitocromo que está sob a forma Fve absorve este comprimento de onda e passa para a forma Fv, que é fisiologicamente inativa, e a germinação não ocorre (Mohr, 1972). A alternância de exposição ao vermelho e vermelho-extremo irá provocar a promoção ou a inibição da germinação, sendo que a resposta final dependerá do último comprimento de onda dado, isto é: se a última exposição foi ao vermelho-extremo, a germinação será inibida e se foi ao vermelho, a germinação será promovida (Borthwick *et al.*, 1952). A luz vermelha também promove a germinação de esporos de samambaias, como será mostrado a seguir.

Em *Onoclea sensibilis* a maior taxa de germinação é obti

da na região do vermelho do espectro (620-680 nm), se os esporos forem submetidos a quantidades saturantes (Towill e Ikuma, 1973).

Em *Pteris vittata* a germinação dos esporos é promovida pelo vermelho e inibida pelo vermelho-extremo e azul, sendo que a inibição pelo vermelho-extremo pode ser revertida por nova exposição ao vermelho, mas que a inibição pelo azul não pode ser revertida por choques de vermelho dados logo após. No entanto, aumentando-se o intervalo de escuro entre os choques, há um aumento na germinação, sendo que dois dias de intervalo restauravam metade da germinação e o máximo de restauração da germinação foi obtido com intervalo de três dias. Se o experimento em vez de a 25°C fosse feito a 10°C, somente poucos esporos respondiam ao vermelho, indicando um possível sistema metabólico envolvido na restauração da germinação (Sugai e Furuya, 1967; 1968). Níveis baixos de etanol bloqueiam a fotoinibição da germinação de esporos de *Pteris vittata* pela luz azul (Sugai, 1970).

Esporos de *Thelypteris kunthii* requerem um período relativamente longo de exposição à luz vermelha para germinar, mas períodos intermitentes são quase tão efetivos. Uma explicação para isto seria que a fotoindução da germinação destes esporos depende não só do número de quanta interceptados pelos esporos, mas também da duração da exposição (Huckaby e Raghavan, 1981).

Em *Dryopteris crassirhizoma* os esporos germinam melhor com uma exposição de 12 h ou mais à luz mas, o período de luz é mais efetivo se dividido em duas partes por um período de 15 a 20 h de escuro. Assim, 3 h de luz - 15 h de escuro - 3 h de luz são equivalentes a 21 h de luz (Isikawa e Oohusa, 1956).

Em *Polypodium aureum* 1, 3 ou 5 dias de luz azul não induzem a germinação; 1 dia de vermelho seguido de 1, 3 ou 5 dias de azul reduzem a porcentagem de germinação. Depois de 3 ou 5 dias de vermelho, a luz azul não tem efeito inibidor, em relação à germinação. Entretanto, 1, 3 ou 5 dias de luz azul seguidos de 1, 3 ou 5 dias de luz vermelha aumentaram a germinação em relação à germinação encontrada após 3 dias de exposição ao vermelho (Spiess e Krouk, 1977).

O efeito promotor da luz vermelha em *Pteris vittata* é típico de uma reação mediada pelo fitocromo e um sistema com um pigmento desconhecido, que absorve luz azul e bloqueia a indução da germinação pelo vermelho. A inibição pela luz azul pode ser revertida por irradiações intermitentes de luz vermelha. Duas breves exposições à luz vermelha, 0 e 8 h após exposição à luz azul são menos efetivas que 3 exposições 0, 4 e 8 h após a exposição à luz azul. Quando cada exposição à luz vermelha intermitente é seguida por uma exposição à luz vermelho-extremo, a germinação é completamente inibida. O efeito é repetidamente reversível em ambas as direções. Portanto, um sistema de fitocromo parece estar envolvido não somente na fotoindução da germinação de esporos semeados no escuro, mas também na restauração da germinação de esporos tratados pela luz azul, ao estado de esporos semeados no escuro. Por isso, desde que os esporos semeados no escuro precisem de uma exposição ao vermelho, os esporos após sofrerem exposição à luz azul precisam de repetidas exposições ao vermelho para germinar, sendo a primeira para restaurá-los ao estado de esporos mantidos no escuro e as demais para a indução da germinação (Sugai e Furuya, 1968).

Em *Cheilanthes farinosa*, o vermelho-extremo só conse-

que reverter o efeito do vermelho quando os esporos foram primeiramente expostos ao azul. Ainda não existe uma explicação convincente para a falta de reversibilidade inicial ao vermelho pelo vermelho-extremo, embora pareça que exista um pigmento que absorva luz azul que inibe de alguma maneira a conversão do fitocromo da forma ativa (Fve) para a inativa (Fv). Por isso, quando os esporos são expostos à luz azul, este pigmento é removido por uma reação fotoquímica e o Fve que foi formado por uma subsequente exposição à luz vermelha, pode ser revertido pelo vermelho-extremo. Os esporos ficam insensíveis ao vermelho se estes são previamente expostos ao azul. Baseando-se na hipótese de existir um pigmento que absorve a luz azul, talvez enquanto o pigmento em seu estado nativo inibe a transformação $Fve \rightarrow Fv$, em seu estado "oxidado" ele inibe o inverso ($Fv \rightarrow Fve$) (Raghavan, 1973).

Os fotorreceptores da inibição da germinação de esporos pela luz azul poderiam ser o fitocromo e os carotenóides. A possibilidade de ser o fitocromo o fotorreceptor da luz azul pode ser negada pelas seguintes razões: a) a inibição de germinação de esporos induzida pela luz azul não é revertida pela exposição à luz vermelha imediatamente após a exposição à luz azul; b) os padrões do espectro de ação para inibição da germinação de esporos, antes e depois da exposição ao vermelho, foram semelhantes. Um outro possível pigmento envolvido na germinação de esporos de *Pteris vittata* seria a violaxantina, um carotenóide de ampla ocorrência cuja estrutura é precursora do ácido abscísico. Este pigmento pode ser convertido em substâncias inibidoras da germinação, como o ácido abscísico, pela exposição à luz azul. O espectro de absorção da violaxantina é parecido com o espectro de ação da inibição de germinação dos esporos de

Pteris vittata. Kumagai e Oda (1969) trabalhando com um fungo, *Alternaria tomato*, sugeriram a existência de um pigmento que absorve a luz azul. Este pigmento teria sua ação revertida pela luz ultravioleta, mas a inibição da germinação de esporos de *Pteris vittata* não foi revertida por luz ultravioleta, indicando ser este pigmento diferente daquele de *Alternaria tomato* (Sugai, 1971).

Em esporos de *Botrychium dissectum* foi verificado que só ocorria germinação em esporos colocados no escuro, sendo que luz inibe a germinação. Outros fatores, que não luz e escuro, não têm efeito significativo na germinação. A necessidade de escuro para a germinação de *Botrychium dissectum* não é surpreendente pois, os protalos são subterrâneos e então os esporos teriam de estar cobertos pelo solo para poderem germinar (Whittier, 1973).

Às vezes, a reação à luz pode ser alterada pela temperatura. Em *Onoclea sensibilis* a temperatura de 30°C pode induzir germinação máxima no escuro, chegando a cerca de 60 a 95% daquele induzido por luz vermelha em doses saturantes. Não foi verificado comportamento aditivo nas interações de luz e temperatura. Quando os esporos colocados para germinar no escuro ficavam um mínimo de 12 h a 25°C antes do tratamento a 30°C, havia uma perda da termossensibilidade. Este efeito não ocorria se os esporos eram postos para embeber em agentes osmóticos como manitol ou polietilenoglicol. Isto sugere que o grau de hidratação e possivelmente mudanças nas propriedades das membranas, têm um papel na mudança de sensibilidade dos esporos de *Onoclea sensibilis* à temperatura (Towill, 1978).

A mais longa fase da germinação é a pós-indução, que é

o período entre a indução e a emergência do rizóide ou célula protonemal. Muitas mudanças bioquímicas e citológicas ocorrem nesta fase, e todas estas mudanças são consideradas dependentes da fase de pré-indução e indução (Howland e Edwards, 1979).

A fase de pós-indução também é sensível à temperatura. Temperaturas de 40°C inibem se forem aplicadas logo após a irradiação mas, perdem o efeito se forem aplicadas 6 ou mais horas após a irradiação. Se os esporos forem submetidos, após a irradiação, a 40°C, ocorrerá inibição da germinação, que poderá ser revertida se for dado então um tratamento a 25°C no escuro e então novamente a irradiação. Esta inibição e recuperação ocorre mais depressa na pós-indução do que na indução. Temperaturas abaixo de 25°C causam pouca inibição na pós-indução e temperaturas de 30 e 35°C estimulam a germinação (Chen e Ikuma, 1979).

Towill e Ikuma (1975a; b) após diversos estudos da fase de pós-indução concluíram que: a) tratamento anaeróbico bloqueia os processos oxidativos que ocorrem até 10 h após a irradiação, b) algumas substâncias tornam-se inaproveitáveis para os processos da pós-indução da germinação em atmosfera de nitrogênio, c) estas substâncias são ressintetizadas com a exposição ao ar, d) a proteína ou enzima cujo conteúdo é diminuído com cicloheximida é necessária nas primeiras 10 h da pós-indução, e) a proteína é sintetizada "de novo" se a cicloheximida for removida.

Como os processos de pós-indução não necessitam de luz, não se considera a pós-indução como parte da fotomorfogênese (Howland e Edwards, 1979).

Como pode ser visto até aqui, a germinação de esporos de samambaias tem sido muito estudada, principalmente o efeito

da luz na germinação. Entretanto, como também pode ser observado na introdução, não existe nenhum trabalho sobre germinação de esporos de samambaia realizado no Brasil.

Hoje em dia, há um uso desenfreado de samambaias arbóreas, tanto como xaxim quanto em ornamentação. Estas plantas são simplesmente retiradas das matas e utilizadas no comércio. Não há qualquer iniciativa para aumentar seu número nas matas originais ou para cultivá-las comercialmente. Assim, muitas das espécies dessas samambaias sofrem o perigo da extinção. Grande parte do que ocorre hoje, é consequência da falta de pesquisa básica no Brasil de como germinam os esporos dessas samambaias arbóreas.

Para este trabalho foi escolhida uma espécie arbórea, *Cyathea delgadii* Sternb., e decidiu-se verificar os efeitos de luz e temperatura na germinação de seus esporos.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Foram utilizados esporos de *Cyathea delgadii* Sternb., uma espécie que ocorre naturalmente nas matas do Instituto de Botânica, Parque do Estado, São Paulo, SP.

A espécie foi identificada pelo Dr. Paulo G. Windisch, do Departamento de Botânica do Campus de Rio Claro da UNESP. O material foi coletado por G. M. Felipe, W. Marcondes-Ferreira, e L. M. Esteves, número de coleta 11065. Está depositado no Herbário da Universidade Estadual de Campinas, sob o número UEC21061.

Folhas férteis de *Cyathea delgadii* Sternb. foram colocadas em câmaras de crescimento (Biotronette Mark III), forrada com papel, com os esporângios voltados para baixo. As lâmpadas incandescentes da Biotronete foram deixadas acesas para induzir a abertura dos esporângios, com a conseqüente liberação dos esporos. Estes foram recolhidos do papel que forrava a Biotronete.

Os esporos foram armazenados a 4°C e a 25°C.

MÉTODOS

Os esporos foram postos para germinar em meio líquido, que foi a solução de Knop, com modificações introduzidas por Dyer (1979):

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	510 mg/l
KNO_3	120 mg/l
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	1440 mg/l
KH_2PO_4	250 mg/l
$FeSO_4 \cdot 7H_2O + Na_2EDTA$	1 ml/l

A solução estoque foi preparada sem a última substância, a qual foi acrescentada no momento da montagem de cada experimento. Foram usados erlenmeyers de 125 ml, sendo colocados em cada frasco 25 ml da solução; os frascos foram vedados com algodão e postos para autoclavar a $120^{\circ}C$ por 15 minutos.

Depois da autoclavagem foram acrescentadas em câmara aséptica, 100 unidades de Nystatin (fungicida) por erlenmeyer. Em dois experimentos, água destilada foi usada em vez de solução de Knop. Os esporos foram então semeados. Para a semeadura, uma espátula de metal era mergulhada no frasco onde estavam armazenados os esporos misturados com esporângios; somente os esporos aderem à espátulas. As paredes internas do erlenmeyer eram então batidas com a espátula, ocasionando a queda dos esporos sobre o meio de cultura. De acordo com os experimentos, foram usados esporos recém coletados ou armazenados a $4^{\circ}C$. Em um experimento foram usados esporos armazenados ao redor de $25^{\circ}C$.

Para cada tratamento foram utilizados 3 erlenmeyer. A

germinação foi verificada no microscópio óptico (Zeiss) com aumento de 100 vezes. Para a contagem do número de esporos foi usado um contador manual de células. O material foi transferido dos erlenmeyers para lâminas de microscopia, com o uso de uma espátula (os esporos ficavam flutuando sobre o meio de cultura no erlenmeyer). Para cada erlenmeyer foram montadas 3 lâminas e, em cada lâmina, foram examinados 5 campos. Portanto, foram examinados 45 campos por tratamento. Foi considerado germinado o esporo em que havia protrusão do rizóide. Primeiramente foram contados todos os esporos do campo escolhido e depois os que estavam germinados em cada campo. A porcentagem de germinação foi portanto, determinada campo por campo. A germinação foi sempre verificada 12 dias após o início do experimento.

A germinação foi realizada em câmaras de crescimento Forma Scientific Modelo 24, com luz e temperatura controladas.

Com exceção dos experimentos em que se estudou o efeito de luzes monocromáticas, os erlenmeyers foram mantidos em luz fluorescente branca com a intensidade de $320 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. O escuro foi obtido colocando-se os erlenmeyers dentro de dois sacos pretos de plástico, ficando inteiramente vedados. Com exceção dos experimentos em que se estudou o efeito de temperatura, os erlenmeyers foram mantidos na temperatura constante de 25°C .

Temperatura

Temperaturas constantes e períodos curtos a 5°C e 45°C

As temperaturas constantes utilizadas foram obtidas nas

câmaras de crescimento e foram 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45°C. Os experimentos foram feitos sob luz fluorescente branca ou escuro constantes.

As temperaturas de 5 e 45°C também foram utilizadas (no escuro) por períodos de tempo mais curtos. Neste caso, os esporos foram postos para embeber sob condições de escuro a 25°C pelo período desejado, antes dos erlenmeyers serem transferidos para as temperaturas de 5 ou 45°C como já foi mostrado em Felipe (1978). Após os choques de 5 ou 45°C, os esporos voltaram para 25°C em condição de escuro. Em um primeiro grupo de experimentos, variou-se o período de temperatura alta ou baixa. Assim, os esporos foram semeados sob condições de escuro a 25°C, permanecendo nestas condições por 48 horas. Foram então transferidos por 5, 15, 30, 60, 180 minutos, 1, 3 e 7 dias (no escuro) para as temperaturas de 5°C ou 45°C. Após isto, retornaram para a temperatura de 25°C (no escuro). Em um segundo grupo de experimentos os esporos foram semeados, no escuro, a 25°C e aí permaneceram por 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Após isto, receberam 60 minutos de 5°C ou 45°C. Após o período de temperatura alta ou baixa, retornaram para a de 25°C no escuro.

Temperaturas alternadas

As temperaturas alternadas utilizadas foram (25-5°C), (25-10°C), (25-15°C), (25-20°C), (25-30°C), (25-35°C), (25-40°C), e (25-45°C). Os esporos foram mantidos tanto sob luz branca como em escuro constantes. Foram dados 12 ciclos de 24 horas e, em cada ciclo, 12 horas eram a 25°C e as outras 12 horas na

outra temperatura do par. A mudança de uma temperatura para outra na câmara não era súbita, mas demorava um certo período de tempo, como foi mostrado por Felipe (1978).

Luz fluorescente branca

Períodos curtos de luz branca

Quando se estudou o efeito de períodos relativamente curtos de luz fluorescente branca na germinação dos esporos, estes foram colocados para embeber a 25°C, sob condições de escuro pelo tempo requerido, para então receber o tratamento de luz branca. Sempre foram realizados controles, nos quais os esporos ficaram em luz fluorescente branca ou escuro constantes. Em um primeiro grupo de experimentos, os esporos foram mantidos no escuro por um período de 48 horas. Após este período foram transferidos para luz fluorescente branca e aí ficavam por um período de 1, 3, 6, 24, 48 e 72 horas. Após esses diferentes períodos em luz branca, os esporos retornavam para condições de escuro. No segundo grupo de experimentos, os esporos foram mantidos no escuro por períodos como 30 minutos, 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas e então transferidos para luz fluorescente branca por 1, 3 ou 48 horas, retornando depois para o escuro.

Intensidade luminosa

Foram também realizados experimentos em luz fluorescente branca contínua, com diferentes intensidades luminosas. Para

a obtenção das diferentes intensidades luminosas, os erlenmeyers foram cobertos com diversas camadas de gaze. As intensidades luminosas utilizadas foram: 2500, 1900, 1400, 900 e $220\mu\text{W}/\text{cm}^2$, que foram determinadas com um radiômetro U.D.T. modelo 40X. Este experimento foi realizado em câmara de crescimento marca Conviron.

Fotoperíodo

Também foi verificado o efeito do fotoperíodo na germinação dos esporos. Para esses experimentos, foram colocados os erlenmeyers em câmaras de crescimento a 25°C reguladas para os fotoperíodos de 8, 12, 16 e 24 horas de luz fluorescente branca em ciclos de 24 horas. Para os experimentos de escuro constante (0h de luz), os erlenmeyers foram cobertos com dois sacos de plástico preto bem vedados e colocados em uma das câmaras.

Vermelho, azul e vermelho-extremo

Foram realizados experimentos em que foram utilizadas as luzes vermelha, azul e também o vermelho-extremo. As luzes monocromáticas foram obtidas da maneira descrita por Noronha *et al.*, 1978 e Randi (1980). No caso do vermelho, foi utilizada uma lâmpada fluorescente vermelha, marca Sylvania, de 20 W, com pico no comprimento de onda de 660 nm. No caso da luz azul, foi usada uma lâmpada fluorescente azul da Phillips, de 15 W, com pico a 450 nm. No caso do vermelho-extremo, a fonte lumino

sa foi uma lâmpada incandescente de 6 W e um filtro formado por três folhas de papel celofane azul e duas folhas de papel celofane vermelho que proporcionaram um pico a 730 nm. Nos experimentos com luzes monocromáticas, sempre foram usados controles em que os erlenmeyers eram colocados sob escuro e/ou luz fluorescente branca constantes. Em alguns experimentos, os esporos foram semeados a 25°C no escuro, onde permaneceram por 24 ou 48 horas; após esses períodos eram transferidos para vermelho, azul ou vermelho-extremo por uma ou três horas, após o que, retornavam para o escuro até o dia da contagem. Em um segundo grupo de experimentos, os esporos foram tratados com uma hora de vermelho, azul ou vermelho-extremo e suas combinações diariamente (por 11 dias), de acordo com o esquema a seguir (além do controle em escuro):

- a - vermelho
- b - azul
- c - vermelho-extremo
- d - vermelho seguido de vermelho-extremo
- e - vermelho seguido de azul
- f - vermelho-extremo seguido de vermelho
- g - vermelho-extremo seguido de azul
- h - azul seguido de vermelho
- i - azul seguido de vermelho-extremo

O primeiro choque foi dado 24 h após o início do experimento.

Consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio pelos esporos de *Cyathea delgadii* durante a fase inicial de germinação foi medido com o auxílio do aparelho de Warburg, de acordo com Umbreit *et al.* (1964). Foram usados esporos recém coletados. Em cada frasco, foram colocados 50 mg de esporos, 2,0 ml de água destilada e, na cisterna, 0,5 ml de KOH a 20% para absorção do gás carbônico liberado. Foi medida a absorção de oxigênio de esporos deixados para embeber em luz contínua por 0, 1, 2, 3 e 4 dias. Os esporos foram colocados para embeber sem se colocar o KOH na cisterna, o qual somente foi acrescentado, na hora da leitura. Os frascos, durante a embebição, foram vedados com parafilme e colocados em câmaras de crescimento, com luz fluorescente branca contínua a 25°C. Foram utilizados três frascos por tratamento. O consumo de oxigênio é expresso em $\mu l O_2 \cdot g^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Determinação de lipídios

Também foi feita a dosagem de lipídios dos esporos. Preliminarmente foram usadas duas amostras com 400 e outra com 30 mg de esporos e foi verificado que não havia diferença significativa na quantidade extraída de lipídios, por mg de esporos; isso significava que a amostra podia variar entre 30 e 400 mg de esporos. Foram então utilizadas seis amostras, contendo, em média, 150 mg de esporos. Os esporos utilizados foram estocados por três meses e estavam sendo utilizados nos experimentos de germinação. A extração foi feita de acordo com o método de

Bartnicki-Garcia e Nickerson (1962) com algumas modificações. Os esporos foram esmagados em almofariz e agitados em etanol 95%-éter etílico (1:1,v/v) por 24 horas a 30°C (foram usados 100 ml de etanol-éter para cada 100 mg de esporos). O material foi filtrado em papel de filtro e o resíduo agitado novamente com a mistura etanol-éter por 20 horas a 30°C e filtrado. O resíduo era agitado por mais duas vezes com clorofórmio (100ml para cada 100 mg de esporos) por 24 horas a 30°C. Os quatro filtrados obtidos eram misturados e neles estavam os lipídios livres. O último resíduo foi guardado para dele se extraírem os lipídios ligados. Os solventes dos filtrados foram misturados e evaporados a vácuo. Deste extrato concentrado, os lipídios foram então extraídos com éter, secos com sulfato de sódio anidro e o éter então evaporado. Os lipídios foram então colocados em dessecador permanecendo aí até atingir peso constante. Esta foi considerada a fração dos lipídios livres existentes nos esporos.

Do resíduo (que foi reservado) foram extraídos os lipídios ligados. O resíduo foi submetido à digestão em etanol ácido-éter etílico (1:1,v/v). O etanol ácido é obtido pela adição de 1 ml de HCl a 12 N em 100 ml de etanol 95%. A digestão foi feita por 5 horas a 50°C. Após a digestão foram feitas duas extrações com etanol 95%-éter de etila (1:1,v/v) e uma com clorofórmio. Cada extração foi feita por 24 horas. Os extratos foram reunidos e os solventes evaporados a vácuo, ressuspensos em éter, secados com sulfato de sódio anidro e o éter evaporado a vácuo. Os lipídios ligados foram então colocados em dessecador e deixados nele até atingirem peso constante. A quantidade foi calculada em mg e a soma dos lipídios livres mais os liga-

dos nos fornece o peso dos lipídios totais. Os dados são apresentados como porcentagem do peso original dos esporos utilizados.

Análise estatística

Os dados de germinação foram todos transformados em valor angular (arco seno \sqrt{p} ; onde $p = \frac{x}{n}$, sendo x o número de esporos germinados e n o número de esporos por campo).

Quando necessário, os dados foram analisados pelo teste T, ou determinados os limites de confiança das médias, ou pela análise de variância, de acordo com Snedecor (1962).

RESULTADOS

Germinação

Germinação de esporos em água destilada e solução de Knop

Pelos resultados apresentados na tabela 1, observa-se que houve maior germinação quando os esporos foram semeados em solução de Knop e, a diferença com água destilada, foi estatisticamente significativa. Por esta razão foi usada a solução de Knop para todos os experimentos.

Curva de germinação a 25°C

Os resultados são apresentados na figura 1. Como pode ser visto na figura, há uma fase de latência até o dia 4, seguida de uma fase rápida; a estabilização ocorre ao redor do dia 12. Nos experimentos seguintes a germinação dos esporos foi sempre verificada após 12 dias do início do experimento. Os resultados são os valores médios com seus respectivos limites de confiança.

Tabela 1

Germinação de esporos de *Cyathea delgadii* em água destilada e solução de Knop.

germinação (valor angular)	
água destilada	solução de Knop
41,77*	50,42

* Diferença significativa a 5%

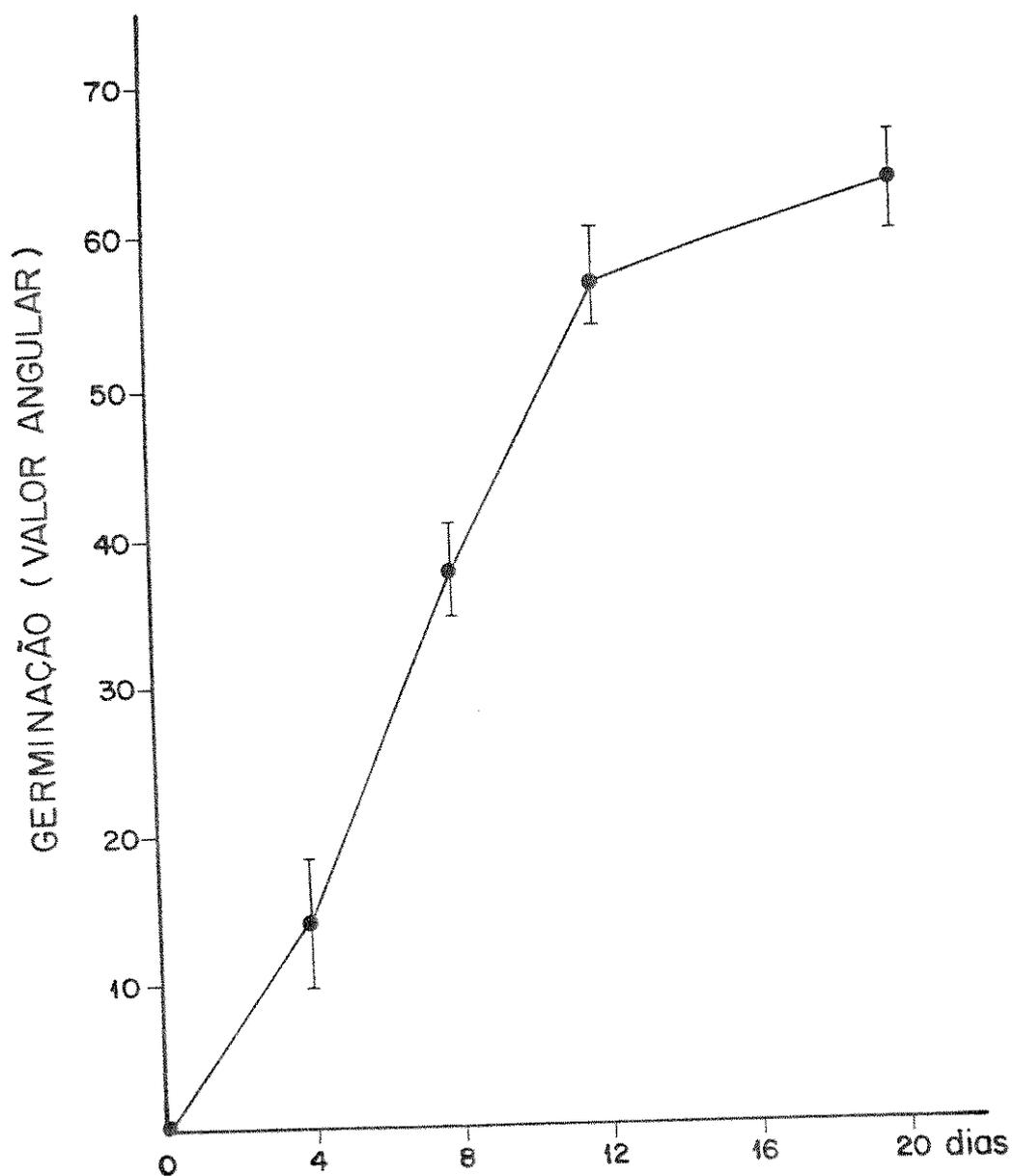


Figura 1. Curva de germinação de esporos de *Cyathea delgadii* recém coletados.
As barras verticais são os limites de confiança.

Efeito do tipo de armazenamento

Pelos resultados apresentados na tabela 2, pode-se observar que os esporos continuam germinando por um período de tempo maior quando armazenados a 4°C do que a 25°C. Mesmo com armazenamento a 4°C, há uma queda na germinação já com 6 meses de estocagem. Após 12 meses a queda em germinação é bem evidente, quando armazenados a 4°C, e a 25°C a germinação é nula. Em todos os experimentos de germinação foram utilizados esporos armazenados a 4°C. A análise de variância mostrou que há uma diferença significativa entre a germinação de esporos recém coletados e armazenados (mesmo a 4°C). Pode ser observado que mesmo após armazenamento não houve germinação no escuro.

Efeito de temperatura

1. Temperaturas constantes

Pelos resultados apresentados na tabela 3 (experimentos 3 e 4) pode-se observar que as melhores temperaturas constantes para a germinação dos esporos recém coletados são a de 20 e a de 25°C e que nenhum esporo germinou no escuro em nenhuma das temperaturas constantes testadas. Em luz fluorescente branca constante, ocorreu germinação também nas temperaturas de 15 e 30°C.

Pela tabela 4 pode-se observar que a melhor temperatura para a germinação de esporos armazenados por 7 meses é a de 25°C e que nenhum esporo germinou no escuro nas temperaturas constantes testadas. Com os esporos armazenados, também ocorreu germi

Tabela 2

Germinação de esporos de *Cyathea delgadii* armazenados por períodos diferentes e em temperaturas diferentes.

armazenamento		germinação (valor angular)	
temperatura °C	tempo meses	luz	escuro
4	0	52,49	0
	6	40,47	0
	12	44,00	0
	24	15,34	0
25	0	52,49	0
	12	0	0
	24	0	0
DMS _{5%}		4,10	

Tabela 3

Germinação de esporos recém coletados de *Cyathea delgadii*, em várias temperaturas constantes.

temperatura °C	germinação (valor angular)					
	luz					escuro
	experimentos					experimentos
	1	2	3	4	\bar{X}	1,2,3,4 e \bar{X}
5	0	0	-	-	0	0
10	-	-	0	0	0	0
15	18,72	14,77	-	-	16,85	0
20	-	-	45,06	41,50	43,28	0
25	56,23	62,87	50,01	49,43	54,45	0
30	-	-	12,25	5,44	9,46	0
35	0	0	-	-	0	0
40	-	-	0	0	0	0
45	0	0	-	-	0	0
DMS _{5%}	1,86	2,03	1,57	2,13		

(-): não realizados

Tabela 4

Germinação em temperaturas constantes de esporos de *Cyathea delgadii* armazenados a 4°C por 7 meses.

temperatura °C	germinação (valor angular)					
	luz					escuro
	1	2	3	4	\bar{X}	experimentos 1,2,3,4 e \bar{X}
5	0	0	-	-	0	0
10	-	-	0	0	0	0
15	0	0	-	-	0	0
20	-	-	30,74	34,96	32,77	0
25	46,95	46,72	59,34	47,04	49,84	0
30	-	-	6,55	-	6,55	0
35	0	0	-	-	0	0
40	-	-	0	0	0	0
45	0	0	-	-	0	0
DMS _{5%}			1,65	2,23		

(-): não realizados

nação a 20 e a 30°C, quando eram mantidos em luz constante. É bom reforçar aqui, que não houve germinação de esporos mantidos no escuro em nenhuma das temperaturas testadas, tanto para os recém coletados quanto para os armazenados a 4°C por 7 meses. Parece que a faixa de temperatura para a germinação é mais larga para os esporos recém coletados (15 a 30°C) do que para os esporos armazenados por 7 meses (20 a 30°C) como pode ser visto na tabela 5 que compara as médias das tabelas 3 e 4.

2. Temperaturas alternadas

A tabela 6 apresenta os resultados dos experimentos em que os esporos (armazenados por 7 meses) foram submetidos a temperaturas alternadas. Não ocorreu germinação nos pares (25-35°C), (25-40°C) e (25-45°C). Portanto, a alternância diária por 12 horas com a temperatura de 25°C não alterou o efeito deletério, para a germinação, das temperaturas de 35, 40 e 45°C. Ocorreu germinação em todos os outros pares (a germinação foi a mesma a 25°C e nos pares (25-20°C) e (25-30°C), embora tenha sido baixa com os pares (25-5°C) e (25-10°C)). Deve ser mencionado aqui que nesta série de experimentos a germinação do controle (25-25°C) foi baixa em relação aos experimentos anteriores (ver tabela 4). O uso de temperaturas alternadas não causou germinação de esporos no escuro.

Tabela 5

Germinação de esporos recém coletados e armazenados por 7 meses a 4°C de *Cyathea delgadii*, em temperaturas constantes, em luz fluorescente branca constante.

temperatura °C	germinação (valor angular)*	
	recém coletados	armazenados por 7 meses
5	0	0
10	0	0
15	16,85	0
20	43,28	32,77
25	54,45	49,84
30	9,46	6,55
35	0	0
40	0	0
45	0	0

* Valores são as médias das tabelas 3 e 4.

Tabela 6

Germinação em temperaturas alternadas de esporos de *Cyathea delgadii* armazenados a 4°C por 7 meses.

temperatura °C	germinação (valor angular)					
	luz					escuro
	experimentos					experimentos
	1	2	3	4	\bar{X}	1,2,3,4 e \bar{X}
(5-25)	2,56	7,92	-	-	5,74	0
(10-25)	9,10	19,28	-	-	15,00	0
(15-25)	21,89	26,21	-	-	24,12	0
(20-25)	-	-	29,60	32,39	30,99	0
(25-25)	34,51	33,52	30,07	31,18	32,32	0
(30-25)	-	-	31,56	28,93	30,26	0
(35-25)	-	-	0	0	0	0
(40-25)	-	-	0	0	0	0
(45-25)	0	0	-	-	0	0
DMS _{5%}	4,75	3,84	2,78	3,62		

(-): não realizados

3. Efeito de períodos de temperaturas baixas a altas

3.1. Diferentes períodos de temperatura de 5°C e 45°C

Os resultados são apresentados na tabela 7 onde pode ser visto que a germinação ocorreu a 25°C constante em luz, mas não no escuro.

O experimento foi realizado no escuro; os esporos foram embebidos durante 48 h a 25°C e então receberam os períodos a 5°C ou 45°C. Nenhum dos períodos de temperatura (de 5 minutos a 7 dias) causou germinação de esporos.

3.2. Choque de 60 minutos a 5°C ou 45°C após diferentes períodos de embebição

A embebição foi feita a 25°C no escuro por 12, 24, 48, 72 e 96 horas; após esses períodos, os esporos receberam um período de 60 minutos a 5°C ou a 45°C. Os choques de 5°C e de 45°C não causaram germinação dos esporos, após nenhum dos tempos de embebição testados. A germinação apenas ocorreu em luz a 25°C constantes, como pode ser visto na tabela 8.

Efeito de luz

1. Efeito da intensidade luminosa

Os resultados são apresentados na tabela 9, onde pode-se verificar que com a intensidade mais baixa, houve melhor ger

Tabela 7

Efeito de diferentes períodos de temperatura a 5°C ou a 45°C na germinação de esporos de *Cyathea delgadii* mantidos a 25°C no escuro constante.

	germinação (valor angular)	
	luz	escuro
controle (25°C)	39,29	0
períodos a 5°C e a 45°C	escuro	
5 min		0
15 min		0
30 min		0
60 min		0
180 min		0
1 dia		0
3 dias		0
7 dias		0

Tabela 8

Efeito de períodos de 60 minutos a 5°C ou a 45°C, após diferentes períodos de embebição a 25°C no escuro, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*.

	germinação (valor angular)	
	luz	escuro
controle (25°C)	46,32	0
períodos de embebição (horas)	60 minutos a 5°C ou a 45°C	
12	0	
24	0	
48	0	
72	0	
96	0	

Tabela 9

Efeito de luz fluorescente branca, de diferentes intensidades, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*.

intensidade luminosa $\mu W/cm^2$	germinação (valor angular)
2500	44,68
1900	47,88
1400	46,70
900	48,23
220	53,69
DMS _{5%}	2,90

minação, um valor estatisticamente diferente dos valores encontrados para as outras intensidades. Parece portanto, que o esporo de *Cyathea delgadii* germina melhor em intensidade luminosa baixa.

2. Efeito do fotoperíodo

Os resultados apresentados na tabela 10 mostram que não houve diferença significativa entre a germinação encontrada nos fotoperíodos de 8, 12, 16 e 24 horas. Não ocorreu germinação de esporos mantidos sob condição de escuro contínuo.

3. Efeito de luz fluorescente branca

3.1. Diferentes períodos de luz branca após 48 h de em be bi ção

Os esporos foram embebidos por 48 horas sob condição de escuro e então receberam luz branca por 1, 3, 6, 24, 48 e 72 horas; após esses períodos de luz branca, foram transferidos para escuro constante até o dia da contagem (12º dia). Os resultados podem ser vistos na tabela 11. A germinação é melhor com períodos mais longos de luz até um período de 48 horas. Períodos de 48 e 72 horas causaram a mesma germinação. Alguma germinação já ocorreu com o período de luz de 3 horas, mostrando que o período de pré-indução pode ser igual ou menor que 48 horas.

Tabela 10

Efeito de diferentes fotoperíodos na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*.

fotoperíodo (h)	germinação (valor angular)
0	0
8	57,55
12	55,01
16	56,37
24	54,72

$F_{5\%}$ não significativo para fotoperíodos de 8, 12, 16 e 24 horas.

Tabela 11

Efeito de períodos diferentes em luz branca, após embebição por 48 horas, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii* mantidos no escuro.

	germinação (valor angular)	
	luz	escuro
controle	39,35	0
períodos em luz branca (horas)	germinação (valor angular)	
1	0	
3	11,13	
6	18,37	
24	30,42	
48	40,24	
72	38,68	
DMS _{5%}	3,38	

3.2. Períodos de 48, 3 e 1 hora de luz branca após diferentes períodos de embebição

Os esporos foram embebidos por 1, 3, 6, 24, 48 e 72 horas sob condição de escuro e então receberam 48 horas de luz branca. Os resultados podem ser vistos na tabela 12. A germinação com o período de luz branca de 48 horas foi a mesma para períodos de embebição de 1, 3 e 6 horas. A germinação foi a mesma para períodos de embebição de 48 e 72 horas. Os períodos de embebição no escuro podem ser colocados em três grupos: o grupo menos efetivo para a luz branca promover a germinação (1, 3 e 6 horas), um período intermediário (24 horas) e o grupo mais efetivo que foi o de 48 e 72 horas de pré-embebição no escuro. Portanto, quanto mais longo é o período de pré-embebição no escuro, mais efetiva é a luz branca dada a seguir, para causar germinação.

Em um segundo experimento os esporos foram embebidos por meia hora, 1, 3, 6, 12, 24 e 48 h e então receberam 3 horas ou 1 hora de luz branca. Neste último caso os esporos também haviam sofrido embebição no escuro por 72 horas (tabela 12).

Quando o período de luz foi de 3 horas somente houve germinação quando a embebição havia sido de 48 horas, e com embebição de 72 horas, quando o período de luz havia sido de 1 hora.

Portanto, com os experimentos de luz branca, o período de pré-indução para os esporos desta espécie, parece ser o de 48 horas (período de luz de 3 horas).

Tabela 12

Efeito de um período de 1, 3 ou 48 horas de luz fluorescente branca, após diferentes períodos de embebição, em esporos de *Cyathea delgadii* mantidos sob condição de escuro.

	germinação (valor angular)	
	luz	escuro
controle	47,24	0

período de de embebição (h)	germinação (valor angular)		
	período de luz branca (h)		
	48	3	1
0,5	-	0	0
1	19,58	0	0
3	21,79	0	0
6	19,83	0	0
12	-	0	0
24	27,66	0	0
48	36,14	7,49	0
72	36,23	-	4,05
DMS _{5%}	4,28		

4. Efeito de vermelho, vermelho-extremo e azul

4.1. Efeito de um choque de vermelho, vermelho-extremo e azul

Os esporos foram embebidos por 24 ou 48 horas sob condições de escuro, antes de receberem um período de 1 ou 3 horas de azul, vermelho ou vermelho-extremo. Os resultados estão na tabela 13. Não ocorreu germinação sob azul e vermelho-extremo. A luz vermelha provoca a germinação, embora baixa, mesmo com um período de 1 hora. Por este experimento, o período de pré-indução ficou reduzido para 24 horas.

4.2. Reversão do efeito do vermelho pelo vermelho-extremo

Como a aplicação de um único choque de 1 ou 3 horas de vermelho causou uma germinação relativamente baixa, decidiu-se neste experimento, utilizar choques de vermelho de 1 hora, mas dados diariamente durante 11 dias. O mesmo foi feito com o vermelho-extremo. No caso de se tentar uma reversão do vermelho pelo vermelho-extremo, diariamente os esporos receberam 1 hora de vermelho seguida imediatamente por 1 hora de vermelho-extremo. Os resultados são apresentados na tabela 14, onde pode-se ver que o vermelho-extremo reverte o efeito promotor da luz vermelha.

Tabela 13

Efeito de períodos de vermelho, azul e vermelho-extremo na germinação de esporos de *Cyathea delgadii* após 24 ou 48 horas de embebição no escuro.

		germinação (valor angular)					
		luz			escuro		
controle		48,62			0		
períodos de embebição - (horas)	vermelho		vermelho- -extremo		azul		
	1 h	3 h	1 h	3 h	1 h	3 h	
24	8,48	13,41	0	0	0	0	
48	13,37	19,65	0	0	0	0	
DMS _{5%}		2,86					

Tabela 14

Reversão do efeito de choques diários de vermelho (V) pelo vermelho-extremo (VE) na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*.

	germinação (valor angular)	
	luz	escuro
controle	56,66	0
choques diários (1 hora)	germinação (valor angular)	
V	37,77	
VE	0	
V - VE	11,54	
DMS _{5%}	7,87	

4.3. Efeitos de choques diários de 1 hora de vermelho, vermelho-extremo, azul e suas combinações.

Neste experimento os esporos receberam diariamente 1 hora de vermelho (V), ou vermelho-extremo (VE) ou azul e combinações destes três tipos de luz para verificar se havia adição de efeitos ou reversão. Os resultados são apresentados na tabela 15, onde pode ser visto que choques diários de uma hora de V promove a germinação dos esporos, como já havia sido mostrado na tabela 14. O VE inibe totalmente a germinação, o que também já havia sido mostrado anteriormente. A luz azul promove, estatisticamente, em relação ao VE e ao escuro, mas é bem menos efetiva para a promoção do que a luz vermelha; comparando as tabelas 13 e 15 pode-se ver que o choque de luz azul só promove a germinação quando dado mais de uma vez. A luz vermelha reverte totalmente o efeito do vermelho-extremo e o valor da germinação para o choque de vermelho é estatisticamente igual a germinação do tratamento VE-V. O V reverte o efeito do azul, mas a reversão é menor que no caso do VE. O VE reverte o efeito da luz vermelha. A luz azul diminui o efeito do V mas não reverte o seu efeito. O azul reverte o efeito de VE e o resultado é como se o VE não tivesse sido aplicado. O VE em compensação reverte inteiramente o efeito da luz azul. Concluindo-se, pode-se dizer que o vermelho-extremo reverte a ação promotora do vermelho e do azul. A luz azul diminui o efeito da luz vermelha e reverte o efeito do vermelho-extremo. O vermelho reverte totalmente o vermelho-extremo. Embora a luz vermelha promova a germinação assim como também o faz a luz azul, quando o vermelho é dado juntamente com a luz azul, a germinação é sempre menor do que so-

Tabela 15

Efeitos de choques diários de 1 hora de vermelho (V), vermelho-extremo (VE) e azul e suas combinações na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*.

choques diários (1 hora)	germinação (valor angular)
controle (escuro)	0
V	40,09
VE	0
azul	12,64
V-VE	6,87
V-azul	34,31
VE-V	38,78
VE-azul	9,77
azul-V	27,54
azul-VE	0
DMS _{5%}	3,48

mente com luz vermelha, mas é sempre maior do que a luz azul aplicada sozinha.

Consumo de oxigênio pelos esporos

Foi medido o consumo de oxigênio de esporos postos para germinar por 0, 1, 2, 3 e 4 dias, isto é, durante o período inicial de germinação. Pelos resultados mostrados na figura 2 observa-se, levando-se em consideração os limites de confiança, que há um aumento no consumo de O_2 entre 0 e 1 dia de germinação. O consumo se mantém estabilizado entre dias 1 e 3, apresentando um novo aumento no consumo de oxigênio, entre o 3º e 4º dias.

Determinação de lipídios dos esporos

Pela observação dos esporos ao microscópio, principalmente quando sofriam esmagamento, observava-se uma gota relativamente grande de lipídio por esporo. Foi determinado então o conteúdo de lipídio dos esporos utilizados nos experimentos de germinação. A tabela 16 mostra que a maior parte do peso dos esporos aqui utilizados é constituída de lipídios. Os lipídios livres são responsáveis por cerca de 40% do peso dos esporos.

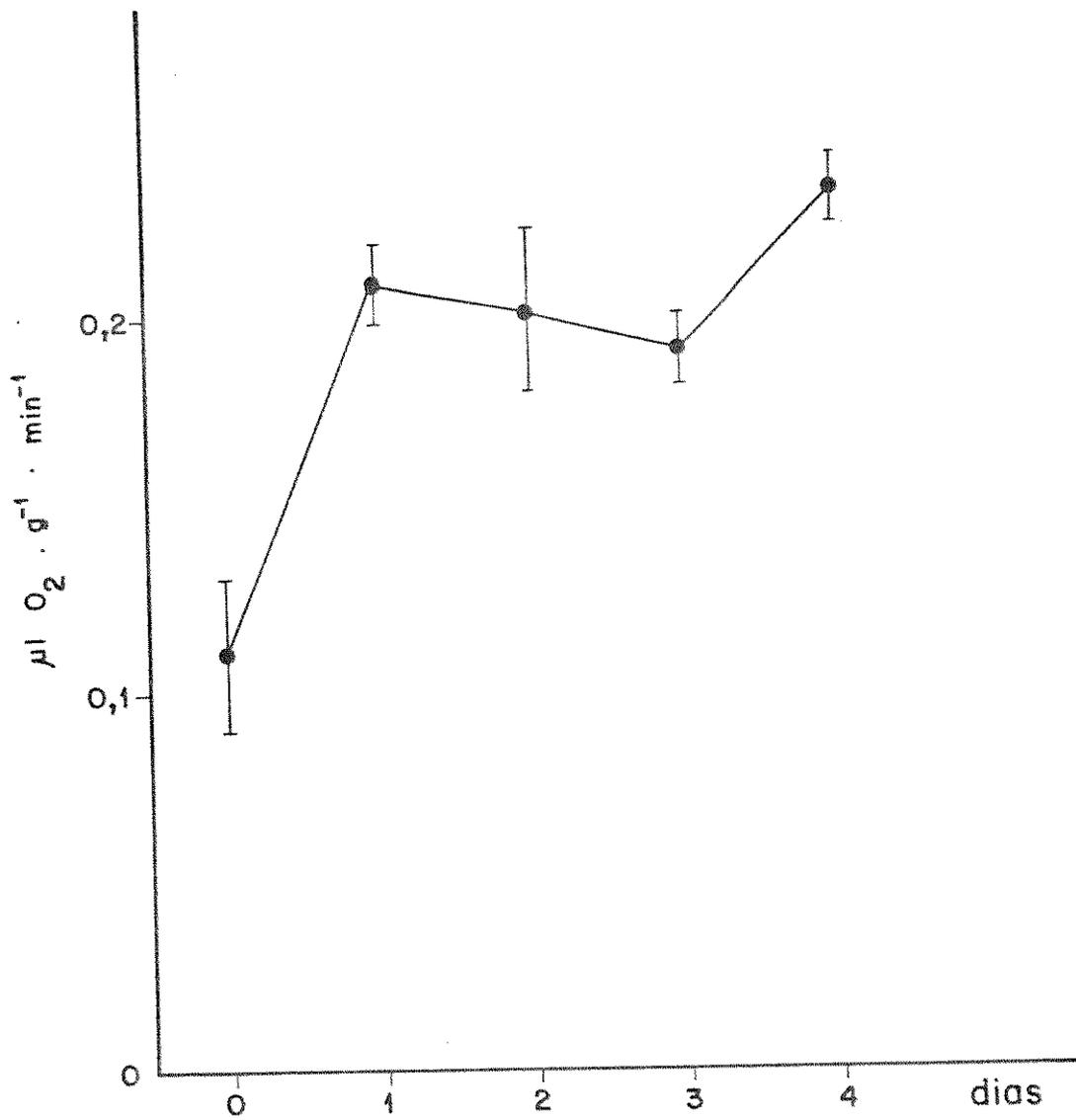


Figura 2. Consumo de oxigênio por esporos de *Cyathea delgadii* durante os primeiros dias da germinação. As barras verticais são os limites de confiança.

Tabela 16

Determinação de lipídios em esporos de *Cyathea delgadii*.

	% em relação ao peso dos esporos
lipídios livres	43,7
lipídios ligados	19,3
lipídios totais	63,1

DISCUSSÃO

O meio de cultura empregado para a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* foi o meio de Knop com as modificações introduzidas por Dyer (1979). Meios sólidos foram abandonados por apresentarem maior incidência de fungos e serem de execução mais trabalhosa. Além disso, de acordo com a literatura, melhores resultados são obtidos com o meio líquido (Miller, 1968).

Os esporos de *Onoclea sensibilis* (Hartt, 1925; Miller, 1968) germinaram em água e em meio de cultura, e germinaram em quaisquer meios, desde que eles não fossem tóxicos. Para o caso de *Cyathea delgadii*, pode-se observar que os esporos germinam melhor em meio de Knop do que em água. Uma explicação provável para o caso de *C. delgadii* é a de que em muitos trabalhos sobre a germinação de esporos em água, a germinação era definida como a simples ruptura do envoltório do esporo (Miller, 1968) o que não é o caso presente, em que a germinação é considerada como a emergência do rizóide.

Na curva de germinação obtida para os esporos de *Cyathea delgadii* recém coletados, observa-se que o início da germinação foi por volta do quarto dia, e, do quarto dia ao décimo segundo, a curva apresenta sua fase exponencial, estabilizando-se então.

Geralmente os esporos têm sua viabilidade diminuída após estocagem, apesar de que existem dados na literatura de esporos que ainda germinaram 20 anos após a coleta (Hartt, 1925). *Alsophila australis* precisa de um período de armazenamento de um ano para sua germinação (Hartt, 1925). Miller e Miller (1961) armazenaram esporos de *Onoclea sensibilis* a 4°C, e nestas condições permaneceram viáveis por pelo menos dois anos. Pelos dados obtidos no presente trabalho, esporos armazenados a 25°C não germinaram após 12 meses enquanto que os esporos a 4°C mantinham sua viabilidade alta após 12 meses de armazenamento, diminuindo então a viabilidade até chegar por volta de 7% com 24 meses de armazenamento.

Esporos de samambaias germinam melhor entre temperaturas constantes de 15 a 30°C, mas a temperatura ótima para germinação varia de espécie para espécie, variando também conforme o local de ocorrência (Miller, 1968). Os esporos de *Cyathea delgadii* provenientes da mata do Instituto de Botânica apresentaram como melhor temperatura constante para germinar, 25°C, sendo que para esporos recém coletados a temperatura de 20°C apresentou resultados mais próximos de 25°C do que com esporos armazenados por sete meses a 4°C. Parece que com o armazenamento a faixa de temperatura ótima para a germinação, fica menor, aproximando-se mais de 25°C.

Os esporos de samambaias podem ser fotoblásticos positivos ou negativos, bem como indiferentes à luz.

Em *Anemia phyllitidis* foi demonstrado que os esporos não germinam no escuro, mas que giberelinas, anteridiógeno-B ou luz podem induzir germinação de esporos e talvez a luz esteja induzindo à síntese de uma substância relacionada com gibereli-

na ou anteridiógeno que induza a germinação (Weinberg e Voeller, 1969). *Botrychium dissectum*, por outro lado, não germina em presença de luz. A vantagem para esta espécie em não germinar em luz é que os gametofitos têm hábito subterrâneo sendo então uma vantagem os esporos germinarem somente no escuro, ou seja, quando, na natureza, estão encobertos por uma camada de solo (Whittier, 1973).

Neste trabalho foi constatado que, em nenhum caso, os esporos de *Cyathea delgadii* germinaram no escuro, sendo que estes esporos apresentaram 100% de fotoblastismo positivo, de acordo com a definição proposta por Evenari (1965).

Towill (1978) constata que esporos que germinam em presença de luz podem germinar no escuro se submetidos a determinadas temperaturas e que esta sensibilidade é perdida à medida que se distancia o choque de temperatura do início da embebição. Em nenhum caso se conseguiu induzir a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* mantidos no escuro por meio de choques de temperatura alta (45°C) ou baixa (5°C). Do mesmo modo, quando os esporos foram submetidos a temperaturas alternadas, com períodos de doze horas, não se conseguiu induzir os esporos, mantidos no escuro, a germinar.

A germinação dos esporos pode ser dividida em três fases: a pré-indução na qual os esporos se embebem e tornam-se aptos a perceber os estímulos indutores da germinação, a indução que é a fase em que são captados os estímulos e a pós-indução que é a fase em que, uma vez induzidos, os esporos sofrem uma série de mudanças culminando com a germinação (Chen e Ikuma, 1979). No caso atual parece que o período de pré-indução é de 48 horas. Após os esporos permanecerem no escuro, por 48 ho-

BC/4842

ras, o tempo mínimo de luz capaz de causar alguma germinação é de três horas. Pode-se também observar que para os esporos que permaneceram 48 horas no escuro, um período de luz fluorescente branca de 48 horas é tão eficiente quanto um período de 72 horas para induzir a germinação de esporos mantidos no escuro.

Em relação às três fases de germinação, em *Sphaeropteris cooperi*, Reynolds (1982) estudando o consumo de oxigênio pelos esporos durante a germinação mostrou que a respiração poderia ser dividida também em três fases e que estas fases de consumo de oxigênio coincidiram com as fases de germinação já apontadas; na primeira havia um aumento no consumo de oxigênio e esta fase coincide com a embebição dos esporos, que seria a fase de pré-indução. Na fase transitória havia pouco aumento do consumo de oxigênio, cujo consumo aumentaria pela época em que haveria a emergência do rizóide. No caso de *Cyathea delgadii* também são mostradas três fases de consumo de oxigênio durante a germinação: na primeira fase há um aumento do consumo que é seguido de uma estabilização e um novo aumento a partir do terceiro dia (ver figura 2) (que seria o início da 3ª fase). Comparando com a figura 1, pode-se ver que no quarto dia já havia esporos germinados. Portanto, os dados atuais concordam tanto em germinação como em consumo de oxigênio durante a germinação com os dados de Reynolds (1982), mesmo sendo duas espécies diferentes.

Pelos dados obtidos parece que os esporos germinam melhor quando colocados em luz com intensidade luminosa mais baixa ($220 \mu\text{W}/\text{cm}^2$), talvez pelo fato de que quando expostos a intensidades luminosas mais altas, a luz destrói sua clorofila impossibilitando assim que os esporos germinem, de acordo com a

idêia proposta por Hartt (1925).

Foram também testados fotoperíodos de 0, 8, 12, 16 e 24 horas de luz e verificou-se que tratamentos com períodos de 8, 12, 16 e 24 horas não são diferentes entre si. Mohr (1956) encontrou que a germinação de *Dryopteris filix-mas* aumenta à medida que o fotoperíodo aumenta, o que não concorda com o caso atual.

Em *Pteris vittata* choques de vermelho induzem a germinação de esporos mantidos no escuro. Choques de vermelho extremo induzem também alguma germinação de esporos mantidos no escuro e choques de azul não foram capazes de induzir nenhum esporo a germinar (Sugai e Furuya, 1967).

Esporos fotoblásticos positivos de *C. delgadii* mantidos no escuro são induzidos a germinar se receberem choques de luz vermelha. Choques de uma hora de luz vermelha já causam a germinação de esporos e o período mínimo de pré-indução que tinha sido estabelecido ser de 48 horas para choques de luz fluorescente branca, foi reduzido para 24 horas quando dados choques com luz vermelha.

Choques com vermelho-extremo não conseguiram induzir a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* mantidos no escuro.

Choques com azul foram capazes de induzir alguma germinação nos esporos de *Cyathea delgadii* mantidos no escuro.

O vermelho-extremo foi capaz de reverter o efeito do vermelho na indução da germinação de esporos de *Cyathea delgadii* e o vermelho reverte o efeito do vermelho-extremo.

Choques de azul seguidos de choques de vermelho-extremo não induziram nenhum esporo à germinação, mostrando que o vermelho-extremo também reverteu o efeito promotor (não muito acen-

tuado) do azul.

Choques de azul seguidos de choques de vermelho apresentaram germinação, mas o efeito do vermelho, neste caso, não conseguiu igualar a germinação causada por choques de vermelho somente, ou de vermelho-extremo seguido de vermelho.

Choques de azul após choques de vermelho-extremo reverteram o efeito do vermelho-extremo causando germinação semelhante àquela apresentada por choques de azul.

Os tratamentos com luz azul e vermelha na germinação de esporos têm apresentado resultados contraditórios e, muitas vezes difíceis de expressar em termos de pigmento fitocromo.

Em muitos casos a germinação de esporos é promovida pela luz vermelha e inibida pelo vermelho-extremo ou azul (Mohr, 1956; Mohr *et al.*, 1964; Raghavan, 1973). Em outros casos o efeito promotor da luz vermelha só é revertido pelo vermelho-extremo e não pelo azul (Sugai e Furuya, 1967; 1968; Raghavan, 1973). Uma explicação para isto seria a da existência de dois fotorreceptores, o fitocromo e um outro que absorve luz azul, regulando a germinação dos esporos (Reynolds e Raghavan, 1982).

Em *Pteris vittata*, a luz azul inibe a germinação dos esporos. Choques de vermelho dados logo após a exposição à luz azul não conseguem reverter a inibição causada pela luz azul na germinação dos esporos. A inibição causada pela luz azul pode ser revertida pelo vermelho quando se intercala entre as exposições ao azul e ao vermelho, períodos de escuro (Sugai e Furuya, 1967).

Em *Cheilanthes farinosa* o vermelho-extremo não consegue reverter o efeito do vermelho, o qual é revertido pelo azul. Se esporos tratados com luz azul forem então tratados com verme

lho também não irão germinar, sendo a inibição do azul somente revertida por tratamentos com vermelho de alta intensidade. Os esporos que foram então induzidos pelo vermelho de alta intensidade podem ser agora revertidos pelo vermelho-extremo (Raghavan, 1973),

Em *Mohria caffrorum*, o vermelho-extremo não reverte o efeito indutor de germinação do vermelho o que levaria a por em dúvida o envolvimento do fitocromo na germinação destes esporos. Há várias explicações para a não reversibilidade do efeito da luz vermelha pelo vermelho-extremo: a) a ação do fitocromo pode ser mascarada pela presença de outro pigmento, b) o vermelho-extremo não reverte fitocromo em nível suficiente para a não indução da germinação; c) a forma ativa do fitocromo uma vez produzida, é imediatamente usada na fase de pós-indução, não dando tempo para o vermelho-extremo reverter o processo. A relação entre a luz azul e o vermelho ou vermelho-extremo não é clara. Choques curtos de azul revertem o efeito do vermelho, mas choques longos de azul induzem a germinação. Talvez os processos de inibição ou promoção de germinação nos quais a luz azul está envolvida sejam distintos. Assim, esporos que receberam luz vermelha ou vermelho-extremo permaneceram mais tempo sensíveis ao efeito promotor da luz azul do que ao seu efeito inibidor (Reynolds e Raghavan, 1982).

Pelos dados obtidos na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, a germinação destes esporos deve ser regulada pelo fitocromo pois, o efeito indutor da luz vermelha foi revertido pelo vermelho-extremo, mas deve existir um outro processo envolvido pois, a luz apresenta indução à germinação de esporos apesar de não ser um efeito igual ao da luz vermelha, e também,

quando dado o choque de azul após o choque de vermelho, pode-se observar uma redução da germinação e quando dado após choque de vermelho-extremo reverte o efeito deste, apresentando germinação semelhante à apresentada pela luz azul somente.

Talvez um outro pigmento, além do fitocromo, esteja envolvido no processo de germinação dos esporos de *Cyathea delgadii*, mas o efeito da luz azul poderia também ser causado pela absorção da luz azul pelo próprio fitocromo.

Em *Cyathea delgadii* cerca de 60% de seu peso é composto de lipídio e 40% de seu peso é composto de lipídios livres. De acordo com muitos autores os lipídios livres são o material de reserva dos esporos em pteridófitas. Isto, na verdade, foi mostrado em esporos de *Anemia phyllitidis* (Gemmrich, 1982) e em *Onoclea sensibilis* (DeMaggio e Stetler, 1980). Na verdade a luz vermelha poderia estar ativando o fitocromo, que agiria durante a germinação sobre a degradação dos lipídios, pois já foi mostrado em *Anemia phyllitidis* que a atividade de lipase e degradação de lipídios eram ambas aumentadas pela ação da luz vermelha (Gemmrich, 1982). Entretanto, este tipo de verificação não foi feita com os esporos de *Cyathea delgadii* durante a germinação.

RESUMO

As samambaias arbóreas são removidas das matas, em alta escala, para serem usadas como xaxim ou como ornamentação de jardins. Nada tem sido feito para aumentar seu número nas matas de origem ou para cultivá-las comercialmente. A literatura internacional apresenta um grande número de trabalhos de pesquisa, onde são apresentados dados sobre germinação de esporos. No Brasil nada foi feito em relação à germinação das espécies arbóreas nativas. O objetivo deste trabalho é o estudo do efeito de luz e da temperatura na germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb.

Os esporos foram coletados de exemplares de *Cyathea delgadii*, que crescem naturalmente na mata do Instituto de Botânica de São Paulo. A germinação foi realizada em meio de cultura líquido, em câmara de crescimento com temperatura e luz controladas. Foi estudado o efeito de várias temperaturas constantes, temperaturas alternadas e períodos curtos de temperatura baixa ou alta em esporos mantidos a 25°C. Foram feitos experimentos com luz fluorescente branca e com vermelho, vermelho-extremo e azul. A quantidade de lipídios dos esporos foi determinada. Foi também medido o consumo de oxigênio durante os primeiros dias de germinação.

Os esporos são inteiramente fotoblásticos positivos: a germinação foi sempre igual a zero sob condição de escuro, independente da temperatura utilizada.

As melhores temperaturas para a germinação em luz, foram as de 20 e 25°C e os pares alternantes (15-25°C), (20-25°C) e (30-25°C).

A germinação dos esporos não foi afetada pelo fotoperíodo, e parece que a germinação é menos em altas intensidades luminosas. Períodos curtos de vermelho promovem a germinação mas, esta é acentuada quando períodos curtos de vermelho são dados diariamente. A germinação causada pelo vermelho é inibida pelo vermelho-extremo. O vermelho reverte o efeito do vermelho-extremo. Germinação também ocorre sob luz azul. O vermelho-extremo reverte o efeito do azul. O azul diminui o efeito do vermelho, mas não reverte o efeito.

Pelos dados obtidos, a germinação poderia ser regulada pelo fitocromo, pois o efeito do vermelho foi revertido pelo vermelho-extremo mas, deve existir em outro processo envolvido, pois, a luz azul induz a germinação, embora não tão evidente quanto o vermelho. Portanto, talvez um outro pigmento, além do fitocromo, esteja envolvido na germinação dos esporos de *Cyathea delgadii*.

Em relação ao consumo de oxigênio, há um aumento do consumo entre 0 e 1 dia de germinação que, então se estabiliza até o dia 3. Há um aumento do consumo de oxigênio, novamente, entre o 3º e 4º dias de germinação.

Os lipídios são responsáveis pela maior parte do peso dos esporos de *Cyathea delgadii*.

BIBLIOGRAFIA

- BARTNICKI-GARCIA, S. e NICKERSON, W.J., 1962. Isolation, composition and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. *Biochim. Biophys. Acta.* 58: 102-119.
- BORTHWICK, H.A., HENDRICKS, S.B., PARKER, M.W., TOOLE, E.H. e TOOLE, V.K., 1952. A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38:662-666.
- BUTLER, W.L., MORRIS, K.H., SIEGELMAN, H.W. e HENDRICKS, S.B., 1959. Detection, assay and preliminary purification of the pigment controlling photo-responsive development in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45:1703-1708.
- CHEN, C.Y. e IKUMA, H., 1979. Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores. V. Analysis of germination processes by means of temperature. *Plant Physiol.* 63:704-708.
- DEMAGGIO, A.E. e STETLER, D.A., 1980. Storage products in spores of *Onoclea sensibilis* L.. *Am. J. Bot.* 67:452-455.

- DYER, A.F., 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In A.F.Dyer (ed) The Experimental Biology of Ferns. Academic Press, London, pp. 253-305.
- EVENARI, M., 1965. Light and seed dormancy. In W.Ruhland(ed), Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 1512, Springer-Verlag Berlin, pp.804-847.
- FELIPPE, G.M., 1978. Effects of temperature on germination of *Rumex obtusifolius*. Revta do Museu Paulista 25:173-181.
- FLINT, L.H. e MCALISTER, E.D., 1935. Wavelenght of radiation in the visible spectrum inhibiting the germination of light sensitive lettuce seed. Smithson. Misc. Collect. 94:1-11.
- FLINT, L.H. e MCALISTER, E.D., 1937. Wavelenght of radiation in the visible spectrum promoting the germination of light sensitive lettuce seed. Smithson. Misc. Collect. 96:1-8.
- GEMMRICH, A.R., 1982. Effect of red light and gibberellic acid on lipid metabolism in germinating spores of the fern *Anemia phyllitidis*. Physiol. Plant. 54:58-62.
- HARTT, C.E., 1925. Conditions for germination of spores of *Onoclea sensibilis*. Bot. Gaz. 79:427-440.
- HOWLAND, G.P. e EDWARDS, M.E., 1979. Photomorphogenesis in fern gametophytes. In A.F.Dyer (ed), The Experimental Biology of Ferns. Academic Press, London, pp. 393-434.

- HUCKABY, C.S. e RAGHAVAN, V., 1981. Photocontrol of spore germination in the fern *Thelypteris kunthii*. *Physiol. Plant.* 51:19-22.
- ISIKAWA, S. e OOHUSA, T., 1956. Effects of light upon the germination of spores of ferns II. Two light-periods of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai.. *Bot. Mag. (Tokyo)* 69:132-137.
- KUMAGAI, T. e ODA, Y., 1969. Blue and near ultravioletreversible photoreaction in conidial development of the fungus *Alternaria tomato*. *Dev. Growth Differ.* 11:130-142.
- MAYER, A.M. e POLJAKOFF-MAYBER, A., 1975. The germination of seeds. Pergamon Press Ltd., Oxford, 192p.
- MILLER, J.H., 1968. Fern gametophytes as experimental material. *Bot. Rev.* 34:361-440.
- MILLER, J.H. e MILLER, P.M., 1961. The effect of different light conditions and sucrose on the growth and development of the gametophyte of the fern *Onoclea sensibilis*. *Am. J. Bot.* 48:154-159.
- MOHR, H., 1956. Die Beeinflussung der Keimung von Farnsporen durch Licht und andere Faktoren. *Planta*, 46:534-551.
- MOHR, H., 1972. Lectures on Photomorphogenesis. Springer-Verlag, Berlin, 237p.

- MOHR, H., MEYER, U. e HARTMANN, K., 1964. Die Beeinflussung der Farnsporen-Keimung (*Osmunda cinnamomea* (L.) und *O. claytoniana* (L.)) über das Phytochromsystem und die Photosynthese. *Planta* 60:483-496.
- NORONHA, A., VICENTE, M. e FELIPPE, G.M., 1976. Effect of storage and growth conditions on photoblasticity of seeds of *Cucumis anguria* L. *Hoehnea*, 6:7-10.
- NORONHA, A., VICENTE, M. e FELIPPE, G.M., 1978. Photocontrol of germination of *Cucumis anguria* L.. *Biol. Plant.* 20:281-286.
- POLO, M. e FELIPPE, G.M., 1981. Ecofisiologia da germinação de sementes de algumas ervas em uma cultura de milho: resultados preliminares. An. II Sem. Reg. Ecol. UFSCar.:31-50.
- POLO, M. e FELIPPE, G.M., 1983. Germinação de ervas invasoras: efeito de luz e escarificação. *Rev. Bras. Bot.* 6 (no prelo).
- RAGHAVAN, V., 1973. Blue light interference in the phytochrome-controlled germination of the spores of *Cheilanthes farinosa*. *Plant Physiol.*, 51:306-311.
- RANDI, A.M., 1980. Germinação de *Stevia rebaudiana* Bert.. Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas.
- REYNOLDS, T.L., 1982. Effects of cyanide, salicylhydroxamic acid and temperature on respiration and germination of spores of the fern *Sphaeropteris cooperi*. *Physiol. Plant.* 54:52-57.

- REYNOLDS, T.L. e RAGHAVAN, V., 1982. Photoinduction of spore germination in a fern, *Mohria caffrorum*. Ann. Bot. 49:227-233.
- SNEDECOR, G.N., 1962. Statistical Methods. The Iowa State University Press, Ames., 534p.
- SPIESS, L.D. e KROUK, M.G., 1977. Photocontrol of germination of spores of the fern *Polypodium aureum*. Bot. Gaz. 138:428-433.
- SUGAI, M., 1971. Photomorphogenesis in *Pteris vittata* IV. Action spectra for inhibition of phytochrome-dependent spore germination. Plant Cell Physiol. 12:103-109.
- SUGAI, M. e FURUYA, M., 1967. Photomorphogenesis in *Pteris vittata* I. Phytochrome-mediated spore germination and blue light interaction. Plant Cell Physiol. 8:737-748.
- SUGAI, M. e FURUYA, M., 1968. Photomorphogenesis in *Pteris vittata* II. Recovery from blue-light-induced inhibition of spore germination. Plant Cell Physiol. 9:671-680.
- TOWILL, L.R., 1978. Temperature and photocontrol of *Onoclea* spore germination. Plant Physiol. 62:116-119.
- TOWILL, L.R. e IKUMA, H., 1973. Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores I. Action spectrum. Plant Physiol. 51:973-978.

- TOWILL, L.R. e IKUMA, H., 1975a. Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores II. Analysis of germination processes by means of anaerobiosis. *Plant Physiol.* 55:150-154.
- TOWILL, L.R. e IKUMA, H., 1975b. Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores. III. Analysis of germination processes by means of cycloheximide. *Plant Physiol.* 55:803-808.
- UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. e STAUFFER, J.F., 1966. *Manometric Techniques.* Burges Publishing Company, Minneapolis, 305p.
- WEINBERG, E.S. e VOELLER, B.R., 1969. Induction of fern spore germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64:835-842.
- WHITTIER, D.P., 1973. The effect of light and other factors on spore germination in *Botrychium dissectum*. *Can. J. Bot.* 51:1791-1794.