

ASPECTOS FOTOMORFOGÊNICOS, BIOQUÍMICOS  
E CITOQUÍMICOS DURANTE A GERMINAÇÃO DE  
ESPOROS DE *Cyathea delgadii* STERNB.

esta tese defendida pela caríssima Aúrea  
Maria Randi aprovada pela comissão  
julgarosa.

ÁUREA MARIA RANDI

Campinas, 12 de junho de 1987

Felipe

ASPECTOS FOTOMORFOGÊNICOS, BIOQUÍMICOS E CITOQUÍMICOS  
DURANTE A GERMINAÇÃO DE ESPÓROS DE  
*Cyathia delgadii* STERNB.

Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia da Universidade  
Estadual de Campinas, para ob-  
tenção do título de DOUTOR EM  
CIÊNCIAS.

ORIENTADOR:

PROF. DR. GIL MARTINS FELIPPE

CAMPINAS - SP  
1987

UNICAMP

- A G R A D E C I M E N T O S -

Ao Dr. *GIL MARTINS FELIPPE*, pela sua orientação objetiva, pela dedicação e amizade, que muito contribuíram para minha formação profissional.

Ao Dr. *IVANY FERRAZ MARQUES VÁLIO* pelas valiosas sugestões e pelo incentivo durante o período em que orientou parte deste trabalho.

Ao Dr. *BENEDICTO DE CAMPOS VIDAL* e ao Prof. *ANGELO LUIZ CORTELAZZO*, do Departamento de Biologia Celular, que orientaram com entusiasmo o trabalho sobre citoquímica dos esporos.

Ao Dr. *LADASLAV SODEK*, pelos esclarecimentos prestados sobre métodos de bioquímica e uso de equipamentos.

À Sra. *ANNA GAGLIARDI*, Diretora Técnica da Biblioteca do Instituto de Biologia, pela revisão da literatura citada.

Ao Dr. *HELION VARGAS*, do Departamento de Eletrônica Quântica do Instituto de Física da Universidade Estadual

de Campinas, pelo uso do espectro fotoacústico.

Ao Engenheiro Agrônomo *JOÃO PAULO FEIJÃO TEIXEIRA*, da Secção de Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas, pelo uso do cromatógrafo a gás para análise dos ácidos graxos.

À *UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA*, pelo afastamento concedido e apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À *COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)* pela bolsa de estudos (PICD) concedida.

A todos os *PROFESSORES, COLEGAS* e *FUNCIÓNÁRIOS* do Departamento de Fisiologia Vegetal, pela amizade e auxílios prestados.

Quero agradecer também aos *PROFESSORES, COLEGAS* e *FUNCIÓNÁRIOS* do Departamento de Biologia Celular, pela amizade e incentivo, durante o período em que lá trabalhei.

À Dra. *YARA STRUEALDI*, da Secção de Ecologia do Instituto de Botânica de São Paulo, quero estender meus agradecimentos, pela sua gentileza em possibilitar facilidades nas coletas do material usado neste trabalho.

- Í N D I C E -

	Páginas
I N T R O D U Ç Ã O . . . . .	1
O B J E T I V O S . . . . .	10
M A T E R I A I S E M É T O D O S . . . . .	11
1. Métodos Gerais . . . . .	12
1.1 - Padronização da amostragem para a conta gem de germinação de esporos . . . . .	13
2. Fotomorfogênese. . . . .	15
2.1 - Luz vermelha na determinação do período de pré-indução e tratamentos múltiplos ; reversão vermelho-vermelho extremo . . . . .	16
2.2 - Tratamentos luminosos de longa duração . . . . .	17
2.3 - Luz azul . . . . .	18
2.4 - Espectro fotoacústico de esporos e pare- des de esporos . . . . .	19
2.5 - Efeito de temperatura na pré-indução . . . . .	20
2.6 - Pré-embebição em vapor de água . . . . .	23
3. Pré-embebição em solução osmótica de polietile- noglicol . . . . .	24
4. Efeito de DCMU . . . . .	25
5. Peso fresco e peso seco. . . . .	25
6. Extrações e dosagens . . . . .	27
6.1 - Extração e dosagem de lipídios . . . . .	27
6.1.1 - Espectro de transmissão de luz, do óleo de esporos . . . . .	28

6.1.2 - Análise dos ácidos graxos p o r cromatografia gasosa . . . . .	29
6.2 - Extração e dosagem de clorofila. . . . .	30
6.3 - Extração e dosagem de proteínas solúveis .	32
6.4 - Extração e dosagem de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e amido . . . . .	33
6.4.1 - Dosagem de açúcares solúveis to- tais . . . . .	34
6.4.2 - Dosagem de açúcares redutores. .	34
6.4.3 - Dosagem de amido . . . . .	35
7. Citoquímica. . . . .	36
7.1 - Métodos gerais e citoquímicos para deter- minações qualitativas. . . . .	37
7.2 - Digestões enzimáticas para a extração de proteínas. . . . .	38
8. Análise estatística. . . . .	39
R E S U L T A D O S . . . . .	41
1. Padronização da amostragem para a contagem de esporos durante a germinação . . . . .	41
2. Fotomorfogênese. . . . .	41
- Germinação sob luz branca. . . . .	41
- Determinação do período de pré-indução . . . . .	44
- Reversão vermelho-vermelho extremo . . . . .	49
- Tratamentos luminosos de longa duração . . . . .	52
- Tratamentos com luz azul . . . . .	64
- Espectro fotoacústico de esporos secos e pa-	

	Páginas
redes de esporos . . . . .	67
- Efeito de temperatura. . . . .	70
- Prē-embebição em vapor de água durante uma semana . . . . .	83
3. Prē-embebição em solução osmótica de polietile noglicol . . . . .	97
4. Efeito de DCMU . . . . .	99
5. Peso fresco e peso seco. . . . .	99
6. Extrações e dosagens . . . . .	102
- Lipídios . . . . .	102
- Clorofila. . . . .	110
- Proteínas solúveis . . . . .	114
- Açúcares solúveis totais . . . . .	114
- Açúcares redutores . . . . .	117
- Amido. . . . .	122
7. Aspectos citoquímicos. . . . .	125
8. CONCLUSÕES DOS RESULTADOS OBTIDOS. . . . .	136
D I S C U S S Ã O . . . . .	139
R E S U M O . . . . .	174
LITERATURA CITADA . . . . .	178

- ÍNDICE DE TABELAS -

	Páginas
TABELA 1 - Padronização de amostragem para contagem de esporos durante a germinação de <i>Cyathea delgadii</i> . . . . .	42
TABELA 2 - Efeito de tratamentos luminosos de curta duração, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , após um período de 48 horas de embebição no escuro . . . . .	45
TABELA 3 - Determinação do período de pré-indução para esporos de <i>Cyathea delgadii</i> . . . . .	46
TABELA 4 - Germinação sob luz branca constante e após tratamento de 1 minuto de luz vermelha (fonte b) realizado depois do período de pré-indução, para esporos de <i>Cyathea delgadii</i> . . . . .	48
TABELA 5 - Reversão do efeito da luz vermelha de 1 minuto de duração, pelo vermelho extremo, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> . . . . .	53
TABELA 6 - Efeito de tratamentos de luz azul de 1 minuto de duração (únicos e diários) e de tratamentos longos (24, 48 e 120 horas) na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , a 25°C. . . . .	66
TABELA 7 - Efeito de temperaturas durante o período de pré-indução, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha após a pré-indução. . . . .	71
TABELA 8 - Efeito de temperaturas durante o período de pré-indução, na germinação de <i>Cyathea delgadii</i> , que receberam tratamentos diários de 1 minuto de luz vermelha, intercalados por períodos de 24 horas de escuro . . . . .	73
TABELA 9 - Efeito da temperatura durante os períodos de pré-indução e pós-indução, sobre a germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> que receberam um único tratamento de 1 minuto de luz vermelha, após a pré-indução . . . . .	75
TABELA 10 - Efeito da temperatura durante os períodos de pré-indução e pós-indução, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , que receberam tratamentos diários de 1 minuto de luz vermelha, intercalados por períodos de 24 horas de escuro . . . . .	76



TABELA 11 - Efeito de alternância de temperaturas em ciclos de 8-16 horas durante a pré-indução, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha, após a pré-indução . . . . .	78
TABELA 12 - Efeito de alternância de temperaturas em ciclos de 12-12 horas, durante a pré-indução, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha, após a pré-indução . . . . .	79
TABELA 13 - Efeito de alternância de temperaturas em ciclos de 16-8 horas, durante a pré-indução, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha, após a pré-indução . . . . .	80
TABELA 14 - Efeito de alternância de temperaturas em ciclos de 8-16 horas, durante a pré-indução e pós-indução, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha após a pré-indução. . . . .	82
TABELA 15 - Efeito de alternância de temperaturas em ciclos de 12-12 horas, durante a pré-indução e pós-indução, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha após a pré-indução. . . . .	84
TABELA 16 - Efeito de alternância de temperaturas em ciclos de 16-8 horas, durante a pré-indução e pós-indução, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha após a pré-indução. . . . .	85
TABELA 17 - Efeito de DCMU, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> sob luz fluorescente branca constante, a 25°C. . . . .	100
TABELA 18 - Peso fresco e peso seco de esporos secos (dia zero) de <i>Cyathea delgadii</i> e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca contínua, a 25°C. . . . .	101
TABELA 19 - Relação entre conteúdo de lipídio e pesos frescos e seco (dados da tabela 18) em esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca contínua, a 25°C. . . . .	104
TABELA 20 - Composição de ácidos graxos do óleo de esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> . . . . .	109

TABELA 21 -	Relação entre conteúdo de clorofila e pesos fresco e seco (dados da tabela 18) em esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca contínua, a 25°C. .	113
TABELA 22 -	Relação entre conteúdo de proteína e pesos fresco e seco (dados da tabela 18) em esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca contínua, a 25°C. .	116
TABELA 23 -	Relação entre conteúdo de açúcares e polissacarídeos solúveis e pesos fresco e seco (dados da tabela 18), em esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca contínua, a 25°C. . . . .	119
TABELA 24 -	Relação entre conteúdo de açúcares redutores e pesos fresco e seco (dados da tabela 18), em esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca contínua, a 25°C. . . . .	121
TABELA 25 -	Relação entre conteúdo de amido e pesos fresco e seco (dados da tabela 18), em esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca contínua, a 25°C. . . .	124

- ÍNDICE DE FIGURAS -

	Páginas
FIGURA 1 - Espectro de transmissão dos papéis celofane vermelho e azul na faixa compreendida entre 400 a 800 nm. . . . .	16
FIGURA 2 - Diagrama do espectrômetro fotoacústico .	21
FIGURA 3 - Curva de germinação sob luz branca contínua, a 25 <sup>o</sup> C para esporos de <i>Cyathea delgadii</i> recém coletados. . . . .	43
FIGURA 4 - Efeito de tratamentos múltiplos de luz vermelha, de 1 minuto de duração, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> ..	50
FIGURA 5 - Correlação entre tratamentos múltiplos de luz vermelha e a germinabilidade de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> . . . . .	51
FIGURA 6 - Determinação do tempo de escape da reversão do efeito da luz vermelha pelo vermelho extremo, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> . . . . .	54
FIGURA 7 - Correlação entre horas de escuro intercaladas entre tratamentos de luz vermelha e vermelho extremo e a germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> . . . . .	55
FIGURA 8 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , a 25 <sup>o</sup> C. . . . .	57
FIGURA 9 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , a 25 <sup>o</sup> C. . . . .	58
FIGURA 10- Efeito de tratamentos luminosos de longa duração, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , a 25 <sup>o</sup> C. . . . .	59
FIGURA 11- Efeito de tratamentos luminosos de longa duração, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , a 25 <sup>o</sup> C. . . . .	61
FIGURA 12- Efeito de tratamentos luminosos de 1 minuto de duração e de luz contínua na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> a 25 <sup>o</sup> C . . . . .	62
FIGURA 13- Efeito de tratamentos luminosos de longa duração (24 e 48 horas) na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , a 25 <sup>o</sup> C. . .	63

FIGURA 14 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração (24 e 48 horas) na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , a 25°C. . . . .	65
FIGURA 15 - Efeito de tratamentos longos de luz vermelha associados a tratamentos longos de luz azul, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , a 25°C . . . . .	68
FIGURA 16 - Espectro fotoacústico de esporos secos e paredes de esporos de <i>Cyathea delgadii</i>	69
FIGURA 17 - Efeito da pré-embebição de esporos em vapor de água, na germinação de <i>Cyathea delgadii</i> , a 25°C. . . . .	87
FIGURA 18 - Tratamentos luminosos de 1 minuto de duração, aplicados após 12, 24, 36 e 48 horas de embebição no escuro. . . . .	88
FIGURA 19 - Tratamentos luminosos de 1 minuto de duração, aplicados após 24, 48, 72 e 96 horas de embebição no escuro. . . . .	90
FIGURA 20 - Tratamentos luminosos de 1 minuto de duração, únicos e diários, aplicados após 24 horas de embebição no escuro . . . . .	92
FIGURA 21 - Tratamentos luminosos de 1 minuto de duração, únicos, aplicados após 24 ou 48 horas de embebição no escuro; diários aplicados após 48 horas de embebição no escuro. . . . .	94
FIGURA 22 - Tratamentos luminosos de 8 horas de duração, aplicados após 24 ou 48 horas de embebição no escuro . . . . .	96
FIGURA 23 - Germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25°C, para esporos de <i>Cyathea delgadii</i> pré-embebidos em solução osmótica de polietilenoglicol . . . . .	98
FIGURA 24 - Conteúdo de lipídios livres em esporos secos (dia zero) de <i>Cyathea delgadii</i> e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante a 25°C. . . . .	103
FIGURA 25 - Espectro de transmissão de luz do óleo de esporos secos na faixa da luz visível (400 a 800 nm). . . . .	106
FIGURA 26 - Espectro de transmissão de luz do óleo de sementes de algodão ( <i>Gossypium hirsutum</i> ) na faixa da luz visível (400 a 800 nm). . . . .	107
FIGURA 27 - Cromatografia gasosa dos ácidos graxos componentes do óleo de esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> . . . . .	108

FIGURA 28 - Espectros de absorção de luz de extratos de esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> .	111
FIGURA 29 - Conteúdo de clorofila em esporos de <i>Cyathea delgadii</i> e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante a 25°C. . . . .	112
FIGURA 30 - Conteúdo de proteínas solúveis, em esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25°C. . . . .	115
FIGURA 31 - Conteúdo de açúcares e polissacarídeos solúveis (fração MCW e fração etanol 10%) em esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25°C . . . . .	118
FIGURA 32 - Conteúdo de açúcares redutores (fração MCW e fração etanol 10%) em esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25°C. . . . .	120
FIGURA 33 - Conteúdo de amido em esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25°C . . . . .	123
FIGURA 34 - Cortes de esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> , corados pela hematoxilina-eosina.	126
FIGURA 35 - Cortes de gametófitos de <i>Cyathea delgadii</i> , com 7 dias de embebição, corados pela hematoxilina-eosina. . . . .	126
FIGURA 36 - Cortes de esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> , corados pelo azul de toluidina a pH 4,0. . . . .	128
FIGURA 37 - Cortes de gametófitos de <i>Cyathea delgadii</i> , com 7 dias de embebição, corados pelo azul de toluidina a pH 4,0 . . . . .	128
FIGURA 38 - Cortes de gametófitos de <i>Cyathea delgadii</i> , com 7 dias de embebição, corados pelo azul de toluidina a pH 4,0 . . . . .	129
FIGURA 39 - Gametófito intacto de <i>Cyathea delgadii</i> , com 7 dias de embebição, corados pelo azul de toluidina a pH 4,0. . . . .	129
FIGURA 40 - Cortes de esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> corados pelo azul de toluidina a pH 4,0, observados em microscópio de polarização com analisador e polarizador cruzados. . . . .	130

- FIGURA 41 - Cortes de esporos secos de *Cyathea delgadii* corados pelo xylidine-ponceau a pH 2,5. . . . . 133
- FIGURA 42 - Cortes de gametófito de *Cyathea delgadii*, com 7 dias de embebição, corados pelo xylidine-ponceau a pH 2,5. . . . . 133
- FIGURA 43 - Gametófitos intactos de *Cyathea delgadii*, com 7 dias de embebição, corados pelo xylidine-ponceau a pH 2,5 . . . . . 134
- FIGURA 44 - Cortes de esporos secos de *Cyathea delgadii* submetidos à digestão pela pepsina e posteriormente corados pelo xylidine-ponceau a pH 2,5 . . . . . 135
- FIGURA 45 - Cortes de gametófito de *Cyathea delgadii*, com 7 dias de embebição, submetidos à digestão pela tripsina e a seguir corados pelo xylidine-ponceau a pH 2,5. . . . . 135

## - I N T R O D U Ç Ã O -

A germinação de uma semente, um esporo ou sistema semelhante caracteriza-se pelo início do crescimento em que o período de latência de estruturas quiescentes ou dormentes é substituído por um período ativo. Nos últimos anos, uma vasta bibliografia sobre a germinação de sementes de angiospermas, utilizando-se métodos bioquímicos e biologia molecular, vem se acumulando.

As pteridófitas representam um grupo que produz esporos potencialmente úteis para análises fisiológicas e bioquímicas da germinação. Esporos podem germinar diretamente em contato com a água ou solução simples de sais minerais, no escuro completo ou em resposta a um determinado tratamento luminoso ou hormônio de crescimento; as substâncias orgânicas necessárias provêm do metabolismo das reservas do próprio esporo (RAGHAVAN, 1980).

A primeira mudança morfológica de um esporo em germinação é resultado de uma divisão celular assimétrica, originando o aparecimento de uma estrutura papilada que a seguir, se diferencia em rizóide. A etapa seguinte é o aparecimento da célula protalial, em ângulo com o rizóide. A célula protalial pode funcionar diretamente como a célula protonemal, ou esta pode ser originada de outra divisão ce

lular. O padrão de diferenciação dos esporos é simples, mas bem definido. Atua como um sistema experimental conveniente para estudos de desenvolvimento celular, evitando a complexidade de sistemas multicelulares como as sementes. Os esporos de diversas espécies de pteridófitas respondem a determinados comprimentos de onda ou hormônios de crescimento. Assim sendo, eles poderiam servir como modelo para a interpretação de mecanismos de germinação de sementes (RAGHAVAN, 1980).

A maioria das pteridófitas possui esporos que apresentam dormência que pode ser sobrepujada pela luz. MILLER (1968) mostrou que entre 88 espécies estudadas, apenas 7 possuíam esporos que germinavam em número considerável, na escuridão completa, quando recebiam umidade, oxigênio e temperaturas favoráveis.

O envolvimento do fitocromo no controle da germinação de esporos de pteridófitas é complexo e tem sido estudado por diversos pesquisadores.

De acordo com SUGAI e FURUYA (1967, 1968) pelo menos três fotorreações, duas das quais são controladas pelo fitocromo, estão envolvidas na germinação de esporos de *Pteris vittata*. A primeira fotorreação mediada pelo fitocromo é a promoção da germinação que ocorre em resposta à luz vermelha de baixa energia ( $400 \text{ erg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$  durante 5 segundos) e que é revertida pelo vermelho extremo ( $7,5 \text{ Kerg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$  durante 16 segundos). A outra reação mediada pelo fitocromo é a reversão da inibição causada pela luz azul, após tratamento com luz vermelha e a manutenção dessa inibição, pelo vermelho-extremo. A germinação induzida pela luz vermelha pode também ser inibida pela luz



azul com picos a 380 e 440 nm, para algumas espécies. Isto seria evidência de que existem fotorreações onde um pigmento que absorve luz azul participa (SUGAI *et al.*, 1977). Esse pigmento é chamado de P<sub>B-NUV</sub> (blue and near UV - light-absorbing pigment: pigmento que absorve próximo ao UV e luz azul) e FURUYA (1983) propõe um modelo para explicar a interação desse pigmento e do fitocromo. Um fator desconhecido X estaria em sua forma inativa no escuro ou após exposição à luz azul ou vermelho extremo e passaria à forma ativa na presença de Fve (fitocromo vermelho extremo) induzindo a germinação.

Tratamentos luminosos não têm efeito em esporos dormentes secos (não embebidos), mas a fotossensibilidade dos esporos se desenvolve durante um período de embebição, sob condições aeróbicas. Esse período é chamado de período de pré-indução (TOWILL e IKUMA, 1975a). A duração da embebição que causa a máxima germinação fotoinduzida varia de espécie para espécie, como mostra FURUYA (1983). Esse autor mostra para 7 diferentes espécies, períodos de pré-indução que variaram de 3 horas a 4 dias. A aplicação de cicloheximida 0,1 mM durante a pré-indução, inibiu a germinação de esporos de *Onoclea sensibilis*, indicando o possível envolvimento da síntese de proteínas na germinação dessa espécie (TOWILL e IKUMA, 1975b). A fase posterior à pré-indução, onde a luz induz a máxima germinação é chamada de fase de fotoindução. O período subsequente de escuro, onde os processos de fotoindução levam à divisão celular, e eventualmente à protrusão visível das células rizoidal e protonemal é a fase de pós-indução (TOWILL e IKUMA, 1975a). A temperatura influencia as fases de pré-indução e pós-indu-

ção. CHEN e IKUMA (1979) verificaram que temperaturas de 40°C reduzem o desenvolvimento da fotossensibilidade de esporos de *Onoclea sensibilis* a níveis mínimos, irreversivelmente. A fase de pós-indução também é sensível a essa temperatura, havendo inibição reversível da germinação de esporos fotoinduzidos que receberam tratamento de 40°C logo após o tratamento luminoso indutor.

TOMIZAWA *et al.* (1983) estimaram espectrofotometricamente as porcentagens de Fve após irradiações com luz vermelha a 660 nm e encontraram uma correlação positiva entre a proporção de Fve e a germinação de esporos de *Lygodium japonicum*. Observaram também que esporos dessa espécie apresentaram 16 a 34% de Fve após irradiação com luz azul, mas a germinação foi totalmente inibida. Isto sugere que o sistema que absorve luz azul poderia atuar eliminando um passo específico do processo de germinação, porém não afetando diretamente a fotoconversão do fitocromo. FURUYA (1985) sugere que em uma amostra de esporos, o fitocromo sofre as fototransformações sincrônica e gradualmente, mas que a necessidade de determinado nível de Fve para a germinação, poderia ser diferente para cada esporo.

Quanto às substâncias de reservas presentes em esporos foi verificado que esporos de *Anemia phyllitidis* contêm 56% de lipídios e destes 86% são triglicerídeos (GEMM RICH, 1977). DEMAGGIO e GREENE (1980) observaram que esporos de *Onoclea sensibilis* apresentam cerca de 27% de lipídios e que a diminuição dos lipídios durante a germinação está associada a um aumento da atividade de enzimas do ciclo do glioxilato, tais como isocitrato liase e malato sintase. A enzima lipase também é bastante ativa após trata-

mento com luz vermelha, como observou GEMMICH (1982) para esporos de *Anemia phyllitidis*.

Experimentos com autoradiografia, onde foram utilizadas timidina-<sup>3</sup>H, uridina-<sup>3</sup>H e leucina-<sup>3</sup>H mostraram que ocorre síntese de DNA nuclear e citoplasmático, em esporos de *Pteris vittata*, poucas horas após o tratamento luminoso. Foram observadas também: a hidrólise de proteínas granulares, a incorporação de uridina-<sup>3</sup>H nos nucléolos, indicando síntese de RNA e incorporação de leucina-<sup>3</sup>H em novas proteínas (RAGHAVAN, 1977a).

Mudanças na composição bioquímica de esporos em germinação têm sido estudadas por diversos autores nos últimos anos. Em esporos de *Adiantum capillus veneris* L., MINAMIKANA *et al.* (1984) observaram que grande parte das reservas são lipídios, cujo conteúdo diminui durante a germinação. Açúcares solúveis ou insolúveis também são importantes fontes de carbono e energia durante a embebição e germinação. Esses autores detectaram também duas proteínas de reserva que desaparecem durante a germinação.

#### Estudos Realizados no Brasil, sobre a Germinação de Esporos de Pteridófitas

No Brasil, os estudos sobre a germinação de esporos de pteridófitas são recentes e há poucos trabalhos publicados. Dentre estes, três foram publicados em periódicos e os demais em anais e resumos de congressos. Há duas teses de mestrado sobre a germinação de esporos de pteridófitas e uma sobre desenvolvimento de gametófitos em que são apresentados também alguns dados sobre germinação.

MARCONDES-FERREIRA e FELIPPE (1984) verificaram o efeito da luz e da temperatura na germinação de esporos de

*Cyathea delgadii*. Esses autores observaram que esporos recém coletados germinam a 15, 20, 25 e 30°C, mas somente a 20, 25 e 30°C após 7 meses de armazenamento a 4°C. Determinaram que o período de pré-indução era de cerca de 48 horas e o de indução compreendido entre 1 e 3 horas.

Estudos sobre a germinação e morfologia de esporos de *Trichipteris corcovadensis* foram realizados por ESTEVES *et al.* (1985). Os autores observaram que os esporos são fotoblásticos positivos e que a temperatura ótima de germinação é a de 25°C. As mais altas porcentagens de germinação ocorreram em intensidades luminosas de 220 a 320  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$  e a germinação ocorreu somente com fotoperíodos de 8 horas ou acima. Os esporos apresentaram porcentagens constantes de germinação até 135 dias de armazenamento a 4°C e após esse período, a germinação foi reduzida.

A fotossensibilidade de esporos de pteridófitas dos cerrados foi estudada por ESTEVES e FELIPPE (1985a). Os autores verificaram que de 9 espécies estudadas, quais sejam: *Anemia flexuosa*, *Anemia raddiana*, *Adiantum serratodontatum*, *Doryopteris concolor*, *Polypodium hirsutissimum*, *Polypodium latipes*, *Polypodium squamulosum*, *Polypodium pleopeltifolium* e *Polypodium polypodioides*, somente as duas últimas apresentaram baixa germinação no escuro e alta na luz. As outras, germinam somente sob luz contínua.

Há várias citações em anais e resumos.

Efeito de temperatura na germinação de esporos de *Cyathea delgadii* foi verificado e constatou-se que a melhor temperatura constante para a germinação é a de 25°C e os pares alternantes 25-10°C, 25-20°C e 25-30°C. Os esporos germinam em luz contínua. Períodos curtos de luz bran

ca, quando os esporos eram mantidos a 25<sup>0</sup>C no escuro, promoveram a germinação (MARCONDES-FERREIRA e FELIPPE, 1982a, b).

ESTEVES e FELIPPE (1982, 1983 a,b) analisaram o efeito de temperaturas sob luz contínua e escuro, bem como reguladores de crescimento na germinação de esporos de *Trichipteris corcovadensis*. A germinação máxima ocorreu a 25<sup>0</sup>C e nenhum dos reguladores de crescimento testados promoveu a germinação. Tratamentos luminosos com luz vermelha, luz azul, luz verde e vermelho extremo induziram a mesma taxa de germinação.

ESTEVES e FELIPPE (1984, 1985 b,c) verificaram que esporos de *Polypodium latipes* são fotoblásticos positivos a 25<sup>0</sup>C e que a máxima germinação sob luz constante ocorre após 6 dias de embebição. Testaram também os efeitos do pH do meio, do alumínio e das temperaturas constantes ou alternadas (em três condições de alternância). Verificaram que a germinação não ocorre com os pares de temperaturas 25-40<sup>0</sup>C e 25-45<sup>0</sup>C. Temperatura de 25<sup>0</sup>C reverte o efeito inibitório de 35<sup>0</sup>C, nas três condições de alternância utilizadas (8-16h, 12-12h e 16-8h).

FELIPPE *et al.* (1985) verificaram o efeito da luz na germinação de esporos de *Cyathea delgadii* e de *Trichipteris corcovadensis*. Ambas são fotoblásticas positivas a 25<sup>0</sup>C.

RANAL (1985, 1986) estudou o efeito de temperaturas e intensidades luminosas na germinação de 8 espécies coletadas em mata latifoliada semidecídua. As espécies estudadas foram *Adiantopsis radiata*, *Polypodium hirsutissimum*, *Polypodium latipes*, *Polypodium lindbergii*, *Poly*

*podium pleopeltifolium*, *Polypodium polypodioides*, *Polypodium squamulosum* e *Pteris denticulata*. Verificou que para todas as espécies a melhor germinação ocorreu entre 21,7°C e 25,2°C e que houve uma diminuição gradativa na germinação de esporos em intensidades luminosas mais baixas.

RANDI e FELIPPE (1985, 1986) observaram que tratamentos de luz vermelha de 1 minuto de duração, fornecidos após 48 horas de embebição no escuro, promovem a germinação de *Cyathea delgadii*. Verificaram que a melhor temperatura para a pré-indução de esporos fotoinduzidos, com 1 minuto de luz vermelha é a de 25°C. As temperaturas de 35,40 e 45°C durante a pré-indução inibem totalmente a germinação.

RANDI *et al.* (1986) verificaram que o efeito de tratamentos diários de 1 minuto de luz vermelha, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii* é aditivo. Irradiação com 5 minutos de vermelho extremo após o tratamento de 1 minuto de luz vermelha reverte seu efeito. A germinação mais alta ocorreu para esporos que receberam 4 horas de luz branca após o período de pré-indução.

ESTEVES (1987) verificou o efeito da luz na germinação de esporos de três espécies de pteridófitas do cerrado, do gênero *Polypodium*, constatando que as três apresentam esporos fotoblásticos positivos. O estudo de luz e temperatura na germinação de *Polypodium latipes* foi realizado por ESTEVES e FELIPPE (1987). Foi verificado que não houve germinação sob condições de escuro em nenhum regime de temperatura testado. A germinação só ocorreu às temperaturas constantes de 10, 15, 20, 25 e 30°C. Não ocorreu germinação nos pares alternantes 25-40°C e 25-45°C.

MARCONDES-FERREIRA (1983) em sua tese de mestrado verificou o efeito de luz e temperatura na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*. O autor concluiu que 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 não foi afetada pelo fotoperíodo e parece ser menor em altas intensidades luminosas. Observou que ocorreu reversão do efeito de luz vermelha pelo vermelho externo e que a germinação também se deu sob luz azul. Verificou que já ocorre consumo de oxigênio pelos esporos, no 19 dia de embebição e que os lipídios livres correspondem a 43,7% do peso dos esporos.

ESTEVES (1984) em sua tese de mestrado estudou a morfologia e a germinação de esporos de *Trichipteris corcovadensis*. Estudou o efeito de ácido indolil -3- acético, ácido giberélico, 6-benziladenina e ácido 2-cloroetilfosfônico em concentrações de 0 a 100  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  e concluiu que essas substâncias inibem a germinação dessa espécie que possui esporos fotoblásticos positivos. A melhor temperatura para a germinação é a de 25°C. Esta ocorreu sob os comprimentos de onda vermelho, azul, verde e vermelho extremo. Mais de 50% do peso dos esporos é resultante de lipídios e o conteúdo de proteínas solúveis encontrado foi por volta de 10  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de esporos.

Na tese de mestrado de RANAL (1983) que estudou o desenvolvimento de gametófitos, há alguns dados sobre a germinação de algumas espécies de mata latifoliada subtropical semidecídua. As espécies estudadas foram *Polypodium hirsutissimum*, *P. pleopeltifolium*, *P. polypodioides*, *P. squamulosum*, *P. latipes*, *Adiantopsis radiata*, *Pteris denticula*

*ta* e *Polypodium lindbergii*. As melhores temperaturas para a germinação dessas espécies foram as compreendidas entre 21,7°C e 25,2°C. Em iluminâncias abaixo de 2.300 lux a porcentagem de germinação diminuiu sensivelmente.

- OBJETIVOS -

Como pôde ser visto são poucos os trabalhos a respeito da fisiologia da germinação de esporos de pteridófitas realizados no Brasil, apesar da grande diversidade de espécies existentes em nosso território.

Várias espécies de pteridófitas têm sido coletadas em grandes quantidades para ornamentação ou fabricação de xaxim, de uma forma indiscriminada. Nada foi feito ainda no sentido de se preservar essas espécies, nativas em nosso país. É interessante conhecer como essas espécies proliferam, prevendo futuros projetos que visem evitar uma possível extinção.

É importante salientar também que os esporos de pteridófitas, por serem sistemas simples representam material de interesse no estudo da fisiologia da germinação. Muitos de seus mecanismos poderão funcionar como modelo para a interpretação de sistemas mais complexos, como as sementes de plantas superiores.

Decidiu-se então realizar estudos de aspectos da fotomorfogênese de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb., bem como sobre aspectos da mobilização e síntese de metabólitos durante a germinação e desenvolvimento inicial do gametófito. Paralelamente aos estudos bioquímicos, foram realizados estudos citoquímicos.



## - MATERIAIS E MÉTODOS -

*Cyathea delgadii* Sternb é uma samambaia arbórea que ocorre naturalmente nas matas da Reserva Biológica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga.

A espécie foi identificada pelo Dr. Paulo G. Windisch. O material foi coletado por G.M.Felippe, W. Marcondes-Ferreira e L.M.Esteves e recebeu número de coleta ... 11.065, estando depositado no Herbário da Universidade Estadual de Campinas, sob o número UEC 210.61.

Em um experimento foram usadas sementes de *Gossypium hirsutum* L.(algodão).

Os esporos foram coletados quando os soros se apresentavam fechados e com a coloração marrom escura. Os folíolos foram colocados para secar sobre papel de filtro, em câmaras de crescimento (Biotronette Mark III) iluminadas com lâmpadas fluorescentes brancas e incandescentes, o que elevou a temperatura até 30<sup>0</sup>C, facilitando a desidratação do material. Os esporângios abriram e liberaram os esporos. O material permaneceu por 24 a 72 horas nas câmaras, até a completa secagem dos folíolos.

Os esporos retidos no papel de filtro foram removidos com pincel e separados dos esporângios por filtração através de folha simples de lenço de papel ou papel de len

te. Foram então estocados em frascos fechados de vidro e armazenados a 4°C.

## 1. MÉTODOS GERAIS

Esporos previamente separados dos esporângios foram semeados sobre solução nutritiva de MOHR (1956), modificada por DYER (1979) cuja constituição é a seguinte:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  510 mg.  $l^{-1}$

$KNO_3$  120 mg.  $l^{-1}$

$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  1 440 mg.  $l^{-1}$

$KH_2PO_4$  250 mg.  $l^{-1}$

Solução de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  e Na EDTA 1 ml

A solução de ferro é adicionada somente no momento da realização do ensaio. É preparada com 33,2g de NaEDTA, 3,65g de NaOH e 25g de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  para um litro de água destilada.

Foram utilizados erlenmeyers de 125 ml, contendo 25 ml da solução nutritiva. Os erlenmeyers foram vedados com chumaço de algodão e autoclavados a 120°C por 20 minutos. A solução foi acrescida então, de 100 unidades de "nistatina" por mililitro. Os ensaios foram montados em câmara asséptica de fluxo laminar. Uma pequena quantidade de esporos foi retirada do frasco de estocagem, utilizando-se uma espátula. Um leve toque na espátula ocasionava a queda dos esporos sobre a superfície da solução nutritiva.

Após a semeadura, os erlenmeyers contendo os esporos foram colocados em câmaras de germinação com luz e temperaturas controladas. A temperatura usada foi a de 25°C,

com exceção dos experimentos onde se testou o efeito de diferentes temperaturas.

Em geral, o controle era sob luz fluorescente branca constante. Foram utilizadas duas lâmpadas de 15 W e intensidade de  $320 \mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$  (MARCONDES-FERREIRA e FELIPPE,1984). O espectro é mostrado por VÁLIO e JOLY (1979) onde se observa alta transmissão de luz vermelha e pouca de vermelho extremo. A metodologia bem detalhada é apresentada em RANDI (1980).

Nos ensaios de escuro, os erlenmeyers foram colocados no interior de dois sacos plásticos pretos fechados com fita adesiva.

#### 1.1 - Padronização da Amostragem para Contagem de Esporos

Para a contagem de esporos durante a germinação foram utilizados dois erlenmeyers por tratamento sendo contadas três lâminas por erlenmeyer e cem esporos por lâmina.

As contagens foram feitas utilizando-se microscópio binocular Zeiss, aumento de 100 vezes e contador manual Hope. Os esporos foram removidos da solução nutritiva utilizando-se o lado superior de uma pipeta Pasteur, colocada em contato com a superfície da solução, onde flutuavam. O conteúdo retido na pipeta Pasteur foi soprado sobre uma lâmina de vidro e recoberto por lamínula. Foram considerados germinados os esporos que apresentaram protrusão do rizóide. A germinação foi sempre verificada após sete dias de início do experimento, com exceção dos experimentos onde foram montadas curvas de germinação, cujas contagens foram feitas du

rante dez dias consecutivos. No ano de 1985 foram realizadas 8 coletas e fizeram-se curvas de germinação sob luz fluorescente branca constante para cada lote de esporos obtidos por coleta.

## 2. FOTOMORFOGÊNESE

Nos experimentos sobre fotomorfogênese foram usadas as seguintes fontes luminosas:

- a) Luz fluorescente branca (descrita em 1);
- b) Luz vermelha obtida pelo uso de lâmpada fluorescente vermelha, marca Sylvania, de 20 W, com pico a 660 nm (RANDI, 1980);
- c) Luz vermelha obtida pelo uso de lâmpada fluorescente Gro-Lux de 20 W, marca Sylvania e filtro formado por folha simples de papel celofane vermelho;
- d) Luz azul obtida pelo uso de lâmpada fluorescente azul, marca Phillips, de 15 W, com pico a 450 nm (RANDI, 1980) e filtro formado por folha simples de papel celofane azul, para remover a luz vermelha, que essa lâmpada também transmite;
- e) Vermelho extremo foi obtido utilizando-se lâmpada incandescente de 40 W e filtro formado por três folhas de papel celofane azul e duas folhas de papel celofane vermelho, com transmissão máxima a 730 nm (RANDI, 1980).

Os espectros de transmissão dos papéis celofane vermelho e azul são mostrados na figura 1.

A figura 1A mostra que o papel celofane vermelho filtra totalmente a luz azul e permite a passagem da luz vermelha e do vermelho extremo. A figura 1B mostra que o papel celofane azul filtra totalmente a luz vermelha, na faixa compreendida entre 600 a 680 nm, mas permite a passagem de 90% do vermelho extremo.

A lâmpada gro-lux (informações dadas pela CIA Sylvania) apresenta picos de pequena intensidade a 440 nm e 550 nm e um pico de grande intensidade ( $3,0 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) a 660 nm. Os picos que ocorrem nas faixas da luz verde e da luz azul são eliminados pelo uso do filtro de papel celofane vermelho (Figura 1A).

## 2.1 - Luz Vermelha na Determinação do Período de Prê-Indução e Tratamentos Múltiplos; Reversão Vermelho-Vermelho Extremo

Para a determinação do período de prê-indução, luz vermelha (descrita em b) de 1 minuto de duração foi aplicada a esporos que permaneceram por 1, 3, 6, 12, 18, 20, 22, 24, 36 e 48 horas em embebição no escuro, a 25°C. Após o tratamento luminoso, os esporos retornaram ao escuro.

Com o uso da mesma fonte de luz vermelha (b) foi verificado o efeito de tratamentos múltiplos de luz vermelha de 1 minuto, após o período de prê-indução (48h). Amostras de esporos receberam 1, 2, 3, 4 ou 5 tratamentos luminosos, intercalados por períodos de escuro de 24 horas, conforme a seqüência a seguir:

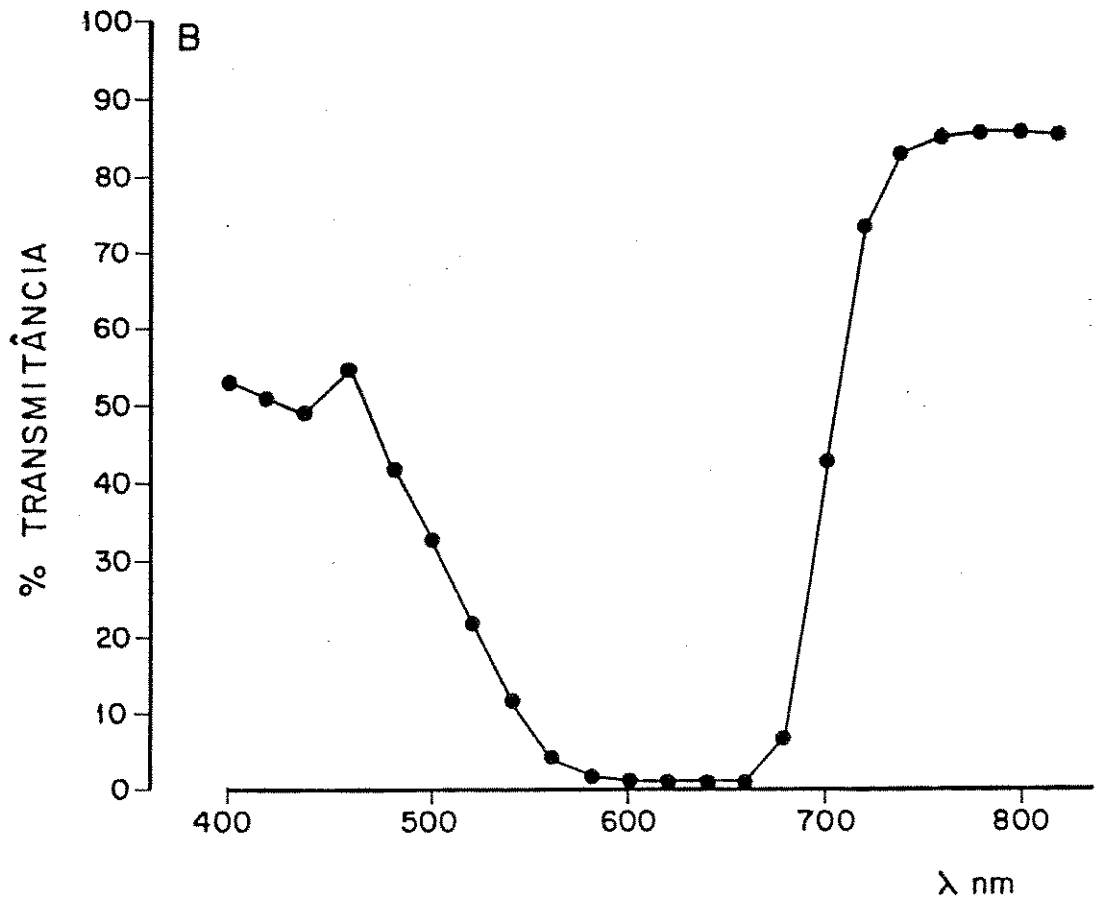
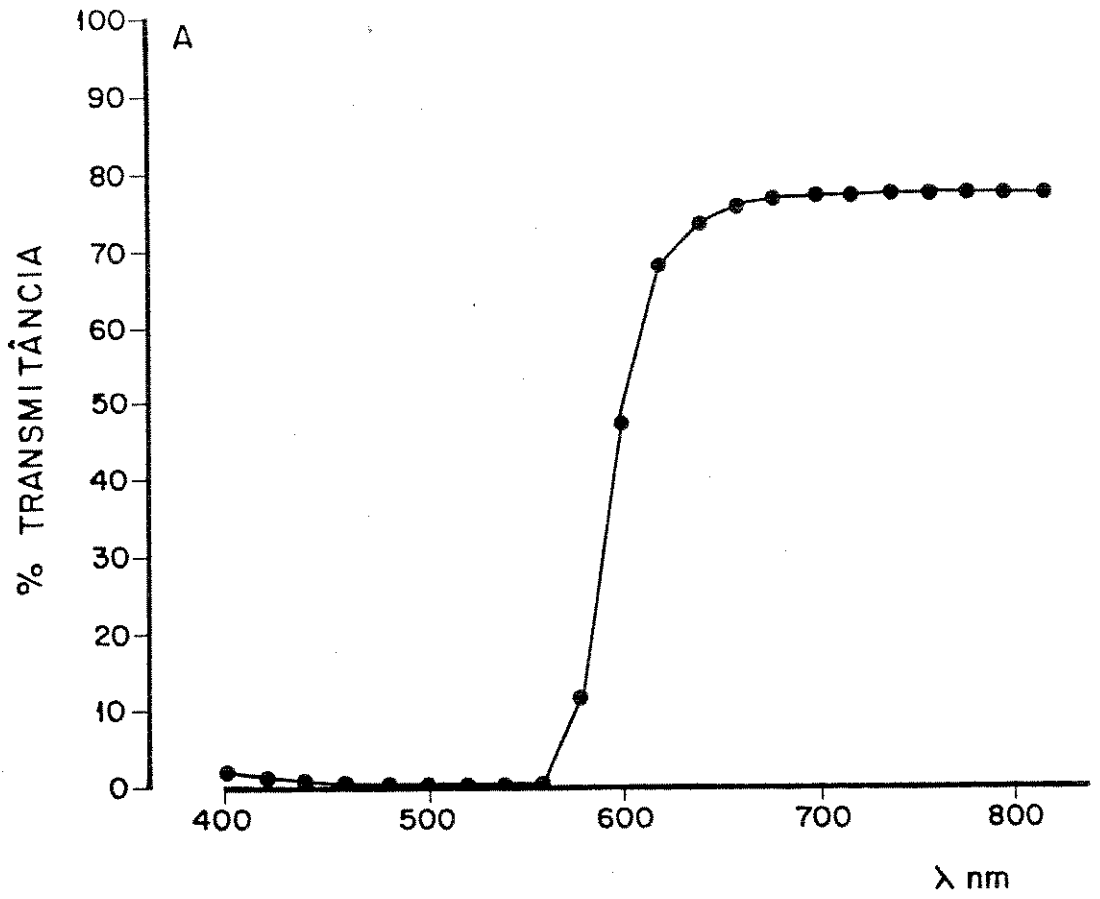


FIGURA 1 - Espectro de transmissão dos papéis celofane vermelho e azul na faixa compreendida entre 400 a 800 nm.  
 A - Papel vermelho  
 B - Papel azul

48h E-V-120h E;

48h E-V-24h E-V-96h E;

48h E-V-24h E-V-24h E-V-72h E;

48h E-V-24h E-V-24h E-V-24h E-48h E;

48h E-V-24h E-V-24h E-V-24h E-V-24h E-V-24h E.

E = escuro; V = tratamento de 1 minuto de luz vermelha.

A reversão do efeito da luz vermelha pelo vermelho extremo (descrito em e) foi verificada.

Os tratamentos luminosos foram realizados após o período de pré-indução. Tratamentos de vermelho extremo de 1 e 5 minutos de duração foram fornecidos imediatamente após o tratamento de luz vermelha (conforme b) de 1 minuto de duração.

Foi determinado o tempo de escape da reversão do efeito de luz vermelha pelo vermelho extremo, para tratamentos luminosos de curta duração, fornecidos após a pré-indução. Observou-se o efeito de vermelho extremo de 5 minutos de duração, fornecido após 0, 4, 6 e 8 horas de escuro intercaladas ao tratamento de luz vermelha, de 1 minuto de duração.

## 2.2 - Tratamentos Luminosos de Longa

### Duração

Amostras de esporos que permaneceram por 48 horas em embebição no escuro, receberam tratamentos luminosos de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 horas de duração, para a fonte luminosa a ou 1, 2, 4, 6 e 8 horas de duração para as fontes luminosas b e c. Nesses experimentos foram feitos três tipos de

controles:

- germinação em luz constante, utilizando-se fonte luminosa usada nos outros tratamentos de luz;
- germinação após tratamento luminoso de 1 minuto, utilizando-se a mesma fonte luminosa dos tratamentos longos;
- tratamento de escuro constante.

Foi verificado também o efeito de tratamentos luminosos de 24, 48 ou 120 horas, utilizando-se as fontes luminosas a, b e c. Os tratamentos foram realizados após o período de pré-indução e os experimentos tiveram como controle germinação em luz constante.

### 2.3 - Luz Azul

Foi verificado o efeito de tratamentos únicos ou múltiplos de luz azul (d) de 1 minuto de duração, fornecidos após o período de pré-indução. Verificou-se também o efeito de tratamentos de longa duração: 24, 48 e 120 horas. Os experimentos tiveram como controles:

- germinação sob luz fluorescente branca constante;
- tratamento de escuro constante;
- germinação sob luz azul constante.

Verificou-se também o efeito de luz azul fornecida após o tratamento de 8 horas de luz vermelha. A luz vermelha foi aplicada após o período de pré-indução. Também foi verificado o efeito da luz vermelha (b) fornecida após um tratamento de 48 horas de luz azul, conforme a seqüência a seguir:



48h E - 8h V - 112h A;

48h E - 48h A - 72h V.

A = luz azul; V = luz vermelha.

#### 2.4 - Espectro Fotoacústico de Esporos e Paredes de Esporos

O espectro de absorção óptica de esporos secos e paredes de esporos não embebidas foi feito utilizando-se do efeito fotoacústico (CESAR *et al.*, 1984).

Nesse trabalho, foram chamados esporos secos, os esporos não embebidos, mantidos armazenados a 4°C. Esporos secos intactos ou paredes de esporos foram colocados em um porta-amostras de 1 cm<sup>3</sup> de volume e este levado ao espectrômetro fotoacústico, cujo esquema de funcionamento é mostrado na figura 2. A luz monocromática incide sobre a amostra, sendo absorvida. Isto acarreta um aumento de temperatura que causa o aumento da pressão na câmara de ar adjacente ao porta-amostras. Esse aumento de pressão é registrado pelo microfone acoplado à câmara de ar. O sinal registrado pelo microfone é levado a um amplificador.

Quanto maior fosse a amplitude do sinal, maior seria a absorção e menor a transmissão da luz que incidiria sobre a amostra.

O sinal fotoacústico medido  $S(\lambda)$  é descrito pela equação:

$$S = A \frac{\beta(\lambda)}{(K \rho C)^{1/2}}$$

FIGURA 2

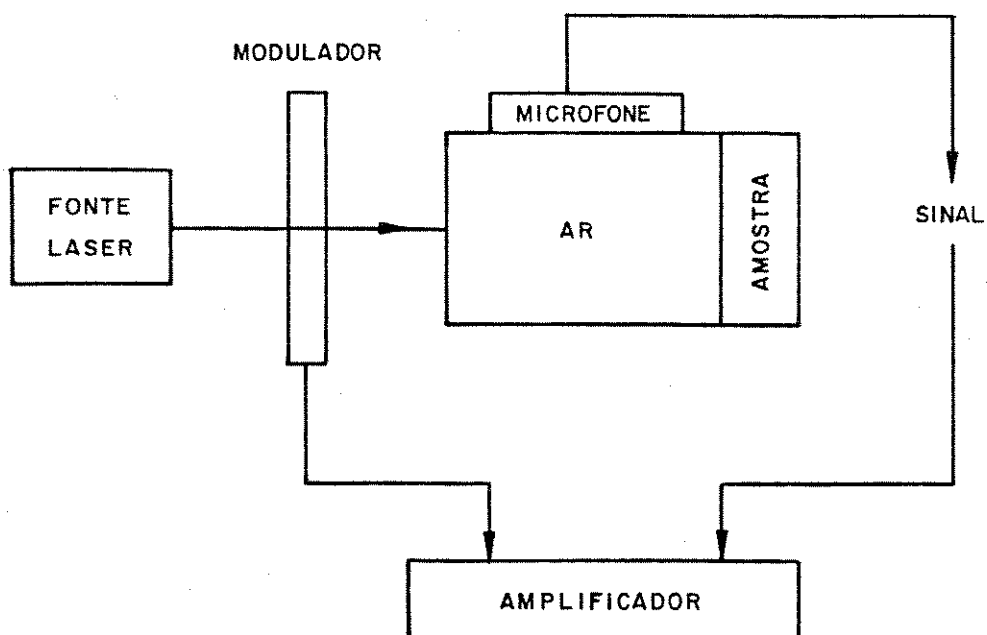


FIGURA 2 - Diagrama do espectrômetro fotoacústico.

onde  $\beta(\lambda)$  é o coeficiente de absorção óptica num dado comprimento de onda  $\lambda$ ,  $K$  é a condutividade térmica do material,  $\rho$  é sua densidade e  $C$  é o calor específico. Todos os outros fatores como as propriedades térmicas do gás e a frequência de modulação podem ser agrupadas numa constante  $A$  (ROSENCWAIG, 1980).

Nesse experimento, a frequência de modulação utilizada foi de 10 hertz e os comprimentos de onda compreenderam a faixa de 270 nm a 770 nm.

Para o preparo das paredes dos esporos, 200 mg de esporos foram macerados em éter de petróleo, em homogeneizador de vidro, para remoção de lipídios. O material foi centrifugado a 2.000 r.p.m. por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi novamente macerado com água destilada em homogeneizador de vidro. A seguir, o material foi filtrado a vácuo e lavado em água destilada até que a água de lavagem estivesse límpida. O resíduo foi seco em estufa a 50°C. Foi a seguir lavado com éter de petróleo, em soxhlets, a 40°C durante 8 horas e a seguir seco em estufa.

## 2.5 - Efeito da Temperatura na Pré-Indução

As temperaturas constantes testadas foram: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45°C. Os experimentos foram realizados em câmaras de crescimento Forma Scientific (5 a 30°C) e estufas FANEM (35 a 45°C).

O efeito das temperaturas constantes foi estudado para esporos a elas submetidos durante o período de pré-indução. A seguir receberam tratamento único ou diário de 1

minuto de luz vermelha (fonte de luz vermelha b). Retornaram ao escuro a 25<sup>0</sup>C após os tratamentos luminosos. No caso das amostras que receberam tratamentos luminosos diários, estes perfizeram um total de 5 tratamentos intercalados por períodos de 24 horas de escuro.

Foi observado também o efeito de temperaturas constantes durante o período de pós-indução. Amostras de esporos receberam tratamentos luminosos de 1 minuto de luz vermelha, únicos ou diários, a 25<sup>0</sup>C. Retornaram ao escuro, nas temperaturas de pré-indução.

Foi estudado também o efeito dos seguintes pares de temperaturas alternadas: 25-5<sup>0</sup>C, 25-10<sup>0</sup>C, 25-15<sup>0</sup>C, 25-20<sup>0</sup>C, 25-25<sup>0</sup>C (controle), 25-30<sup>0</sup>C, 25-35<sup>0</sup>C, 25-40<sup>0</sup>C e 25-45<sup>0</sup>C, em ciclos de 8-16h, sendo 8 horas a 25<sup>0</sup>C e 16 horas na alternante; ciclos de 12-12h, sendo 12 horas a 25<sup>0</sup>C e 12 na alternante e ciclos de 16-8 horas, sendo 16 horas a 25<sup>0</sup>C e 8 horas na alternante. O ciclo foi sempre iniciado com a temperatura de 25<sup>0</sup>C.

Os efeitos desses ciclos de temperaturas alternadas foram estudados para esporos que receberam os seguintes tratamentos:

- temperaturas alternadas durante a pré-indução, tratamento de luz vermelha de 1 minuto de duração e a seguir escuro a 25<sup>0</sup>C;
- temperaturas alternadas durante a pré-indução, tratamento de luz vermelha de 1 minuto de duração e a seguir escuro no sistema de temperaturas da pré-indução.

## 2.6 - Prē-embebição em Vapor de Água

Esporos secos foram embebidos em vapor de água durante uma semana, em condições normais de luz e temperatura. Foi utilizada câmara úmida feita em caixa de germinação "Gerbox" totalmente revestida de papel de filtro. Esporos em quantia suficiente para serem semeados posteriormente, foram colocados em placa de Petri de 4 cm de diâmetro. A placa foi colocada no centro da caixa de germinação e ao seu redor foi colocado algodão embebido em solução de Nystatin (100 unidades por ml). A caixa foi envolvida por filme transparente de PVC, marca Magipack.

Após embebição em vapor de água, os esporos se agregaram, formando massa compacta. Para separá-los, fez-se a filtragem através de folha simples de lenço de papel, com auxílio de pincel.

A curva de germinação para esporos embebidos em vapor de água foi realizada e comparada à de esporos secos. Foram feitas contagens de germinação diárias, durante 10 dias consecutivos. A germinação deu-se sob luz fluorescente branca constante (fonte a a 25°C).

Em uma série de experimentos, esporos embebidos em vapor de água, receberam tratamento de 1 min. de vermelho (fonte c), após 12, 24, 36, 48, 72 e 96 h. os r a. s de e m b e b i - ç ã o em solução nutritiva, no escuro, a 25°C. Esses experimentos tiveram como controles os mesmos tratamentos fornecidos a esporos secos.

Esporos embebidos em vapor de água receberam tratamentos diários de 1 minuto de luz vermelha (fonte c), com início após 24 ou 48 horas de embebição em solução nutriti

va, no escuro a 25°C. Os tratamentos luminosos foram intercalados por períodos de 24 horas de escuro. Os controles foram os mesmos tratamentos fornecidos a esporos secos.

Esporos embebidos em vapor de água durante uma semana receberam tratamentos de 8 horas de luz vermelha (fonte c) após 24 ou 48 horas de embebição em solução nutritiva, no escuro a 25°C. Os controles foram os mesmos tratamentos fornecidos a esporos secos.

### 3. PRÉ-EMBEBIÇÃO EM SOLUÇÃO OSMÔTICA DE POLIETILENOGLICOL

Esporos foram pré-embebidos em solução osmótica de polietilenoglicol (PEG) 6.000 durante 1, 2, 3 e 4 semanas. O tratamento osmótico foi realizado a 15°C, sob luz fluorescente branca constante. Foi utilizado polietilenoglicol na concentração de 288g por quilograma de água destilada, que a 15°C apresenta um potencial osmótico ( $\psi_s$ ) de -11,0 bars, de acordo com HEYDECKER & WAINWRIGHT, 1976). O potencial seria de -10,12 bars para MICHEL (1983).

Foram utilizados erlenmeyers de 125 ml contendo 25 ml de solução osmótica.

Após a embebição, esporos foram filtrados a vácuo, em papel de filtro e lavados em água destilada para remover resíduos de PEG. O papel de filtro com esporos, foi seco em estufa com circulação de ar, à temperatura ambiente por 10 minutos. Os esporos foram removidos do papel e semeados em erlenmeyers contendo solução nutritiva. Foram feitas curvas de germinação sob luz branca constante, a 25°C, para esporos pré-embebidos em solução de PEG por 1, 2, 3 e 4 sema-

nas. Os resultados foram comparados com a curva de esporos secos. As contagens de germinação foram feitas durante 7 dias consecutivos.

#### 4. EFEITO DE DCMU

Foi observado o efeito de 3,4-diclorofenildimetilureia (DCMU) na germinação de esporos sob luz fluorescente branca constante (fonte a), a 25°C. Foram testadas as concentrações de  $10^{-3}$ M,  $10^{-4}$ M e  $10^{-5}$ M de DCMU. 23,3mg de DCMU foram adicionados a 100 ml de solução nutritiva aquecida a 60°C para se obter a concentração de  $10^{-3}$ M. Esta foi diluída para  $10^{-4}$ M e  $10^{-5}$ M com solução nutritiva.

Foram utilizados erlenmeyers de 125 ml contendo 25 ml da solução nutritiva acrescida de DCMU.

#### 5. PESO FRESCO E PESO SECO DE ESPOROS SECOS E APÓS 7 E 14 DIAS DE EMBEBIÇÃO PARA A GERMINAÇÃO

Para a determinação do peso seco de esporos secos, foram utilizadas 6 amostras de 50 mg de esporos provenientes de 4 coletas diferentes. Os esporos foram colocados em placas de Petri de 3 cm de diâmetro, cujos pesos foram registrados em balança analítica Sartorius, com 5 casas decimais. Os pesos foram anotados e as placas numeradas. O material permaneceu durante 48 horas em estufa com circulação de ar, a 80°C. A seguir, as placas foram pesadas e os valores obtidos subtraídos do peso anterior. O material per

maneceu em dessecador até que o peso estabilizasse. Foram feitas 3 pesagens. A porcentagem de água presente nos esporos foi calculada pela fórmula:

$$\frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco} \times 100}{\text{Peso fresco}}$$

Para a determinação do peso fresco e peso seco de material com 7 e 14 dias de embebição para a germinação, 6 amostras de 50 mg de esporos foram semeadas em erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml da solução nutritiva acrescida de 100 unidades de Nystatin por mililitro. Os esporos germinaram sob luz fluorescente branca constante, a 25°C. O material foi recuperado em papel de filtro, depois de lavagens dos erlenmeyers com água destilada e filtragem a vácuo em funil de Büchner. Os papéis de filtro que revestiram o funil, foram pesados em balança analítica com 5 casas decimais, seus pesos anotados e os papéis numerados. Após a filtragem, o material secou em estufa com circulação de ar, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Foi feita a primeira pesagem, obtendo-se o peso fresco do material com 7 e 14 dias. Descontou-se do peso obtido, o peso inicial do papel, considerando-se que toda a água fora removida do papel após a secagem rápida. O material então secou em estufa com circulação de ar, a 80°C, por 24 a 48 horas. Foi pesado e colocado em dessecador até a estabilização dos pesos. Obteve-se o peso seco do material germinado subtraindo-se os valores de peso fresco, dos valores obtidos após a desidratação.



## 6. EXTRAÇÕES E DOSAGENS

Foram realizadas dosagens de lipídios, clorofila, proteínas totais, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e amido para esporos secos e após 7 e 14 dias de embebição para a germinação, sob luz fluorescente branca constante, a 25°C.

Foram usadas pelo menos 3 amostras de 100 mg de esporos para cada extração. Para a extração de material com 7 e 14 dias de embebição para germinação, 50 mg de esporos foram semeados em erlenmeyers de 250 ml, contendo 50 ml de solução nutritiva, acrescida de 100 unidades de Nystatin por ml. Após 7 ou 14 dias, o material foi recuperado em papel de filtro, através da filtração a vácuo em funil de Büchner. Os erlenmeyers foram lavados diversas vezes até a recuperação completa dos esporos. O material secou em estufa com circulação de ar, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Foi então removido do papel de filtro com pincel e espátula. Tomou-se o cuidado de se remover a maior quantidade possível de esporos, evitando-se alteração da quantidade semeada inicialmente. Foram agrupados esporos contidos em dois erlenmeyers, perfazendo-se um total de 100 mg (peso inicial).

Esporos foram macerados em homogeneizador de vidro ou em graal.

### 6.1 - Extração e Dosagem de Lipídios

Lipídios livres foram extraídos e dosados gravimetricamente, segundo GEMMICH (1977).

Amostras de 100 mg de esporos secos foram maceradas em homogeneizador de vidro de 7 ml de volume, utilizando-se como solvente 15 ml de hexano (MERCK). O extrato foi colocado em tubos de ensaio graduados e o volume completado para 15 ml, com hexano. Os tubos foram vedados com filme transparente de PVC e centrifugados por 10 minutos, a 2.000 r.p.m. O sobrenadante obtido foi colocado em balões de vidro de 25 ml, com bocal esmerilhado. O solvente foi evaporado a vácuo, a 60°C, em evaporador rotatório. Os balões utilizados foram previamente lavados de forma a eliminar qualquer resíduo, numerados e pesados em balança analítica Sartorius, com 5 casas decimais. Os pesos foram anotados. Após a evaporação do solvente, os balões foram colocados em dessecador sendo feitas pesagens até que os pesos estabilizassem. Subtraiu-se do peso dos balões contendo lipídios, o peso dos balões vazios.

Amostras de 100 mg de esporos (peso inicial), após 7 e 14 dias de embebição para a germinação, foram maceradas inicialmente a seco, em graal. Acrescentou-se pequena quantia de areia lavada, para facilitar o rompimento das paredes celulares. Os lipídios livres foram extraídos e dosados como descrito para esporos secos, apenas substituindo-se o homogeneizador de vidro pelo graal.

#### 6.1.1 - Espectro de Transmissão de Luz do Óleo de Esporos

Foram utilizadas 8 amostras de 500 mg de esporos secos para obtenção de volume suficiente que permitisse a leitura e construção do espectro de transmissão de luz. O

óleo foi extraído como já descrito. A leitura da transmissão de luz foi feita em espectrofômetro Varian, compreendendo uma faixa entre 400 a 800 nm. Variaram-se os comprimentos de onda, de 20 em 20 nm. Antes da leitura o óleo foi filtrado a vácuo.

Foi feito o espectro de transmissão de óleo de sementes de algodão, obtido por método semelhante. O espectro foi comparado ao do óleo de esporos. 500 sementes de algodão foram trituradas em liquidificador e extraídas em 500 ml de éter de petróleo, durante 3 dias, a 10°C. Após esse período, o material foi filtrado e o solvente contendo lipídios, guardado. O resíduo foi extraído em éter de petróleo, por refluxo, utilizando-se soxhlets e mantida aquecedora a 40°C, durante 8 horas. O extrato obtido foi acrescentado ao anterior e evaporado a vácuo, a 40°C, até o desaparecimento completo do solvente. O óleo obtido foi filtrado e foi feita a leitura em espectrofotômetro.

#### 6.1.2 - Análise dos Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa

O mesmo óleo de esporos obtido em 6.1.1 foi utilizado para a análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa. O óleo foi saponificado e esterificado segundo HARTMAN e LAGO (1973).

Quatrocentos miligramas (400 mg) de óleo foram pesados e colocados em balão de vidro de 125 ml, com bocal esmerilhado e base plana e acrescentaram-se 5 ml de solução metanólica de hidróxido de potássio (KOH) 0,5 N. Aqueceu-se a mistura até a ebulição, por refluxo, durante 5 minutos. A

solução de esterificação foi obtida acrescentando-se 3 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado a 2g de cloreto de amônia ( $NH_4Cl$ ) a 60 ml de metanol. Essa solução foi aquecida até a ebulição, por refluxo, durante 15 minutos. Quinze mililitros da solução de esterificação foram adicionados ao material saponificado. A solução final foi aquecida por refluxo, em manta aquecedora, durante 3 minutos. Após esse período foi colocada em funil de separação e lavada duas vezes com 5 ml de hexano, coletando-se a fase superior. Esta foi lavada 4 vezes com 150 ml de água destilada, filtrada em sulfato de sódio anidro, evaporada a vácuo e resus—pendida em 10 ml de hexano.

A separação dos ésteres metílicos foi feita em cromatógrafo a gás, modelo 37-D, Instrumentos Científicos C.G. Ltda. equipado com coluna de vidro de 150 cm x 2 mm, contendo dietilenoglicolsuccinato 14% (DEGS) em cromosorb W regular 60-80 MESH, a  $187^{\circ}C$ . Foram injetados  $0,8 \mu l$  de extra to para se obterem os cromatogramas.

Os ácidos graxos foram identificados comparando-se seus tempos de retenção, pelo obtido para o padrão ácido oleico. Calculou-se a área dos triângulos obtidos para cada pico e os valores foram transformados em porcentagem do total.

## 6.2 - Extração e Dosagem de Clorofila

A extração e dosagem de clorofila foi feita pelo método de ARNON (1949).

Três amostras de 50 mg de esporos secos foram mace—radas em graal com areia, utilizando-se 10 ml de éter die—

tílico como solvente, sob lâmpada de segurança verde, com irradiância máxima de  $0,0 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$  (NORONHA *et al.*, 1978). Os extratos obtidos foram colocados em tubos de ensaio revestidos com papel alumínio e vedados com filme transparente de PVC. A seguir, foram centrifugados durante 10 minutos a 2.000 r.p.m. O sobrenadante foi guardado e o precipitado foi extraído com 10 ml de acetona 80%. O material foi centrifugado novamente por 10 minutos a 2.000 r.p.m. Obtiveram-se assim duas frações: fração éter dietílico e fração acetona 80%. Foram feitos os espectros de absorção de luz na faixa compreendida entre 400 nm a 700 nm, variando-se os comprimentos de onda de 20 em 20 nm.

Para a extração e dosagem de clorofila de material com 7 e 14 dias de embebição, 6 amostras de 50 mg de esporos foram semeadas e procedeu-se como descrito em 6. Três amostras com 100 mg de esporos (peso inicial), após 7 dias de embebição foram maceradas em graal, com areia, sob lâmpada de segurança verde, utilizando-se 10 ml de acetona 80% como solvente. O material foi centrifugado e foram feitas mais duas extrações, perfazendo-se um volume final de 25 ml por amostra. Foram feitas leituras de absorbância a 645 e 663 nm (ARNON, 1949). Para material com 14 dias de embebição, procedeu-se como para os anteriores. Foram feitas 3 extrações, obtendo-se um volume total de 45 ml, que foi diluído para 60 ml, para se obter leitura de absorbância.

Os cálculos dos conteúdos de clorofila foram feitos pela equação:

$$C = (20,2 \times D_{645} + 8,02 \times D_{663}) \times \frac{\text{volume do extrato}}{1000 \text{ ml} \times \text{Peso te}} = \text{mg clorofila/g tecido}$$

### 6.3 - Extração e Dosagem de Proteínas Solúveis

As dosagens foram feitas pelo método de (BRADFORD 1976).

Três amostras de 100 mg de esporos (peso inicial) com 0, 7 ou 14 dias de embebição para a germinação foram mace-radas em graal com areia, utilizando-se 15 ml de éter die-tílico para remover lipídios. O material foi centrifugado durante 10 minutos a 2.000 r.p.m. O sobrenadante foi des-cartado e o precipitado extraído três vezes com 5 ml de hi-dróxido de sódio (NaOH) 0,1 N. Cada fração foi precipitada com igual volume de ácido tricloroacético (TCA) 10%, cen-trifugada durante 10 minutos a 2.000 r.p.m. O sobrenadante foi descartado. As proteínas precipitadas foram ressuspen-didas em NaOH 0,1 N em um volume final de 5 ml para extra-tos de esporos secos e 10 ml para extratos de material com 7 e 14 dias de embebição para a germinação.

Como reagente foi utilizado o Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma). Foram dissolvidos 100 mg em 50 ml de etanol 95%. A esta solução acrescentaram-se 100 ml de áci-do ortofosfórico 85%. Completou-se para volume final de 1 litro, com água destilada.

Dos extratos obtidos retiraram-se alíquotas de 0,1 ml, às quais foram adicionados 5 ml do reagente. Foram fei-tas três repetições para cada amostra. A absorbância foi lida a 595 nm, após 2 minutos. Os cálculos de proteína foram feitos a partir dos valores de absorbância obtidos na reta padrão. Nesta foram usadas concentrações de 20 a 100 µg de soroal-bumina bovina - BSA (Sigma), em um volume de 0,1 ml.

#### 6.4 - Extração e Dosagem de Açúcares Solúveis Totais, Açúcares Redutores e Amido

Foram utilizadas 3 amostras de 100 mg de esporos (pe<sub>so</sub> inicial) para as extrações.

A seqüência de extrações utilizada foi adaptada dos métodos de SHANNON (1968), BIELESKI e TURNER (1966) e McCREADY *et al.* (1950).

Amostras de 100 mg de esporos foram macerados inicialmente a seco, em graal, com areia. Os lipídios foram extraídos com 10 ml de éter dietílico. O material foi centrifugado durante 10 minutos a 2.000 r.p.m. e o sobrenadante descartado. O resíduo foi a seguir extraído duas vezes com 10 ml de MCW (Metanol: Clorofórmio; Água, na proporção de 12:5:3 v/v) segundo adaptação do método de SHANNON (1968). Obteve-se volume final de 20 ml para cada amostra. Após a centrifugação durante 10 minutos a 2.000 r.p.m., os sobrenadantes foram colocados em funil de separação. Os resíduos foram guardados para as outras extrações. Às frações MCW, foram adicionados em funil de separação, 7,5 ml de água destilada e 5,0 ml de clorofórmio. Os funis foram agitados e as fases separadas durante a noite (BIELESKI e TURNER, 1966). Obtiveram-se duas fases: a superior composta de metanol e água, contendo açúcares solúveis e a inferior, formada pelo clorofórmio, contendo lipídios e pigmentos. A fase superior, com volume de 20 ml, foi utilizada para a dosagem de açúcares solúveis totais e redutores. A inferior foi descartada.

Os resíduos guardados foram depois extraídos duas vezes com 10 ml de etanol 10%. Após cada extração, as amos-

tras foram centrifugadas durante 10 minutos a 2.000 r.p.m. e os resíduos guardados para a próxima extração. O extrato obtido continha polissacarídeos solúveis em água. Esse método foi adaptado de SHANNON (1968).

O amido foi extraído dos resíduos utilizando-se ácido perclórico a 30%, uma adaptação do método de McCREADY *et al.* (1950). Foram feitas duas extrações com 10 ml de ácido perclórico a 30% (PCA 30%).

#### 6.4.1 - Dosagem de Açúcares Solúveis Totais

Açúcares solúveis totais foram dosados das frações MCW e etanol 10%, utilizando-se o reagente de Antrona (McCREADY *et al.*, 1950). Foram dissolvidos 200 mg de antrona (Sigma) em 100 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 95%. Aliquotas de 1 ml dos extratos foram acrescidas de 2 ml do reagente de antrona. Os tubos de ensaio foram agitados e aquecidos até a ebulição, durante 5 minutos. Os cálculos de açúcares solúveis totais foram obtidos a partir dos resultados da reta padrão. Nesta foram usadas concentrações de 10 a 50  $\mu g$  de glicose por mililitro. A absorbância foi lida a 620 nm.

#### 6.4.2 - Dosagem de Açúcares Redutores

Açúcares redutores foram dosados das frações MCW e etanol 10%, utilizando-se o método de NELSON (1944).

Para o reagente A dissolveram-se 12,5g de  $Na_2CO_3$  anidro, 12,5g de sal de Rochelle, 10g de  $NaHCO_3$  e 100g de  $Na_2SO_4$  em 500 ml de água destilada. Para o reagente B dis-



solveram-se 15g de  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  em 100 ml de água destilada e adicionaram-se 1 ou 2 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. O reagente de arsenomolibdato foi preparado dissolvendo-se 25g de  $(\text{NH}_4)_6 \text{MO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em 450 ml de água destilada e adicionando-se 21 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. A seguir, foram dissolvidos 3g de  $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em 25 ml de água destilada e adicionados à solução anterior.

Misturaram-se 12,5 volumes do reagente A com 0,5 volumes do reagente B para se obter a solução de cobre alcalino.

Alíquotas de 1 ml das frações MCW e etanol 10% foram colocadas em tubos de ensaio e levadas a secar em estufa a  $50^\circ\text{C}$  até o desaparecimento total dos solventes e da água. A seguir, os resíduos foram eluídos em 1,0 ml de água destilada. Adicionou-se 1,0 ml da solução de cobre alcalino. Os tubos foram agitados e aquecidos até a ebulição durante 20 minutos. Os tubos foram esfriados e acrescentou-se 1 ml da solução de arsenomolibdato. Os tubos foram novamente agitados e acrescentados de 2 ml de água destilada. Foram mais uma vez agitados.

A leitura da absorbância foi feita a 520 nm. Os cálculos de açúcares redutores foram feitos a partir de valores obtidos para a reta padrão onde se utilizaram concentrações de 10 a 50  $\mu\text{g}$  de glicose por mililitro.

#### 6.4.3 - Dosagem de Amido

A dosagem de amido foi feita nas frações PCA 30%. O amido foi também dosado pelo reagente de antrona. Os cálculos foram feitos a partir da reta padrão de glicose cujas

concentrações usadas foram 25, 50, 75 e 100 µg por mililitro de ácido perclórico 30%. Todas as diluições necessárias foram feitas utilizando-se também ácido perclórico 30%. A leitura da absorbância foi feita a 620 nm. Os valores encontrados nas amostras foram multiplicados pelo fator 0,9 para a conversão a amido segundo McCREADY *et al.* (1950). Foram feitas três repetições por amostra.

## 7. CITOQUÍMICA

Esporos secos e após 4 e 7 dias de embebição para a germinação foram submetidos a dois processos de fixação:

- fixados em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,2M a pH7,4 e glutaraldeído a 5% durante 24 horas, a 5°C (KIERNAN, 1981). A solução de paraformaldeído foi preparada do seguinte modo: 20 g de paraformaldeído foram dissolvidos em 250 ml de água destilada a 65°C. A seguir, foram adicionadas algumas gotas de solução de hidróxido de sódio (NaOH), 1M até a solução ficar límpida. Após esfriar, foram acrescentados 25 ml de glutaraldeído. O volume foi completado para 500 ml, com tampão fosfato 0,2M a pH 7,4 (114,75 ml de solução 0,2M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 35,25 ml de solução 0,2M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>);

- fixados em etanol absoluto durante 48 horas a 5°C (LISON, 1953).

Materiais com 0,4 e 7 dias de embebição para a germinação, fixados em paraformaldeído foram desidratados em soluções de etanol de concentrações crescentes (70 a 100%) e diafanizados em xilol durante 30 minutos. Posteriormente

foram embebidos em óleo de cedro, para término da diafanização, por um mínimo de 14 dias (POLICARD *et al.*, 1957).

Procedeu-se da mesma maneira para o material fixado em etanol 95%.

Após esse procedimento, o material foi incluído em parafina e seccionado em micrótomo (R.Jung, Hildelberg) em cortes de 8  $\mu$ m de espessura.

Foi feita também a montagem de lâminas com material intacto. Neste caso, gametófitos jovens (obtidos após 7 dias de germinação) foram fixados em paraformaldeído, desidratados e diafanizados. Após esse procedimento foram espalhados diretamente sobre lâminas microscópicas.

#### 7.1 - Métodos Gerais e Citoquímicos para Determinações Qualitativas - hematoxilina eosina

A hematoxilina atua como corante básico e evidencia geralmente o conteúdo nuclear e radicais negativos em geral. A eosina é um corante ácido e se liga a radicais positivos presentes.

O material foi corado durante 6 minutos em hematoxilina, seguindo-se banho em água destilada por 12 minutos e eosina durante 10 minutos. A seguir foi feita uma rápida desidratação, diafanização em xilol e montagem em bálsamo do Canadá (nD = 1,54). A hematoxilina de Ehrlich foi preparada adicionando-se 0,06% de hematoxilina em volume de álcool 96%, 1 volume de glicerina, 1 volume de água destilada e 0,1 volume de ácido acético glacial. A solução de eosina foi preparada adicionando-se 0,5% de eosina em etanol

95% (MAIA, 1979).

- xylidine ponceau a pH 2,5 (XP)

Foi usada para a detecção de radicais  $\text{NH}_3^+$  totais.

Cortes de material fixado e gametófitos intactos foram corados durante 15 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se a lavagem em ácido acético a 2% durante 30 minutos, desidratação, diafanização e posterior montagem em bálsamo de Canadá (VIDAL, 1970). A solução de xylidine ponceau a pH 2,5 foi obtida dissolvendo-se xylidine ponceau em ácido acético a 2%, a uma concentração final de 0,1%.

- azul de toluidina a pH 4,0 (AT)

O azul de toluidina foi usado para a detecção de grupos aniônicos e de metacromasia (aumento do empilhamento das moléculas do corante).

Cortes de material fixado e gametófitos intactos foram corados com azul de toluidina durante 15 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se banho rápido em água destilada, secagem ao ar, diafanização em xilol durante 10 minutos e montagem em bálsamo do Canadá. A solução de azul de toluidina foi preparada, dissolvendo-se azul de toluidina em tampão Mc Ilvaine a pH 4,0 (61,5 ml de ácido cítrico 0,1M e 38,5 ml de  $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$  a 0,2M), a uma concentração de 0,025%.

7.2 - Digestões Enzimáticas para a Extração de Proteínas

Esporos secos ou após 7 dias de embebição para a

germinação foram fixados em etanol absoluto e a seguir submetidos aos seguintes tratamentos enzimáticos:

- Digestão com pepsina

O material foi incubado em solução de pepsina (2 mg.ml<sup>-1</sup> em solução de HCl com pH ajustado para 1,6) por 6 horas a 37°C. Após esse período, o material foi lavado em água, corado com xylidine ponceau a pH 2,5 e montado em bálamo do Canadá. Como controle, o material foi incubado apenas em solução de HCl com pH ajustado para 1,6 (PEARSE, 1961).

- Digestão com tripsina

O material foi incubado durante 2 horas a 37°C em solução de tripsina (0,2 mg.ml<sup>-1</sup> de tripsina, em tampão fosfato 0,05M a pH 8,9), corado com xylidine ponceau e montado em bálamo do Canadá. Como controle foi feita a incubação do material apenas na solução tampão, que é obtida tomando-se um volume de solução de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05M e adicionando-se solução de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05M até a obtenção de pH 8,9 (PEARSE, 1961).

## 8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos experimentos de germinação, os valores obtidos em porcentagem foram transformados em valores angulares (arco seno  $\sqrt{\%}$ ). Os resultados foram apresentados em tabelas ou figuras e as análises estatísticas foram realizadas após a transformação dos dados (SNEDECOR, 1962).

Nos experimentos de germinação, sempre que foi preciso comparar dois ou mais tratamentos, foi feita a análise

se de variância. Nos experimentos de tratamentos luminosos de curta duração, estes foram comparados somente ao controle de escuro. Nos casos em que houve diferença significativa entre os tratamentos, foi calculada a  $DMS_{5\%}$  pelo teste de Tukey, como apresentado por SNEDECOR (1962).

Nos experimentos de dosagens bioquímicas, os resultados foram obtidos a partir de retas padrões de concentrações conhecidas de substâncias a serem dosadas, cujos coeficientes de correlação  $r$  e regressão linear  $b$ , foram calculados. Foram feitos os cálculos dos intervalos de confiança para os valores de dosagens bioquímicas, sendo que letras minúsculas diferentes mostram que os valores são diferentes.

Os testes e análises estatísticas foram realizados obedecendo-se a SNEDECOR (1962) e as tabelas utilizadas foram as de FISHER e YATES (1971).

## - R E S U L T A D O S -

### 1. PADRONIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM PARA A CONTAGEM DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS

Um teste preliminar (Tabela 1) foi realizado para se padronizar a amostragem a ser utilizada nos experimentos de germinação. Foram comparados três métodos de contagem de esporos. No método 1 foram usados 3 erlenmeyers por tratamento sendo contadas 4 lâminas por erlenmeyer e 5 campos por lâmina. No método 2, usaram-se 3 erlenmeyers e foram contadas 4 lâminas por erlenmeyer e 50 esporos por lâmina. No método 3 utilizaram-se 2 erlenmeyers, sendo contadas 3 lâminas por erlenmeyer e 100 esporos por lâmina. O método 3 foi o que apresentou o menor valor de coeficiente de variação e foi selecionado para ser utilizado no decorrer deste trabalho.

### 2. FOTOMORFOGÊNESE

- Germinação sob luz branca

A produção de esporos ocorreu durante o ano inteiro. Para a maioria das coletas (Figura 3, A-H) a germinação teve início entre os terceiro e quarto dias de embebição. Foi

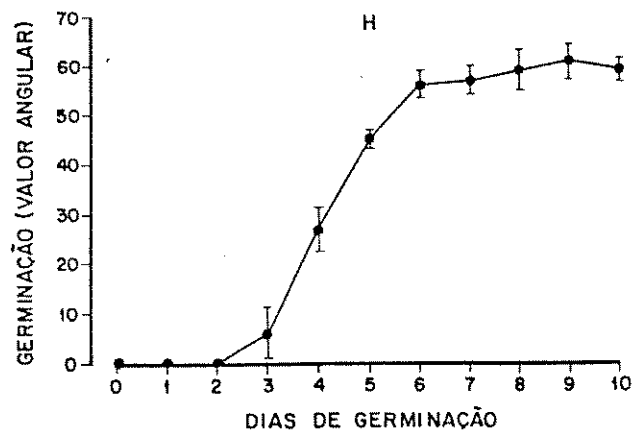
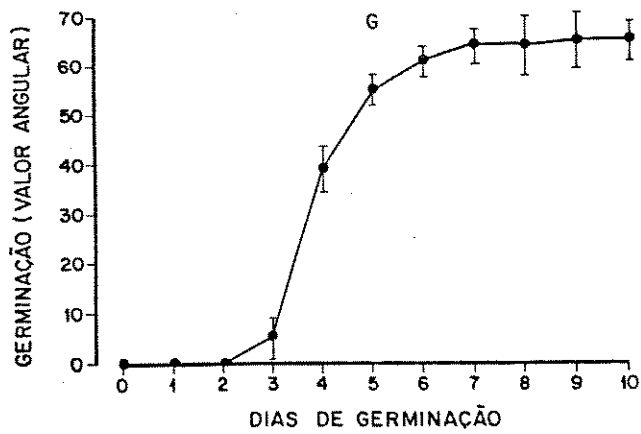
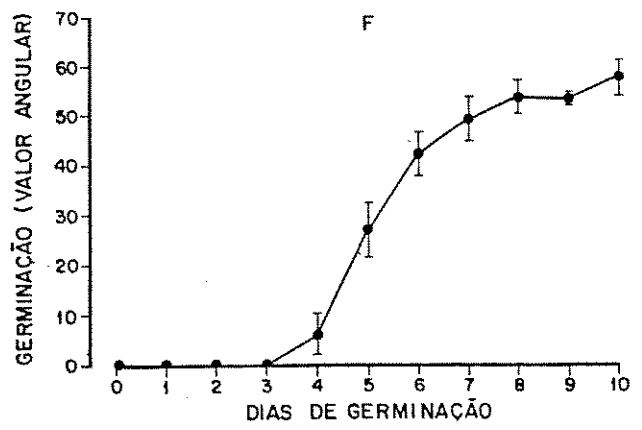
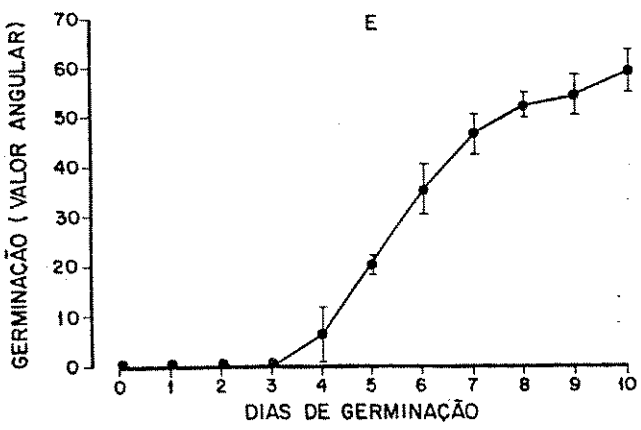
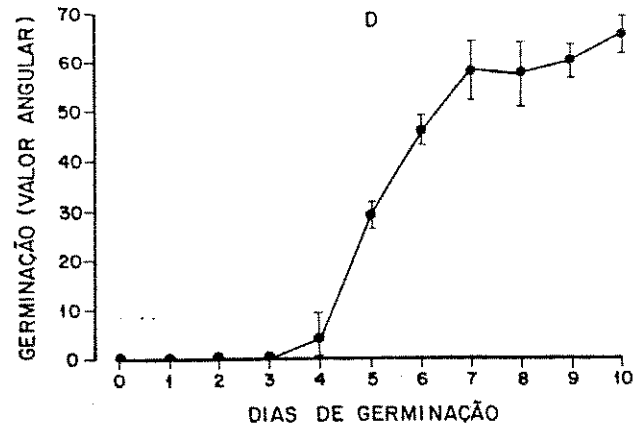
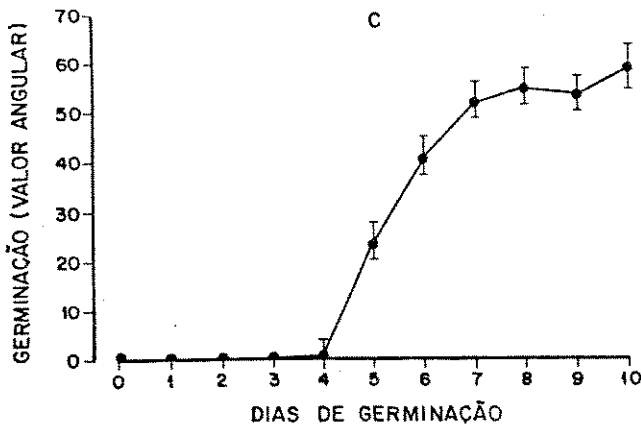
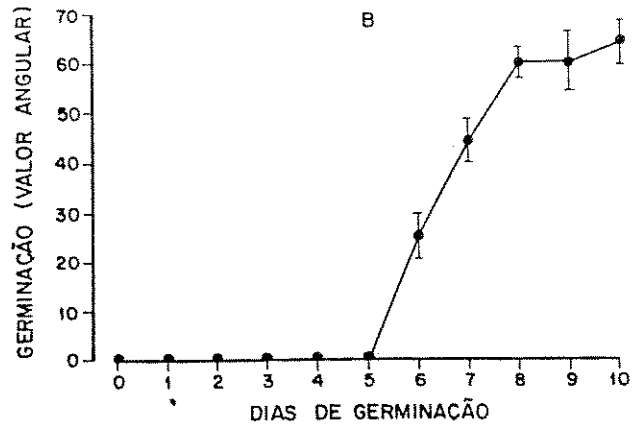
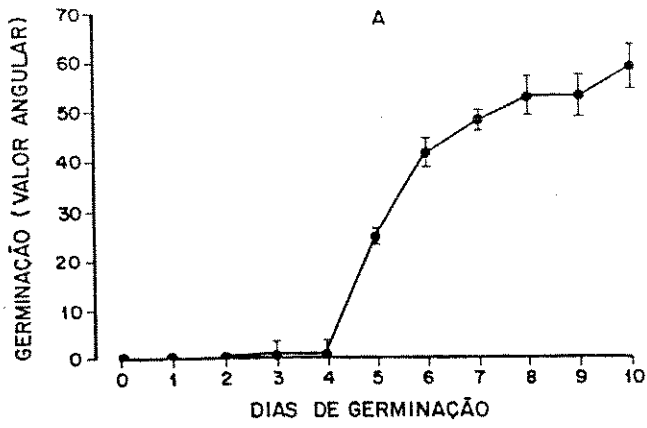
TABELA 1 - Padronização de amostragem para contagem de esporos durante a germinação de *Cyathea delgadii*. Foram utilizados 3 métodos: método 1 - foram observadas três lâminas por erlenmeyer, sendo contados cinco campos por lâmina; foram usados 3 erlenmeyers por tratamento; método 2 - foram observadas quatro lâminas por erlenmeyer, sendo contados 50 esporos por lâmina; foram usados 3 erlenmeyers por tratamento; método 3 - foram observadas 3 lâminas por erlenmeyer, sendo contados 100 esporos por lâmina; foram usados 2 erlenmeyers por tratamento.

M é t o d o	Germinação (valor angular) no 7º dia			C.V. %
	$\bar{X}$	$\pm$	i.c.	
1	49,54	$\pm$ 2,44		16,41
2	47,86	$\pm$ 4,24		13,95
3	49,61	$\pm$ 2,51		4,85

c.v. - coeficiente de variação  
i.c. - intervalo de confiança



FIGURA 3 - Curva de germinação sob luz branca contínua, a 25<sup>0</sup>C para esporos de *Cyathea delgadii* recém coletados. Os esporos foram coletados em diferentes meses de um mesmo ano:  
A: janeiro; B: fevereiro; C: março; D: abril; E: junho;  
F: agosto; G: setembro; H: novembro.  
As figuras mostram médias  $\pm$  intervalos de confiança.



retardada para o sexto dia na coleta realizada em fevereiro (B). No sétimo dia de embebição, a germinação atingiu valores angulares entre 50 a 70. Geralmente, a partir do sétimo dia, começou a haver estabilização da curva de germinação. Para o sétimo dia de embebição, dia estabelecido para a contagem de germinação dos experimentos neste trabalho, os limites de confiança variaram entre 1,92 a 6,11 (Figura 3). Os coeficientes de variação estão entre 3,77 e 9,92% para o sétimo dia.

#### - Determinação do Período de Pré-Indução

Para a determinação do período de pré-indução foi realizado um experimento preliminar (Tabela 2). Constatou-se que tratamento de luz vermelha de 1 minuto de duração, aplicado a esporos que permaneceram durante 48 horas em embebição no escuro, promovia baixa germinação, entre 5 a 7%, ou 13,47 e 15,18 em valor angular.

Na Tabela 3, observa-se que são necessárias pelo menos 24 horas de embebição no escuro para que os esporos se tornem sensíveis ao tratamento de 1 minuto de luz vermelha. No experimento 2, os valores não foram estatisticamente diferentes do controle de escuro ( $F_{5\%}$  não foi significativo). Os efeitos do tratamento luminoso foram maiores quando estes foram aplicados após 36 e 48 horas de embebição no escuro. Para *Cyathea delgadii*, o período de pré-indução parece ser de no mínimo 24 horas. Entretanto, neste trabalho, a maior parte dos tratamentos luminosos foi aplicada após 48 horas de embebição no escuro

TABELA 2 - Efeito de tratamentos luminosos de curta duração, na germinação de esporos de *Cyathea delgada*, após um período de 48 horas de embebição no escuro.

Após os tratamentos, os esporos retornaram ao escuro, a 25°C. Não foram considerados os controles em luz contínua para cálculo de F.

LC - Luz branca constante;

EC - Escuro constante;

LV - Luz vermelha, fonte b.

T r a t a m e n t o	Germinação valor angular	
	Experimentos	
	1	2
C o l e t a	junho	junho
armazenamento (dias)	107	112
Controle LC	53,35	57,41
Controle EC	0,0 a	0,0 a
V 1 minuto	15,18c	13,47b
V 5 minutos	7,54b	-
V 10 minutos	7,65b	-
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	4,63	2,96

TABELA 3 - Determinação do período de pré-indução para esporos de *Cyathea delgadii*. Variou-se o período de embebição no escuro antes do tratamento de luz vermelha de 1 minuto de duração. Após o tratamento luminoso os esporos retornaram ao escuro a 25°C. Não foram considerados os controles em luz contínua para cálculo de F.  
 LC - Luz branca constante;  
 EC - Escuro constante;  
 LV - Luz vermelha, fonte b.

T r a t a m e n t o	Germinação valor angular				
	E x p e r i m e n t o s				
	1	2	3	4	5
C o l e t a	junho	janeiro	janeiro	março	abril
armazenamento (dias)	273	77	64	57	43
Controle LC	49,57	46,72	52,37	53,01	59,47
Controle EC	0,0	1,91	0,0 a	0,95a	0,0a
1hE - V 1 min.	0,0	-	-	-	-
3hE - V 1 min.	0,0	-	-	-	-
6hE - V 1 min.	0,0	-	-	-	-
12hE - V 1 min.	0,0	-	-	-	-
18hE - V 1 min.	-	1,91	-	-	-
20hE - V 1 min.	-	3,82	-	-	-
22hE - V 1 min.	-	0,95	-	-	-
24hE - V 1 min.	-	5,32	4,67ab	6,14b	8,91b
36hE - V 1 min.	-	-	9,09 b	13,04c	16,31c
48hE - V 1 min.	-	-	8,95 b	16,28c	15,95c
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	-	-	5,74	4,19	3,76

e a esse período chamou-se de "*período de pré-indução*".

Na Tabela 4 são apresentados os valores angulares de germinação para esporos mantidos sob luz fluorescente branca constante e para esporos que receberam tratamentos luminosos de 1 minuto de luz vermelha, após o período de pré-indução. São mostrados também o mês em que os esporos foram coletados e o tempo de armazenamento em dias, a 4°C. Observa-se que há variação da germinação sob luz constante, entre as coletas. Os valores de germinação da coleta de junho de 1985 foram menores que os de outras coletas, com tempo de armazenamento semelhante. A germinação foi semelhante de 81 a 167 dias, para a coleta de março de 1985. A coleta de junho de 1984 mostra nitidamente que a germinação diminuiu após 275 dias de armazenamento. Os dados da coleta de abril de 1985 sugerem que a germinação comece a diminuir ao redor de 176 dias de armazenamento (para essa coleta).

Quanto aos resultados encontrados para o tratamento luminoso de 1 minuto de duração, realizado após a pré-indução, observa-se que os esporos sempre responderam a este tratamento. Os mais altos valores de germinação foram encontrados para a coleta de março de 1985, com 54 e 81 dias de armazenamento e para a coleta de junho de 1984, com 107 dias de armazenamento. Os menores valores de germinação foram encontrados para a coleta de junho de 1985 após 84 e 87 dias de armazenamento. Após 275 dias de armazenamento, houve uma diminuição da resposta de germinação, pelos dados da coleta de junho de 1984 (para essa coleta).

O efeito de tratamentos múltiplos de luz vermelha, de 1 minuto de duração, com início após o período de pré-indução, é mostrado na figura 4. Foi analisado o efeito de

TABELA 4 - Germinação sob luz branca constante e após tratamento de 1 minuto de luz vermelha (fonte b) realizado depois do período de pré-indução, para esporos de *Cyathea delgadii*.  
fonte b.

Coleta mês	armazenamento (dias)	germinação - valor angular	
		LC	48hE - V 1 min.
janeiro/1985	64	52,37a	8,95a
março/1985	54	53,01b	16,28c
"	76	53,07b	9,63a
"	81	50,58a	14,01c
"	95	51,88a	12,08a
"	105	49,62a	12,35a
"	131	51,36a	12,46a
"	132	48,33a	10,13a
"	141	49,81a	11,24a
"	145	47,87a	10,41a
"	159	49,18a	10,6 a
"	161	46,15a	10,6 a
"	167	46,62a	10,6 a
abril/1985	170	53,04b	10,29a
"	171	53,38b	9,22a
"	176	48,76a	12,38a
"	177	50,47a	13,03a
"	186	48,73a	10,23a
junho/1985	77	41,06c	9,40a
"	79	41,43c	8,6 a
"	84	42,30c	6,59b
"	87	43,62c	6,84b
junho/1984	107	53,35b	15,81c
"	112	57,41b	13,47a
"	275	47,95a	8,51a
$\bar{X} \pm$ i.c.		49,25 $\pm$ 3,65	10,95 $\pm$ 2,82

1, 2, 3, 4 e 5 tratamentos de 1 minuto de luz vermelha. Esses tiveram início após o período de pré-indução. Foram intercalados por períodos de 24 horas de escuro. O efeito do tratamento único de 1 minuto de luz vermelha foi significativamente menor do que o efeito de 2, 3, 4 e 5 minutos de tratamento luminoso. Os efeitos de 2 e 3 minutos de luz vermelha foram estatisticamente iguais. Entretanto, foram diferentes dos efeitos de 4 e 5 minutos de luz vermelha, que foram iguais entre si.

A figura 5 mostra que houve uma correlação positiva ( $r = 0,93$ ) entre os valores angulares de germinação e o número de tratamentos luminosos de curta duração.

#### - Reversão Vermelho-Vermelho Extremo

A reversão do efeito do tratamento de luz vermelha, de curta duração, pelo vermelho extremo é mostrada na Tabela 5. Tratamento de 1 minuto de vermelho extremo realizado imediatamente após o tratamento de 1 minuto de luz vermelha, causou reversão parcial do efeito da luz vermelha (Experimento 1). Os tratamentos luminosos foram realizados após o período de pré-indução. O experimento 2, mostra que tratamento de 5 minutos de vermelho extremo realizado imediatamente após o tratamento de 1 minuto de luz vermelha, reverte seu efeito, totalmente.

A figura 6 mostra o efeito de tratamentos de vermelho extremo, de 5 minutos de duração, fornecidos após 0, 4, 6 e 8 horas de escuro, intercaladas entre o tratamento de luz vermelha e de VE. Esses tratamentos foram realizados após o período de pré-indução. Observa-se



FIGURA 4

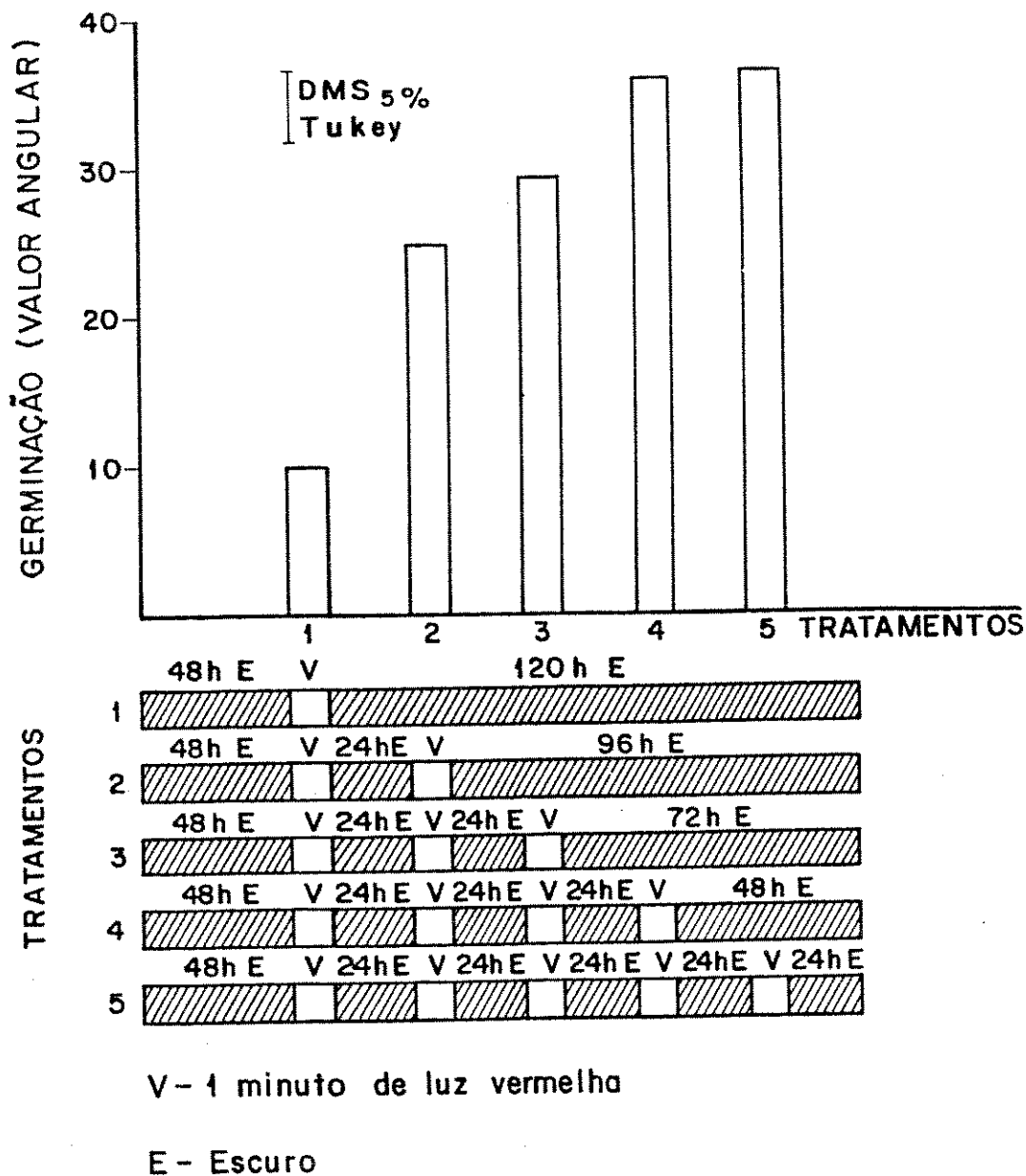
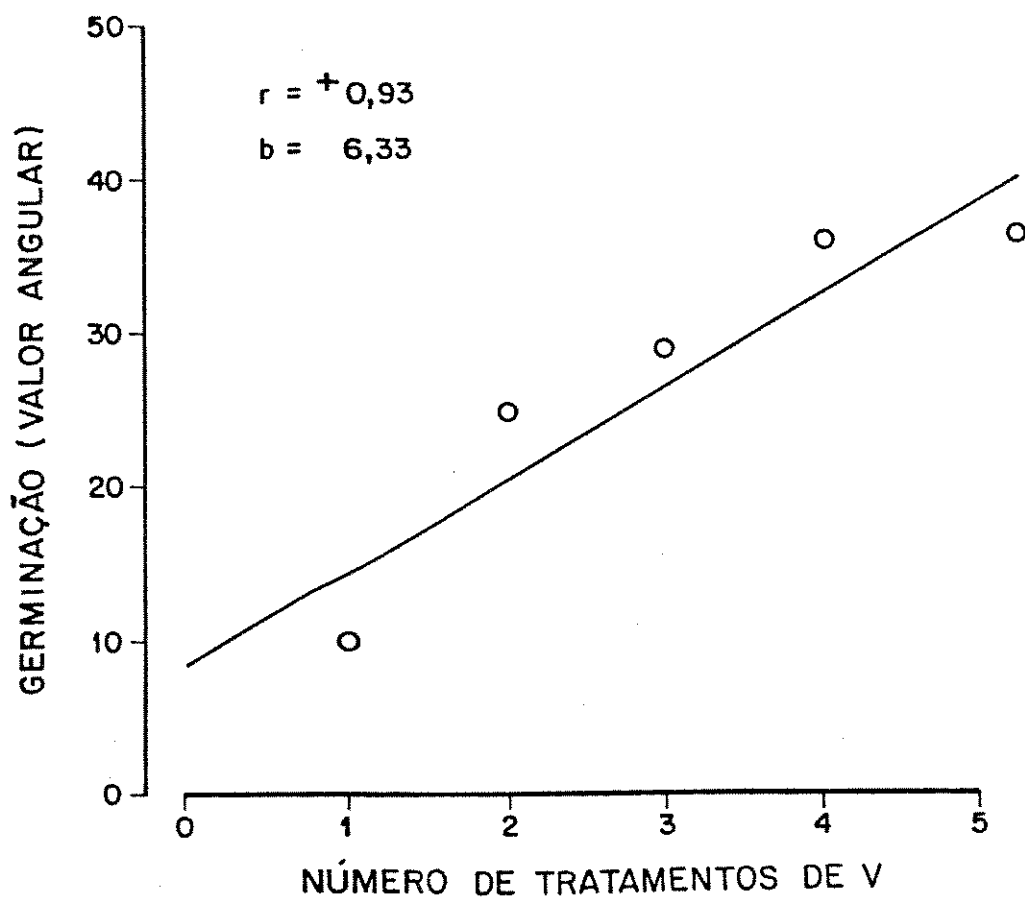


FIGURA 4 - Efeito de tratamentos múltiplos de luz vermelha, de 1 minuto de duração, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*. Os tratamentos tiveram início após o período de pré-indução (48 horas de embebição no escuro) e foram intercalados por períodos de 24 horas de escuro. O experimento foi realizado a 25°C. Fonte b.

FIGURA 5



V - 1 minuto de luz vermelha

FIGURA 5 - Correlação entre tratamentos múltiplos de luz vermelha e a germinação de esporos de *Cyathea delgadii*.  
Dados referentes ao experimento mostrado na figura 4.

que quando vermelho extremo foi fornecido imediatamente após o tratamento de luz vermelha, ocorreu reversão, pois houve uma resposta muito baixa de germinação, estatisticamente menor do que o controle V (1 minuto de luz vermelha). Após 4h de escuro entre os tratamentos de luz houve pequena promoção de germinação, em relação ao escuro, menor do que a do controle V. A resposta de germinação foi crescente, quanto maior o período de escuro entre os tratamentos luminosos. Quando foram intercaladas 8 horas de escuro entre os tratamentos luminosos, não ocorreu reversão do efeito da luz vermelha pelo vermelho extremo, assim como não ocorreu com 6 horas.

A figura 7 mostra que há uma correlação positiva e direta ( $r = 0,96$ ) entre a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* e o número crescente de horas de escuro intercalados entre os tratamentos de luz vermelha e vermelho extremo.

#### - Tratamentos Luminosos de Longa Duração

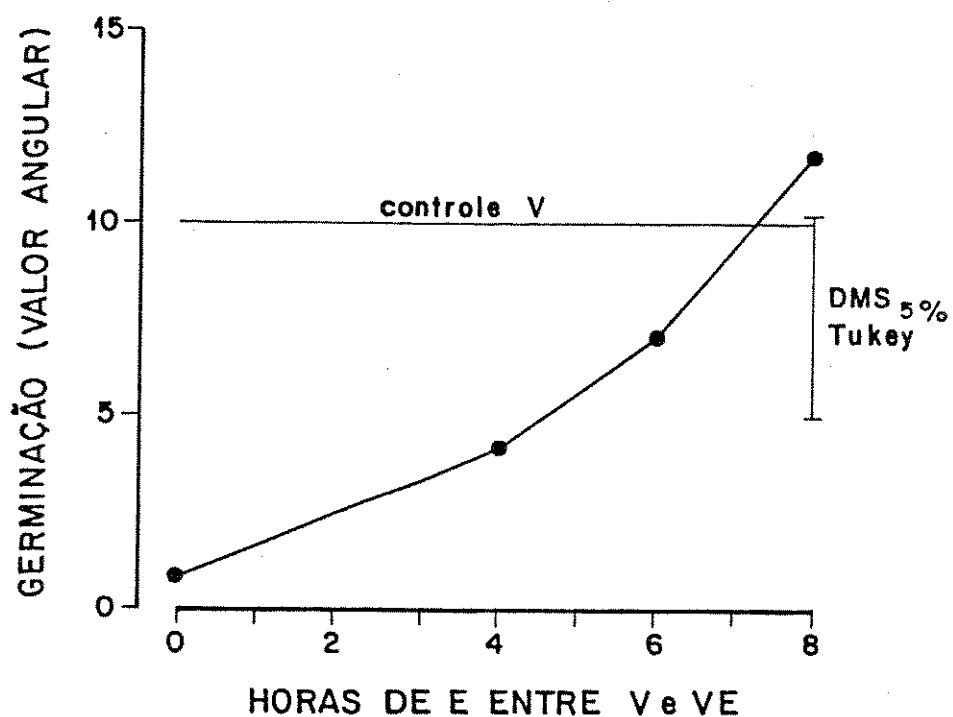
Os experimentos dessa série tiveram por objetivo verificar quais os tratamentos luminosos capazes de causar a maior resposta de germinação, para esporos pré-induzidos por 48 horas no escuro a 25°C. Verificou-se o efeito de três fontes luminosas: lâmpada fluorescente branca; lâmpada fluorescente vermelha e lâmpada fluorescente gro-lux associada a filtro de papel celofane vermelho.

Nesses experimentos foram feitos três controles: - luz constante, onde se usou a fonte luminosa dos tratamentos de longa duração; tratamento luminoso de 1 minuto de duração, com a mesma fonte luminosa dos anteriores e escuro

TABELA 5 - Reversão do efeito da luz vermelha de 1 minuto de duração, pelo vermelho extremo, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*. Os experimentos foram realizados a 25<sup>o</sup>C. Não foram considerados os controles em luz contínua para cálculo de F.  
 LC - Luz branca constante;  
 EC - Escuro constante;  
 V - Luz vermelha, fonte b;  
 VE - Vermelho extremo, fonte e.

Tratamento	Germinação valor angular	
	Experimentos	
	1	2
Coleta armazenamento (dias)	março 79	março 98
Controle LC	53,07	51,88
Controle EC	0,0 a	0,95a
48hE - V 1 min.	9,63c	12,08b
48hE - V 1 min.-VE 1 min.	5,58b	-
48hE - V 1 min.-VE 5 min.	-	0,0 a
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	3,55	6,66

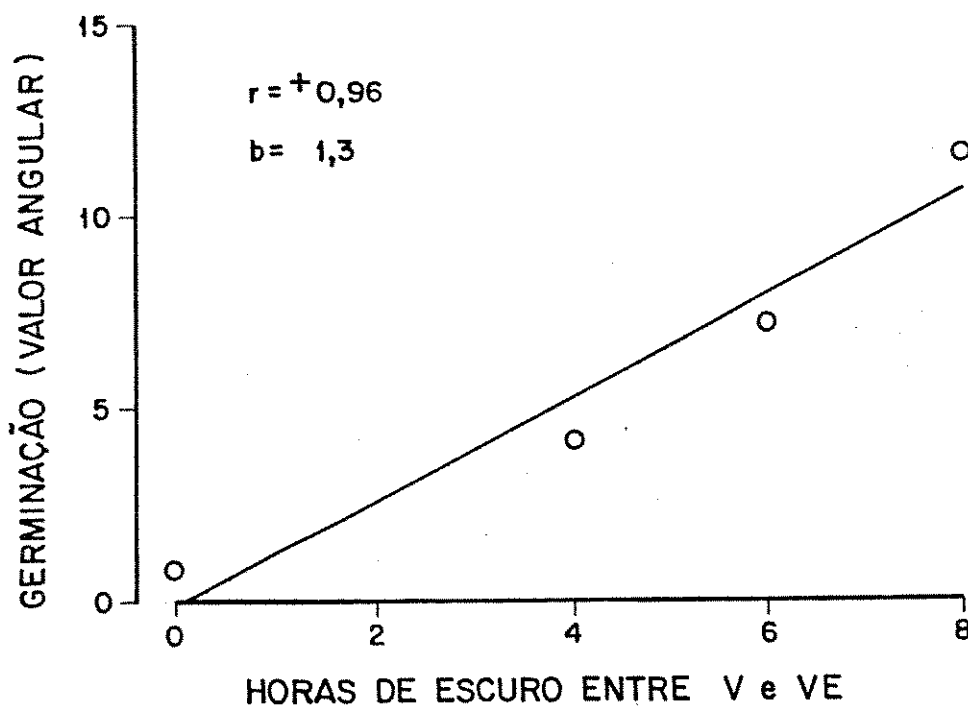
FIGURA 6



E - escuro  
V - 1 minuto de luz vermelha  
VE - 5 minutos de vermelho extremo

FIGURA 6 - Determinação do tempo de escape da reversão do efeito da luz vermelha pelo vermelho extremo, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*. Tratamento de 1 minuto de luz vermelha foi realizado após o período de pré-indução. Tratamentos de 5 minutos de vermelho extremo foram fornecidos após 0, 4, 6 e 8 horas de escuro intercalados aos tratamentos de luz. Os experimentos foram realizados a 25°C.  
Fonte b;  
Fonte e.

FIGURA 7



V - 1 minuto de luz vermelha

VE - 5 minutos de vermelho extremo

FIGURA 7 - Correlação entre horas de escuro intercaladas entre tratamentos de luz vermelha e vermelho extremo e a germinação de esporos de *Cyathea delgadii*.

Esses tratamentos foram realizados após a pré-indução. Os experimentos foram feitos a 25°C.

Fonte b;

Fonte e.

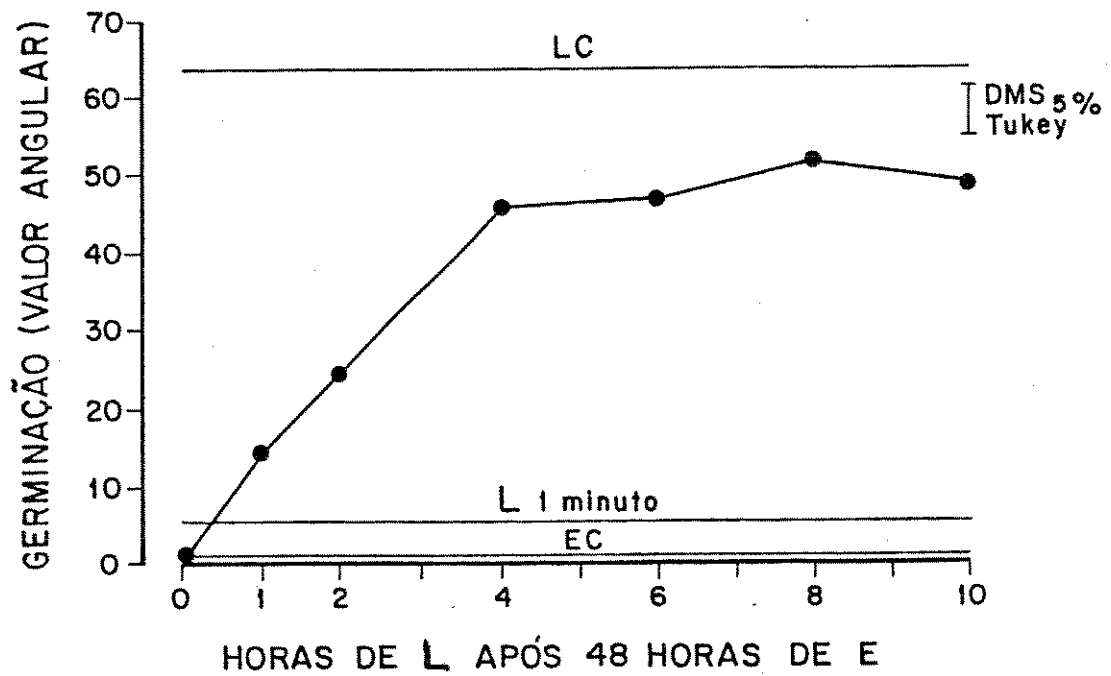
ro constante.

A figura 8 mostra os resultados de um experimento onde os esporos receberam tratamentos de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 horas de luz fluorescente branca, após o período de pré-indução. A seguir, retornaram ao escuro. A germinação atingiu a estabilidade depois dos esporos receberem 4 horas de luz. Entretanto, esses valores de germinação são menores do que os do controle em luz contínua.

Na figura 9 estão representados os resultados de tratamentos luminosos de longa duração, cuja fonte luminosa foi lâmpada fluorescente vermelha. Os esporos receberam tratamentos luminosos de 1, 2, 4, 6 e 8 horas. Esses foram realizados após o período de pré-indução. O tratamento de 10 horas foi suprimido, visto que a figura 8 mostra que o tratamento de 4 horas mostrou efeito semelhante aos de 6, 8 e 10 horas. Foram mantidos os de 6 e 8 horas, pois a mudança de fonte luminosa poderia alterar as respostas biológicas. Nota-se que os valores de germinação atingem uma estabilidade após tratamento luminoso de 4 horas. Os valores são menores do que os de luz vermelha constante.

O efeito de tratamentos luminosos de longa duração, utilizando-se como fonte luminosa a lâmpada fluorescente gro-lux associada a filtro de papel celofane vermelho é mostrado na figura 10. Os tratamentos luminosos também foram de 1, 2, 4, 6 e 8 horas. Observa-se um aumento gradual da resposta de germinação. Somente os tratamentos de 1 minuto, 1 hora e 2 horas promoveram respostas semelhantes. Os demais induziram respostas crescentes de germinação, embora estas respostas tenham sido menores do que a do controle em luz vermelha contínua.

FIGURA 8



LC - luz branca constante  
L - luz branca  
EC - escuro constante  
E - escuro

FIGURA 8 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, a 25°C. Os tratamentos foram realizados após a pré-indução. Fonte a.



FIGURA 9

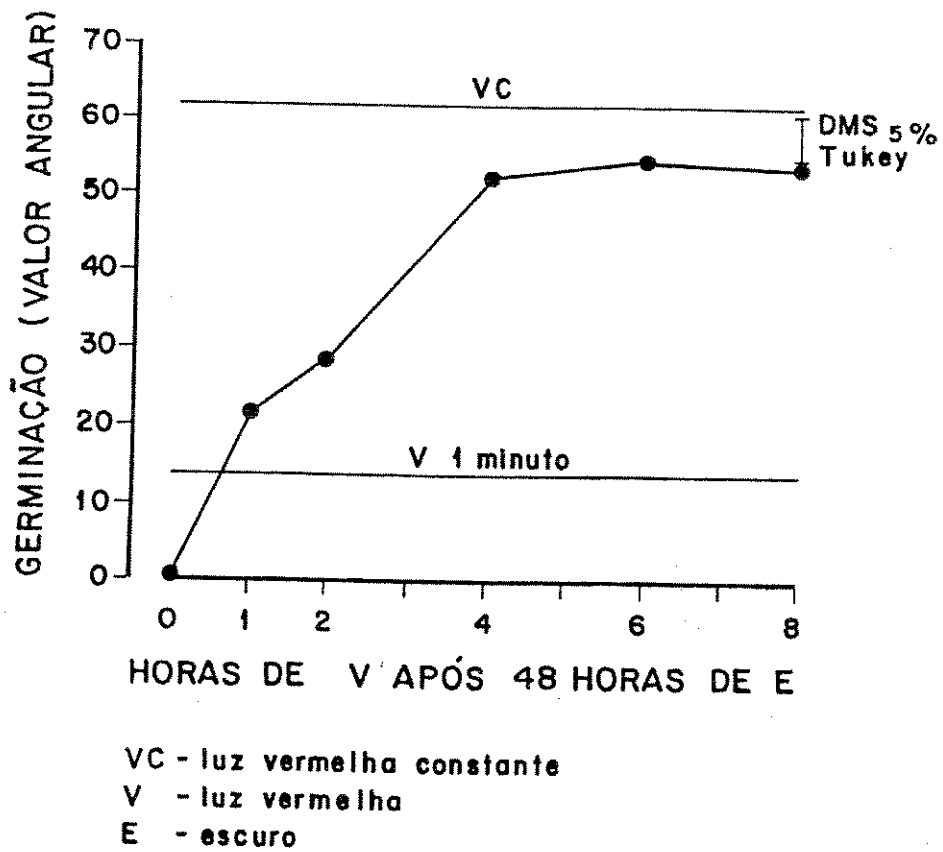


FIGURA 9 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, a 25°C. Os tratamentos foram realizados após a pré-indução. Fonte b.

FIGURA 10

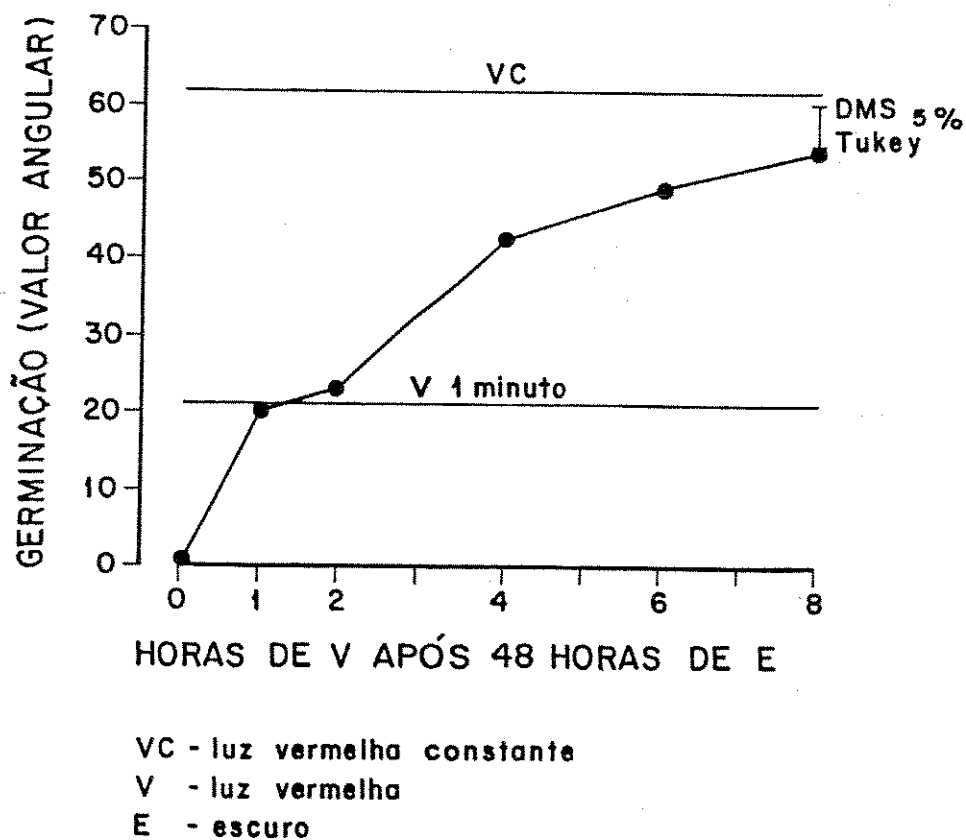


FIGURA 10 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, a 25°C. Os tratamentos foram realizados após a pré-indução. Fonte c.

As figuras 11 e 12 apresentam sobreposição dos resultados das figuras 8, 9 e 10. Observa-se na figura 11 que os tratamentos de 1, 2, 4 e 6h de luz vermelha, utilizando-se lâmpada fluorescente vermelha, causaram as maiores respostas de promoção de germinação. O tratamento de 1 hora de luz vermelha foi mais efetivo do que o de 1 hora de luz branca. Os tratamentos de 2, 4 e 6h de luz vermelha (fonte b) foram estatisticamente maiores do que os de luz branca (fonte a) e luz vermelha (fonte c). Os tratamentos de 8 horas de luz causaram respostas semelhantes, considerando-se as três fontes luminosas testadas.

A figura 12A compara os tratamentos luminosos de 1 minuto de duração realizados com três diferentes fontes luminosas, após o período de pré-indução. Nota-se que a maior promoção de germinação foi obtida com a lâmpada gro-lux associada a filtro de papel celofane vermelho (tratamento c).

A figura 12B compara a germinação sob luz contínua, para esporos submetidos a três diferentes tratamentos luminosos. Não houve diferença entre os três tratamentos.

Com o intuito de se obterem explicações para o fato dos tratamentos luminosos de longa duração não causarem promoções iguais às de luz constante, foram feitos experimentos onde se aumentou o período de exposição aos tratamentos luminosos. Na figura 13 estão os resultados de um experimento onde se verificou o efeito de tratamentos de 24 e 48 horas de luz branca ou vermelha (lâmpada fluorescente vermelha) fornecidos após o período de pré-indução. Esses tratamentos promoveram a germinação, mas os valores obtidos foram menores do que os de luzes branca. Luz vermelha

FIGURA 11

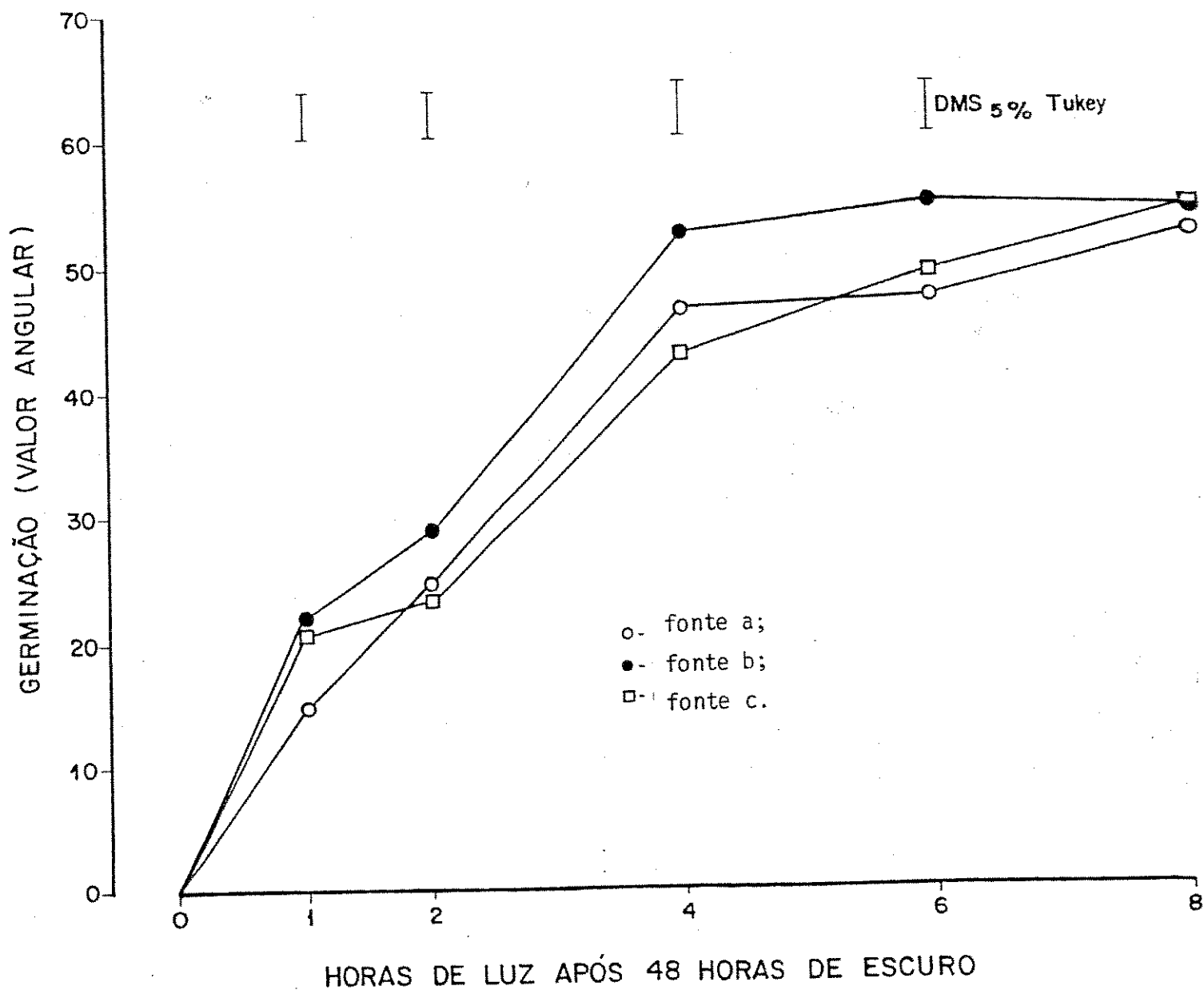


FIGURA 11 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, a 25°C. Os tratamentos foram realizados após o período de pré-indução.  
Fonte a;  
Fonte b;  
Fonte c.

FIGURA 12 - Efeito de tratamentos luminosos de 1 minuto de duração e de luz contínua na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, a 25°C.

Os tratamentos de 1 minuto foram realizados após a pré-indução.

A - Tratamento de 1 minuto;

B - Luz contínua.

Fonte a;

Fonte b;

Fonte c.

FIGURA 12

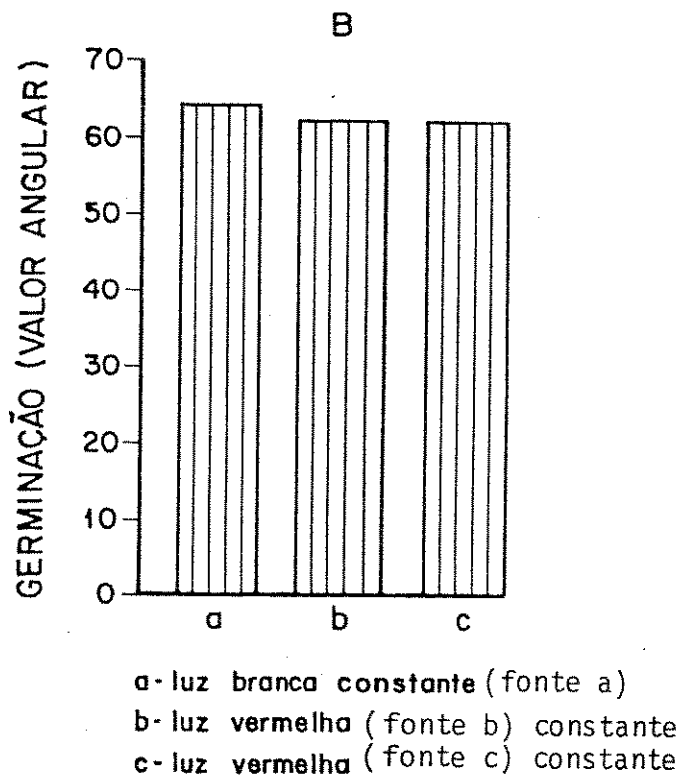
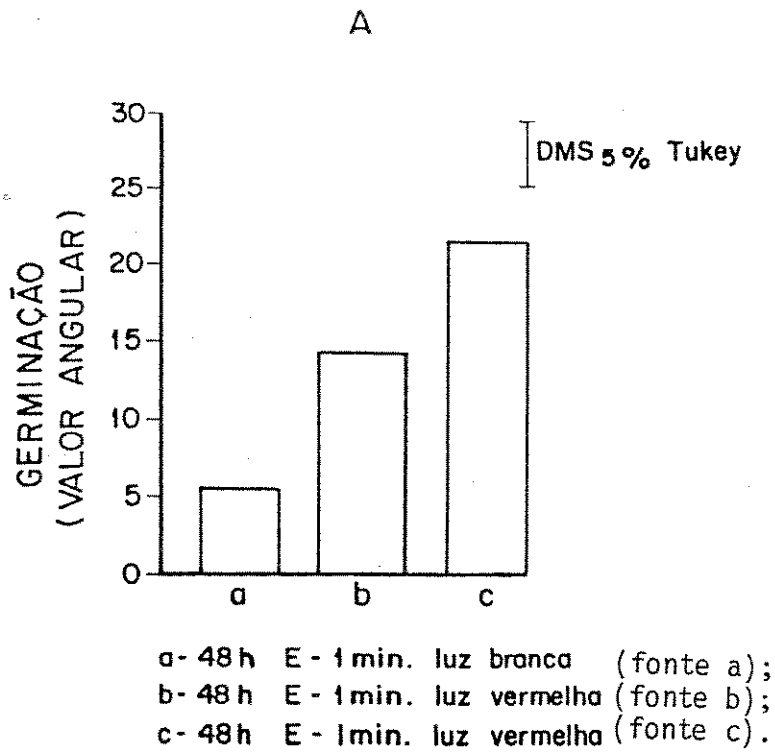


FIGURA 13

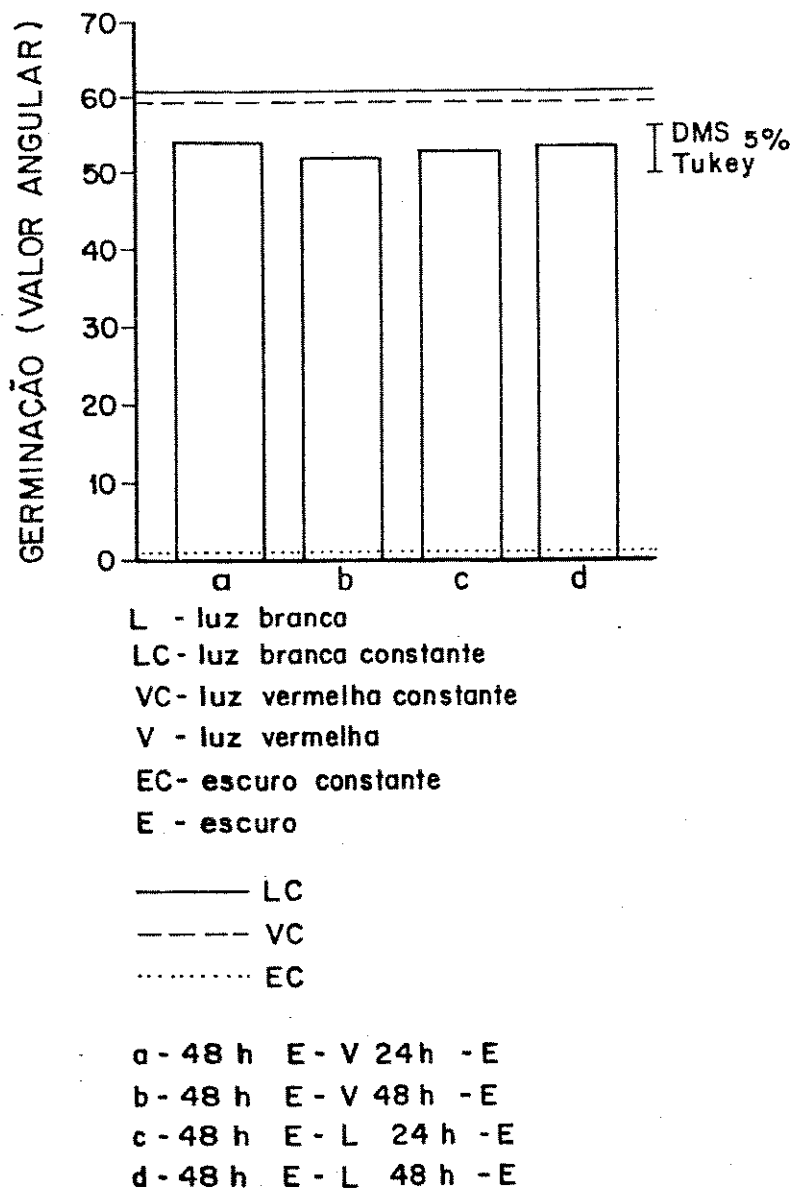


FIGURA 13 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração (24 e 48 horas) na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, a 25°C. Os tratamentos foram realizados após a pré-indução.  
Fonte a;  
Fonte b.

foi igual aos tratamentos a e d.

No experimento da figura 14 foi utilizada lâmpada gro-lux e filtro formado por papel celofane vermelho. Após o período de pré-indução, esporos receberam tratamentos de 24, 48 ou 120 horas (5 dias) de luz vermelha. O tratamento de 24 horas não atingiu o valor obtido para luz constante. Os tratamentos de 48 horas e 120 horas causaram efeito estatisticamente igual ao do controle sob luz contínua. Tratamento de 120 horas de luz branca (não mostrado), induziu resposta de 57,23 (valor angular) estatisticamente igual a de 59,76 do controle sob luz contínua.

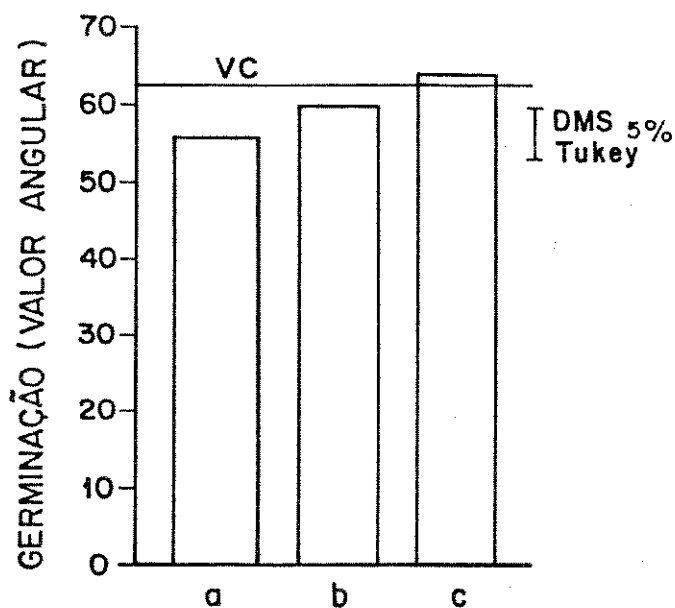
Em resumo, nessa série de experimentos observou-se que o tratamento luminoso de curta duração mais eficiente em promover a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* foi obtido com o uso de lâmpada fluorescente gro-lux associada a filtro de papel celofane vermelho. Tratamentos luminosos de 4 horas de luz causam estabilização da resposta de germinação, quando se utilizaram lâmpadas fluorescentes branca ou vermelha. Com o uso de lâmpada gro-lux e filtro de papel celofane vermelho, as respostas de germinação tiveram um aumento gradual quando os tratamentos luminosos aumentaram de 1 a 8 horas de duração. Tratamentos de 8 horas não causaram o mesmo efeito da luz contínua, para as três fontes luminosas utilizadas. Quando os tratamentos foram aumentados para 24, 48 ou 120 horas de duração, a lâmpada gro-lux associada a filtro de papel celofane vermelho induziu germinação semelhante a de luz constante.

#### - Tratamentos com Luz Azul

Na Tabela 6 estão indicados os resultados de experi



FIGURA 14



VC - luz vermelha constante

V - luz vermelha

E - escuro

a - 48 h E - V 24 h - E

b - 48 h E - V 48 h - E

c - 48 h E - V 120 h

FIGURA 14 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração (24, 48 e 120 horas) na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, a 25°C.

Os tratamentos foram realizados após a pré-indução.  
Fonte c.

TABELA 6 - Efeito de tratamentos de luz azul de 1 minuto de duração (únicos e diários) e de tratamentos longos (24, 48 e 120 horas) na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, a 25°C. Os tratamentos foram iniciados imediatamente após a pré-indução (48h). Após os tratamentos, retornava-se ao escuro. Não foram considerados os valores de luz branca constante no cálculo de F que foi feito para os dois experimentos juntos.  
 LC - Luz branca constante, fonte a;  
 EC - Escuro constante;  
 Azul - Luz azul, fonte d.

T r a t a m e n t o	Germinação valor angular	
	Experimentos	
	1	2
C o l e t a armazenamento (dias)	setembro 156	setembro 170
Controle LC	59,43	63,57
Controle EC	0,0 a	0,0 a
Azul constante	7,08b	4,22a
Azul 1 minuto único	0,0 a	-
Azul 1 minuto diário(cada 24h)	0,0 a	-
Azul 24 horas	7,10b	3,26a
Azul 48 horas	4,37a	5,42a
Azul 120 horas	0,0 a	5,19a
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	5,57	5,57

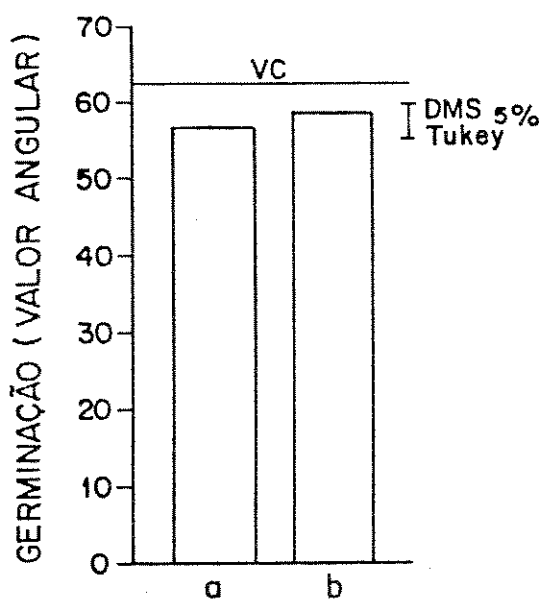
mentos onde se testou o efeito de tratamento único ou diário de luz azul, de 1 minuto de duração. Os tratamentos foram realizados após a pré-indução. Foi também verificado o efeito de tratamentos longos (24, 48 e 120 horas) de luz azul. Os experimentos tiveram como controle tratamentos de luz branca constante, escuro constante e luz azul constante. A luz azul causou uma pequena promoção da germinação, que nem sempre foi significativa estatisticamente. Tratamentos de curta duração não promoveram a germinação. Luz azul constante e tratamentos de 24, 48 ou 120 horas de luz azul induziram a pequenas respostas de germinação, mas apenas com azul constante ou 24h de azul no experimento I a promoção foi significativa.

A figura 15 representa resultados de um experimento onde se associaram tratamentos de luz vermelha e luz azul, ambos de longa duração. A luz azul não impediu a manifestação do efeito indutor da luz vermelha. No tratamento b, os esporos receberam 48 horas de luz azul, após o período de pré-indução e depois foram expostos à luz vermelha até o final do experimento. O valor de germinação obtido após esse tratamento foi estatisticamente igual à do controle sob luz vermelha constante (lâmpada gro-lux e filtro de papel celofane vermelho).

#### - Espectro Fotoacústico de Esporos Secos e Paredes de Esporos

A figura 16 é o espectro fotoacústico de esporos secos e paredes de esporos, ambos sem serem embebidos. Esse espectro foi traçado com o objetivo de se verificar em que

FIGURA 15



VC - luz vermelha constante

V - luz vermelha

A - luz azul

E - escuro

a - 48h E - V 8h - A

b - 48h E - 48h A - V

FIGURA 15 - Efeito de tratamentos longos de luz vermelha associados a tratamentos longos de luz azul, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, a 25°C.

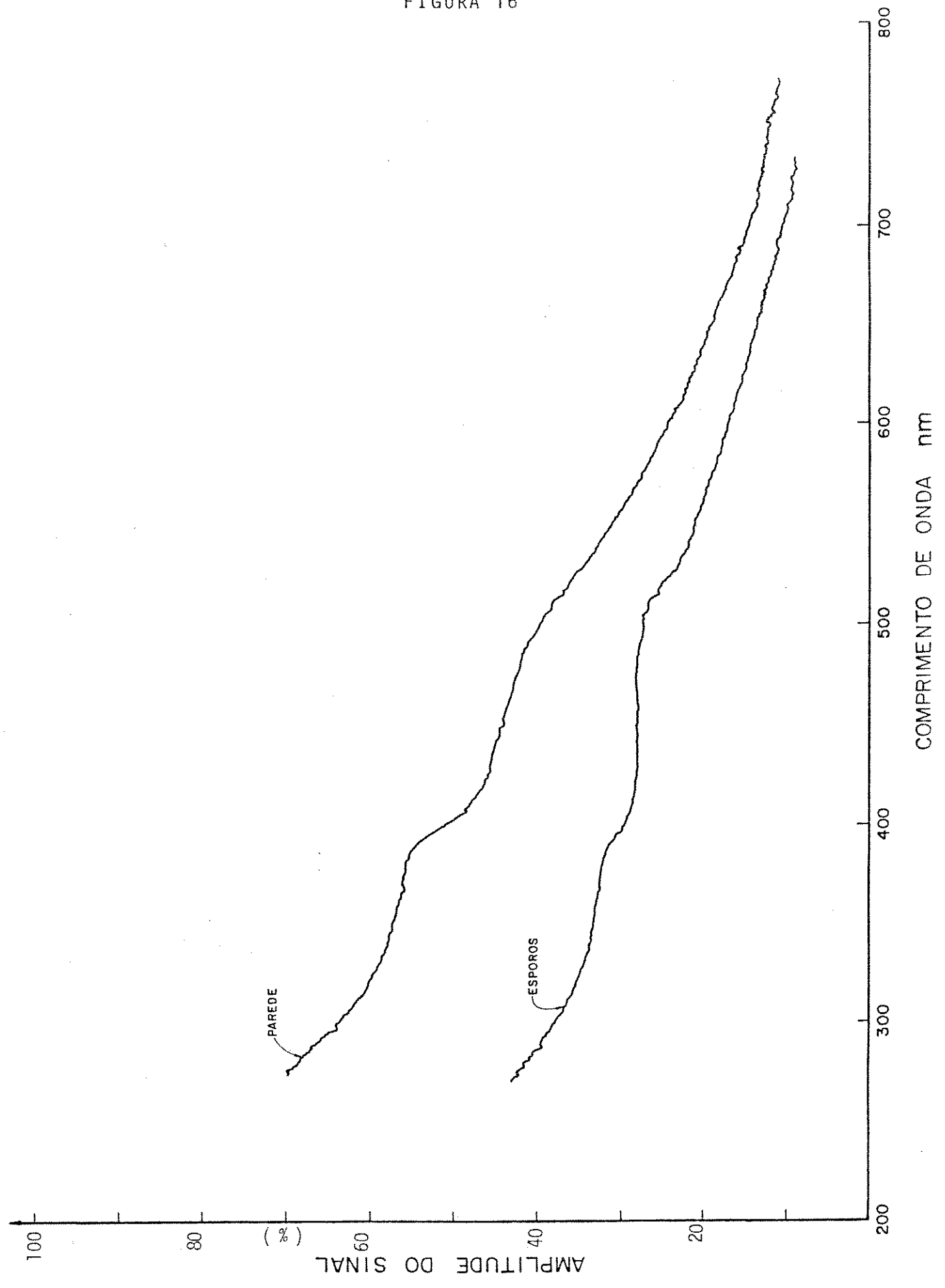
Os tratamentos foram realizados após a pré-indução.

Fonte c;

Fonte d.

FIGURA 16 - Espectro fotoacústico de esporos secos e paredes de esporos de *Cyathea delgadii*.

FIGURA 16



comprimento de onda, principalmente na faixa da luz visível, os esporos absorvem ou transmitem mais a luz. No espectro fotoacústico, quanto maior for a amplitude do sinal maior foi a absorção da luz e conseqüentemente, menor a transmissão. Tanto paredes como esporos intactos não embebidos absorvem mais na faixa do ultravioleta longo, diminuindo na faixa da luz azul. Nas faixas da luz vermelha e vermelho extremo, a absorção é pequena e portanto, a transmissão é alta.

#### - Efeito de Temperatura

Os tratamentos utilizados para induzir germinação foram os tratamentos únicos ou diários de 1 minuto de luz vermelha. A fonte luminosa usada foi a lâmpada fluorescente vermelha. Verificou-se como as diferentes temperaturas testadas afetam a indução da germinação, causada por esses tratamentos luminosos.

Inicialmente, foi estudado o efeito de temperaturas constantes, durante o período de pré-indução (sempre 48 horas de embebição no escuro), seguido de tratamento único de 1 minuto de luz vermelha (a 25°C), após o que retornavam ao escuro a 25°C. Os resultados são apresentados na tabela 7. Cada experimento apresentou três controles a 25°C: luz fluorescente branca constante; escuro constante e tratamento de 1 minuto de luz vermelha, após o período de pré-indução.

TABELA 7 - Efeito de temperatura durante o período de pré-indução, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha após a pré-indução. Depois do tratamento, retornaram ao escuro a 25°C. Não foram considerados os valores de luz constante nos cálculos de F.  
 LC - Luz branca constante;  
 EC - Escuro constante;  
 LV - Fonte b.

T r a t a m e n t o	Germinação valor angular				
	E x p e r i m e n t o s				
	1	2	3	4	5
C o l e t a	março	março	junho	março	abril
armazenamento (dias)	84	93	77	83	176
Controle LC	50,58	49,70	43,85	49,81	48,76
Controle EC	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
T °C durante a pré-indução					
5	0,0 a	-	-	0,0 a	-
10	-	-	0,0 a	-	-
15	-	-	0,0 a	-	-
20	-	-	-	1,9 a	-
25	14,01c	11,68b	9,4 c	11,24b	12,38b
30	7,48b	-	4,91b	-	-
35	-	0,0 a	0,0 a	-	-
40	-	-	-	-	0,0 a
45	-	-	-	-	0,0 a
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	4,03	1,39	3,71	3,53	2,49



Pelos resultados apresentados anteriormente (Tabelas 3 e 4), sempre ocorreu promoção da germinação quando o tratamento luminoso foi fornecido a esporos pré-induzidos a 25°C. Pela Tabela 7, observa-se que esporos pré-induzidos a 30°C, apresentaram valores de germinação menores do que os obtidos para os pré-induzidos a 25°C. Não houve indução de germinação para esporos tratados com as temperaturas de 5, 10, 15, 20, 35, 40 e 45°C durante o período de pré-indução.

A Tabela 8 mostra os resultados de experimentos onde se variou a temperatura durante o período de pré-indução. Após esse período, os esporos receberam tratamentos diários de luz vermelha, intercalados por intervalos de 24 horas de escuro, a 25°C. Estes experimentos apresentaram também três controles, a 25°C: luz fluorescente branca constante; escuro constante e tratamentos diários de 1 minuto de luz vermelha, cuja primeira aplicação foi imediatamente após o período de pré-indução. Nota-se que houve um aumento gradual da germinação, conforme as temperaturas de pré-indução aumentaram de 5 para 25°C. Com a aplicação de tratamentos luminosos diários, observa-se que os efeitos inibidores de 5, 10, 15 e 20°C durante a pré-indução foram parcialmente revertidos, com exceção do efeito de 30°C, cuja pequena inibição de germinação foi totalmente revertida. O efeito inibidor de temperaturas de 35, 40 e 45°C não foi anulado, mesmo com a aplicação de tratamentos diários de luz vermelha. Há evidências de que quanto mais baixa foi a temperatura de pré-indução, menor se tornou a fotossensibilidade dos esporos. Isto porque foram necessários cinco tratamentos luminosos de curta duração, fornecidos a cada 24 horas, para que os esporos pré-induzidos a 5 e 10°C apresentassem germina-

TABELA 8 - Efeito de temperaturas durante o período de pré indução, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, que receberam tratamentos diários de 1 minuto de luz vermelha, intercalados por períodos de 24 horas de escuro. Depois dos tratamentos, retornaram ao escuro a 25°C. Não foram considerados os valores de luz constante nos cálculos de F. LC - Luz branca constante; EC - Escuro constante; LV - Fonte b.

T r a t a m e n t o	Germinação valor angular		
	E x p e r i m e n t o		
	1	2	3
Co l e t a	junho	março	abril
armazenamento (dias)	86	175	176
Controle LC	42,30	49,81	48,76
Controle EC	0,0 a	0,0 a	0,0 a
T °C durante a pré-indução			
5	-	12,63b	-
10	16,01b	-	-
15	-	20,07c	-
20	-	22,40c	-
25	25,82c	30,29a	31,78b
30	25,02c	-	-
35	0,95a	-	-
40	-	-	0,0 a
45	-	-	0,0 a
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	4,46	5,46	2,3

ção semelhante à observada para os controles, a 25<sup>0</sup>C que receberam apenas um tratamento luminoso (experimento 1, da Tabela 7). Temperaturas altas (35, 40 e 45<sup>0</sup>C) causaram inibições irreversíveis da fotossensibilidade.

A Tabela 9 apresenta os resultados de experimentos onde foi variada a temperatura durante os períodos de pré-indução e pós-indução. Foram feitos os mesmos controles realizados na Tabela 7. Após a pré-indução, os esporos receberam tratamento único de 1 minuto de luz vermelha, a 25<sup>0</sup>C e retornaram ao escuro, nas temperaturas utilizadas no período de pré-indução. Todas as temperaturas testadas durante a pré e pós-indução, causaram inibição da germinação, quando comparadas ao controle de 25<sup>0</sup>C.

A Tabela 10 representa resultados de experimentos onde se variou a temperatura durante os períodos de pré e pós-indução. Após o período de pré-indução, os esporos passaram a receber tratamentos diários de luz vermelha, de 1 minuto de duração, intercalados por períodos de escuro de 24 horas, na temperatura de pré-indução. Observa-se que temperaturas de 5, 10, 15, 30, 35, 40 e 45<sup>0</sup>C fornecidas durante os períodos de pré e pós-indução inibem totalmente o efeito promotor dos tratamentos luminosos diários. A temperatura de 20<sup>0</sup>C aplicada durante esses períodos causa uma redução da germinação, quando se compara à germinação a 25<sup>0</sup>C.

O efeito de alternância de temperaturas foi verificado durante a pré-indução e durante pré e pós-indução, para esporos que receberam tratamentos únicos de luz vermelha de curta duração.

TABELA 9 - Efeito da temperatura durante os períodos de pré-indução e pós-indução, sobre a germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, que receberam um único tratamento de 1 minuto de luz vermelha, após a pré-indução.

Depois do tratamento, retornaram ao escuro, nas temperaturas de pré-indução. Não foram considerados os valores de luz constante nos cálculos de F.

LC - Luz branca constante;

EC - Escuro constante;

LV - Fonte b.

T r a t a m e n t o	Germinação valor angular		
	E x p e r i m e n t o		
	1	2	3
C o l e t a	junho	abril	março
armazenamento (dias)	78	177	155
Controle LC	41,43	50,47	48,87
Controle EC	0,0 a	0,0 a	0,0 a
T °C durante pré-indução e pós-indução			
5	-	-	0,0 a
10	0,0 a	-	-
15	-	-	0,0 a
20	-	-	2,31a
25	8,60b	13,03b	10,41b
30	0,0 a	-	-
35	0,0 a	-	-
40	-	0,0 a	-
45	-	0,0 a	-
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	1,45	1,44	3,0

TABELA 10 - Efeito de temperaturas durante os períodos de pré-indução e pós-indução, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii* que receberam tratamentos diários de 1 minuto de luz vermelha, intercalados por períodos de 24 horas no escuro. Depois do tratamento, retornaram ao escuro, nas temperaturas de pré-indução. Não foram considerados os valores de luz constante nos cálculos de F.

LC - Luz fluorescente branca constante;

EC - Escuro constante;

LV - Fonte b.

T r a t a m e n t o	Germinação valor angular		
	E x p e r i m e n t o		
	1	2	3
C o l e t a	junho	abril	março
armazenamento (dias)	78	177	155
Controle LC	41,43	50,47	47,87
Controle EC	0,0 a	0,0 a	0,0 a
T °C durante pré-indução e pós-indução			
5	-	-	0,0 a
10	0,0 a	-	-
15	-	-	0,0 a
20	-	-	11,81b
25	21,96b	29,92b	29,06c
30	0,0 a	-	-
35	0,0 a	-	-
40	-	0,0 a	-
45	-	0,0 a	-
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	3,16	2,3	3,77

Na série de experimentos representados nas Tabelas 11, 12 e 13, analisou-se o efeito no período de pré-indução, dos seguintes pares de temperaturas alternadas: 25-5°C, 25-10°C, 25-15°C, 25-20°C, 25-25°C (Controle), 25-30°C, 25-35°C, 25-40°C e 25-45°C em ciclos de: 8-16 horas, sendo 8 horas a 25°C e 16 horas na temperatura alternada (tabela 11); 12-12 horas, sendo 12 horas a 25°C e 12 horas na temperatura alternada (tabela 12) e 16-8 horas, sendo 16 horas a 25°C e 8 horas na temperatura alternada (tabela 13). A alternância sempre foi iniciada a 25°C.

Pelos resultados apresentados na série de experimentos da Tabela 11, observa-se que com exceção do par de temperaturas alternadas 25-20°C (experimento 4), todos os outros pares alternantes em ciclos de 8-16 horas, fornecidos durante a pré-indução, inibiram o efeito do tratamento luminoso.

A Tabela 12 apresenta os resultados do efeito de temperaturas alternadas, em ciclos de 12-12 horas, fornecidas durante o período de pré-indução. Nessa série de experimentos, observa-se que os pares 25-5°C (Experimento 1), 25-35°C (Experimento 3), 25-40°C (Experimento 4) e 25-45°C (Experimento 4) causaram inibição total do efeito do tratamento luminoso, de 1 minuto de duração, realizado após a pré-indução. Os pares alternantes 25-10°C e 25-15°C (Experimento 2) causaram inibição parcial do efeito da luz vermelha. Não houve diferença entre os efeitos dos pares 25-20°C e 25-30°C, em ciclos de 12-12 horas e o controle a 25°C.

Na Tabela 13 estão representados os resultados dos efeitos de temperaturas alternadas em ciclos de 16-8 horas,

TABELA 11 - Efeito de alternância de temperaturas em ciclos de 8-16 horas durante a pré-indução, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha, após a pré-indução. Depois do tratamento retornaram ao escuro a 25°C. O período de 8 horas foi sempre a 25°C. Não foram considerados os valores de luz constante nos cálculos de F. LC - Luz branca constante; EC - Escuro constante; LV - Fonte b.

T r a t a m e n t o	Germinação valor angular				
	E x p e r i m e n t o s				
	1	2	3	4	5
Coleta	março	junho	abril	abril	março
armazenamento (dias)	154	67	170	190	162
Controle LC	46,15	41,43	53,04	46,25	49,18
Controle EC	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,95a	0,0 a
Pares de temperaturas alternadas em ciclos de 8-16 horas					
25°C - 5°C	0,0 a	-	-	-	-
25°C - 10°C	-	0,95a	-	-	-
25°C - 15°C	-	-	2,61a	-	-
25°C - 20°C	-	-	-	8,47b	-
25°C - 25°C	10,60b	8,60c	10,29b	11,90b	10,60b
25°C - 30°C	-	3,82b	-	-	-
25°C - 35°C	-	0,0 a	-	-	-
25°C - 40°C	-	-	-	-	0,0 a
25°C - 45°C	-	-	-	-	0,0 a
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	1,84	3,21	4,22	4,05	1,84

TABELA 12 - Efeito de alternância de temperaturas em ciclos de 12-12 horas, durante a pré-indução, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha, após a pré-indução. Depois do tratamento, retornaram ao escuro, a 25°C. Não foram considerados os valores de luz constante nos cálculos de F.  
 LC - Luz branca constante;  
 EC - Escuro constante;  
 LV - Fonte b.

T r a t a m e n t o	Germinação valor angular			
	E x p e r i m e n t o			
C o l e t a armazenamento (dias)	1 março	2 março	3 março	4 março
Controle LC	46,15	51,36	49,62	49,18
Controle EC	0,0 a	0,0 a	0,95a	0,0 a
Pares de temperaturas alternadas em ciclos de 12-12 horas				
25°C - 5°C	0,0 a	-	-	-
25°C - 10°C	-	7,64b	-	-
25°C - 15°C	-	7,24b	-	-
25°C - 20°C	-	10,91c	10,67b	-
25°C - 25°C	10,60b	12,46c	12,35b	10,60b
25°C - 30°C	-	-	11,36b	-
25°C - 35°C	-	-	0,0 a	-
25°C - 40°C	-	-	-	0,0 a
25°C - 45°C	-	-	-	0,0 a
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	1,84	3,65	5,46	1,84



TABELA 13 - Efeito de alternância de temperaturas em ciclos de 16-8 horas, durante a pré-indução, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha, após a pré-indução. Depois do tratamento, retornaram ao escuro a 25°C. O período de 16 horas foi sempre a 25°C. Não foram considerados os valores de luz constante nos cálculos de F.  
 LC - Luz branca constante;  
 EC - Escuro constante;  
 LV - Fonte b.

T r a t a m e n t o	Germinação valor angular				
	E x p e r i m e n t o s				
	1	2	3	4	5
Coleta	março	junho	abril	abril	março
armazenamento (dias)	164	84	170	190	162
Controle LC	46,15	42,30	53,04	46,25	49,18
Controle EC	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,95a	0,0 a
Pares de temperaturas alternadas em ciclos de 16-8 horas					
25°C - 5°C	0,95a	-	-	-	-
25°C - 10°C	-	5,18b	-	-	-
25°C - 15°C	-	-	11,47b	-	-
25°C - 20°C	-	-	-	12,23b	-
25°C - 25°C	10,6b	6,59b	10,29b	11,90b	10,60b
25°C - 30°C	-	4,37ab	-	-	-
25°C - 35°C	-	0,0 a	-	-	-
25°C - 40°C	-	-	-	-	0,0 a
25°C - 45°C	-	-	-	-	0,0 a
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	2,71	5,08	3,30	4,70	1,84

fornecidos durante a prē-indução. Observa-se que os pares: 25-5<sup>o</sup>C (Experimento 1), 25-35<sup>o</sup>C (Experimento 2), 25-40<sup>o</sup>C (Experimento 5) e 25-45<sup>o</sup>C (Experimento 5) inibem o efeito indutor do tratamento de luz vermelha. Não houve diferença entre os efeitos dos pares 25-10<sup>o</sup>C (Experimento 2), 25-15<sup>o</sup>C (Experimento 3), 25-20<sup>o</sup>C (Experimento 4), 25-30<sup>o</sup>C (Experimento 2) e o controle a 25<sup>o</sup>C.

Em resumo, quanto menor o tempo de exposição à temperatura alternante, durante o período de prē-indução, maior o efeito indutor do tratamento luminoso, para as temperaturas alternantes de 10, 15, 20 e 30<sup>o</sup>C.

Na série de experimentos representados nas Tabelas 14, 15 e 16, analisou-se o efeito, nos períodos de prē e pōs-indução, dos pares de temperaturas alternadas: 25-5<sup>o</sup>C, 25-10<sup>o</sup>C, 25-15<sup>o</sup>C, 25-20<sup>o</sup>C, 25-25<sup>o</sup>C (Controle), 25-30<sup>o</sup>C, 25-35<sup>o</sup>C, 25-40<sup>o</sup>C e 25-45<sup>o</sup>C. Estes pares foram em ciclos de 8-16 horas, sendo 8 horas a 25<sup>o</sup>C e 16 horas na temperatura alternada (Tabela 14); 12-12 horas, sendo 12 horas a 25<sup>o</sup>C e 12 horas na temperatura alternada (Tabela 15) e 16-8 horas, sendo 16 horas a 25<sup>o</sup>C e 8 horas na temperatura alternada (Tabela 16). A alternância sempre se iniciou a 25<sup>o</sup>C.

A Tabela 14 apresenta os resultados do efeito de temperaturas alternadas em ciclos de 8-16 horas, durante prē e pōs-indução. Todos os pares de temperaturas alternadas inibiram o efeito do tratamento de luz vermelha, de 1 minuto de duração, fornecidos apōs o período de prē-indução, com exceção do par 25-20<sup>o</sup>C (Experimento 4).

Os efeitos de temperaturas alternadas em ciclos de 12-12 horas durante os períodos de prē e pōs-indução estão indicados na Tabela 15. Os pares alternantes 25-5<sup>o</sup>C ,

TABELA 14 - Efeito de alternância de temperaturas em ciclos de 8-16 horas, durante a pré-indução e a pós-indução, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha após a pré-indução. Após o tratamento, os esporos retornaram ao escuro e foram mantidos no sistema de temperaturas da pré-indução. O período de 8 horas foi sempre a 25°C. Não foram considerados os valores de luz constante nos cálculos de F. LC - Luz branca constante; EC - Escuro constante; LV - Fonte b.

T r a t a m e n t o	Germinação valor angular				
	E x p e r i m e n t o s				
	1 março	2 junho	3 abril	4 abril	5 março
C o l e t a armazenamento (dias)	154	68	170	190	162
Controle LC	46,15	41,43	53,04	46,25	49,18
Controle EC	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,95a	0,0 a
Pares de temperaturas alternadas em ciclos de 8-16 horas					
25°C - 5°C	0,0 a	-	-	-	-
25°C - 10°C	-	0,0 a	-	-	-
25°C - 15°C	-	-	0,95a	-	-
25°C - 20°C	-	-	-	9,88b	-
25°C - 25°C	10,60b	8,6 b	10,29b	11,90b	10,60b
25°C - 30°C	-	0,0 a	-	-	-
25°C - 35°C	-	0,0 a	-	-	-
25°C - 40°C	-	-	-	-	0,0 a
25°C - 45°C	-	-	-	-	0,0 a
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	1,84	1,45	2,89	3,65	1,84

25-10°C, 25-15°C, 25-30°C, 25-35°C, 25-40°C e 25-45°C, inibiram o efeito do tratamento de luz vermelha, de 1 minuto de duração, fornecidos após o período de pré-indução. Os tratamentos 25-20°C e 25-25°C foram estatisticamente semelhantes.

Na Tabela 16 estão representados os resultados de temperaturas alternadas em ciclos de 16-8 horas, fornecidas durante os períodos de pré e pós-indução. Observa-se que os pares 25-5°C (Experimento 1), 25-10°C (Experimento 2), 25-30°C (Experimento 2), 25-35°C (Experimento 2), 25-40°C (Experimento 5) e 25-45°C (Experimento 5) inibem o efeito do tratamento luminoso de 1 minuto de luz vermelha, fornecido após o período de pré-indução. Os pares 25-15°C (Experimento 3) e 25-20°C (Experimento 4), apresentaram efeito semelhante ao controle a 25°C.

Observa-se que quanto menor o tempo de exposição à temperatura alternada, na faixa compreendida entre 10 a 20°C, maior a resposta de germinação. Temperatura baixa (5°C) e temperaturas altas (30°C ou acima), causam inibições do efeito da luz vermelha, que não podem ser anuladas mesmo quando se aumenta o período alternante a 25°C, num ciclo de 24 horas.

- Pré-Embebição em Vapor de Água durante  
uma semana

Esporos foram submetidos à pré-embebição em vapor de água durante uma semana para se verificar se havia ace-

TABELA 15 - Efeito de alternância de temperaturas em ciclos de 12-12 horas, durante a pré-indução e a pós-indução, na germinação de esporos de *Cyathia delgadii*, que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha após a pré-indução. Após o tratamento, os esporos retornaram ao escuro e foram mantidos no sistema de temperaturas da pré-indução. Não foram considerados os valores de luz constante nos cálculos de F.  
 LC - Luz branca constante;  
 EC - Escuro constante;  
 LV - Fonte b.

T r a t a m e n t o	Germinação Valor angular				
	E x p e r i m e n t o s				
	1	2	3	4	5
Coleta	março	junho	abril	abril	março
armazenamento (dias)	154	68	170	190	162
Controle LC	46,15	41,43	53,04	46,25	49,18
Controle EC	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,95a	0,0 a
Pares de temperaturas alternadas em ciclos de 12-12 horas					
25°C - 5°C	0,0 a	-	-	-	-
25°C - 10°C	-	0,0 a	-	-	-
25°C - 15°C	-	-	3,26a	-	-
25°C - 20°C	-	-	-	15,37b	-
25°C - 25°C	10,60b	8,60b	10,29b	11,90b	10,60b
25°C - 30°C	-	1,91a	-	-	-
25°C - 35°C	-	0,0 a	-	-	-
25°C - 40°C	-	-	-	-	0,0 a
25°C - 45°C	-	-	-	-	0,0 a
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	1,84	2,66	3,7	4,05	1,84

TABELA 16 - Efeito de alternância de temperaturas em ciclos de 16-8 horas, durante a pré-indução e a pós-indução, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*, que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha após a pré-indução. Após o tratamento, os esporos retornaram ao escuro e foram mantidos no sistema de temperaturas da pré-indução. O período de 16 horas foi sempre a 25°C. Não foram considerados os valores de luz constante nos cálculos de F.

LC - Luz branca constante;  
 EC - Escuro constante;  
 LV - Fonte b.

T r a t a m e n t o s	Germinação Valor angular				
	E x p e r i m e n t o s				
	1	2	3	4	5
C o l e t a	março	junho	abril	abril	março
armazenamento (dias)	154	68	170	190	162
Controle LC	46,15	41,43	53,04	46,25	49,18
Controle EC	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,95 a	0,0 a
Pares de temperaturas alternadas em ciclos de 16-8 horas					
25°C - 5°C	0,0 a	-	-	-	-
25°C - 10°C	-	0,95a	-	-	-
25°C - 15°C	-	-	8,34b	-	-
25°C - 20°C	-	-	-	9,87b	-
25°C - 25°C	10,60b	8,60b	10,29b	11,90b	10,60b
25°C - 30°C	-	1,91a	-	-	-
25°C - 35°C	-	0,0 a	-	-	-
25°C - 40°C	-	-	-	-	0,0 a
25°C - 45°C	-	-	-	-	0,0 a
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	1,84	3,21	2,45	6,19	1,84

leração do processo de germinação ou se o período de pré-indução seria alterado.

Na Figura 17 estão representadas as curvas de germinação para esporos secos (não pré-embebidos em vapor de água) e para esporos pré-embebidos em vapor de água por uma semana. Em ambas as curvas, a germinação teve início no terceiro dia, mas os valores de germinação nos dias 3 e 4 foram estatisticamente maiores para os esporos pré-embebidos em vapor de água. Nos demais dias, os valores de germinação foram semelhantes.

A Figura 18 mostra os resultados de um experimento onde esporos pré-embebidos em vapor de água receberam tratamentos luminosos de 1 minuto de duração após 12, 24, 36 e 48 horas de embebição no escuro. A fonte luminosa utilizada foi a lâmpada gro-lux associada ao filtro de papel celofane vermelho (fonte c). Esta é a fonte luminosa que induz maiores taxas de germinação em tratamentos curtos. Como controle, os mesmos tratamentos foram feitos em esporos secos. A Figura 18A compara os resultados obtidos para esporos secos com os obtidos para esporos pré-embebidos. Observa-se que esporos pré-embebidos apresentam valores de germinação maiores que os esporos secos, quando os tratamentos luminosos foram aplicados após 12 e 24 horas de embebição no escuro. Após 36 horas, as respostas continuam maiores para esporos pré-embebidos igualando-se aos esporos secos após 48 horas de embebição no escuro. O período de pré-indução parece ser reduzido para esporos pré-embebidos. Além disso, esporos pré-embebidos parecem alcançar valores de germinação mais altos que esporos secos. A Figura 18B compara efeito dos tratamentos luminosos apenas para esporos

FIGURA 17

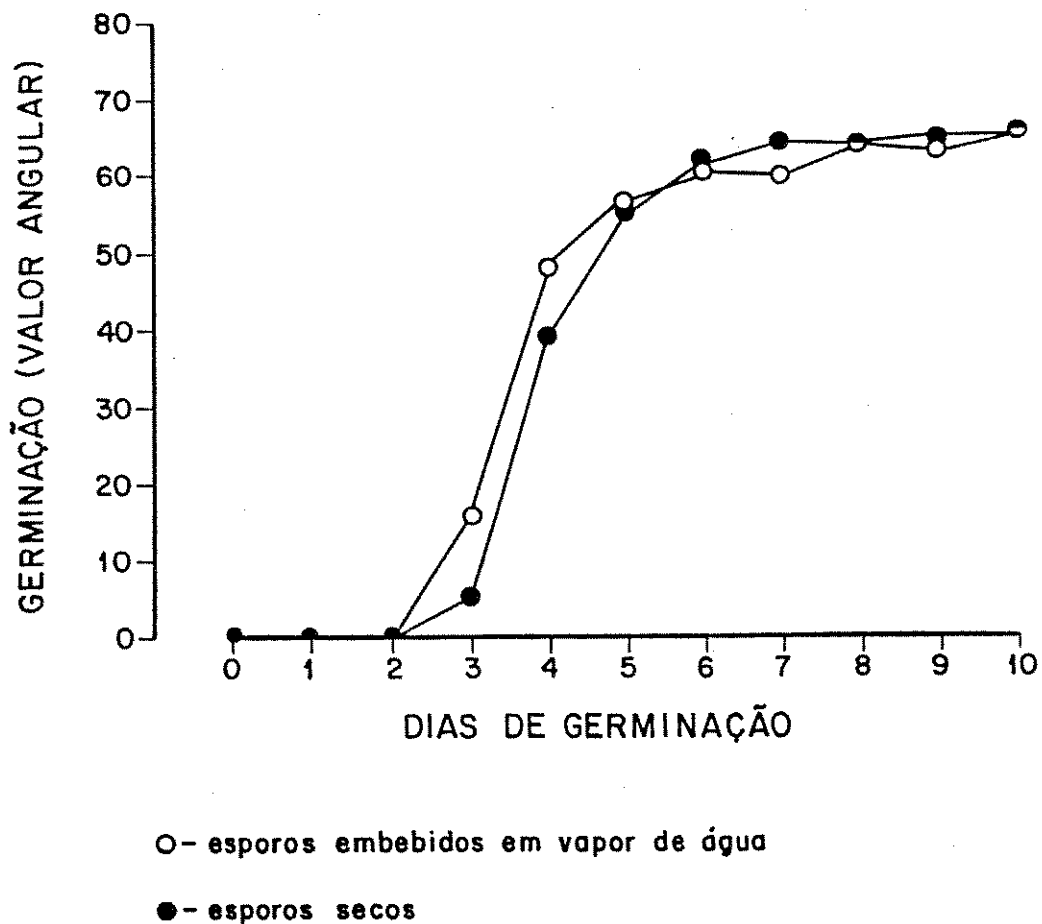


FIGURA 17 - Efeito da pré-embebição de esporos em vapor de água, na germinação de *Cyathea delgadii*, a 25°C. Teste  $t$  a 95% foi significativo para os dias 3 e 4



FIGURA 18 - Tratamentos luminosos de 1 minuto de duração, aplicados após 12, 24, 36 e 48 horas de embebição no escuro.

A - Comparação entre tratamentos luminosos aplicados a esporos pré-embebidos em vapor de água e esporos secos de *Cyathea delgadii*.

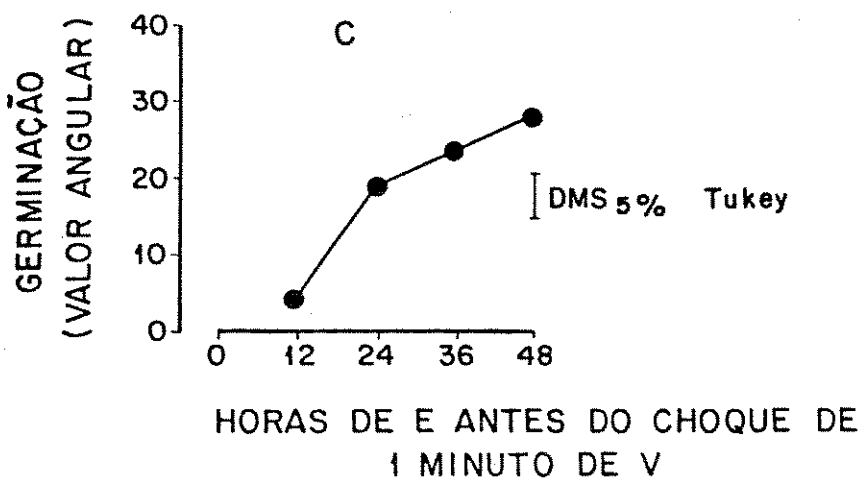
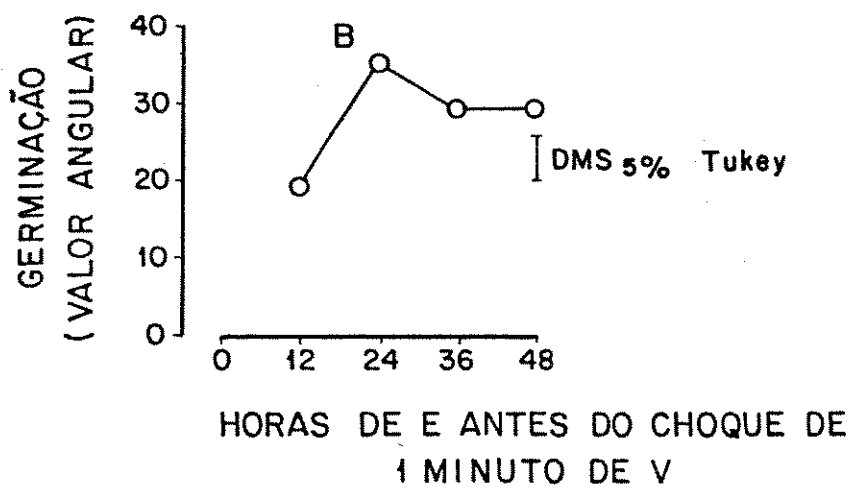
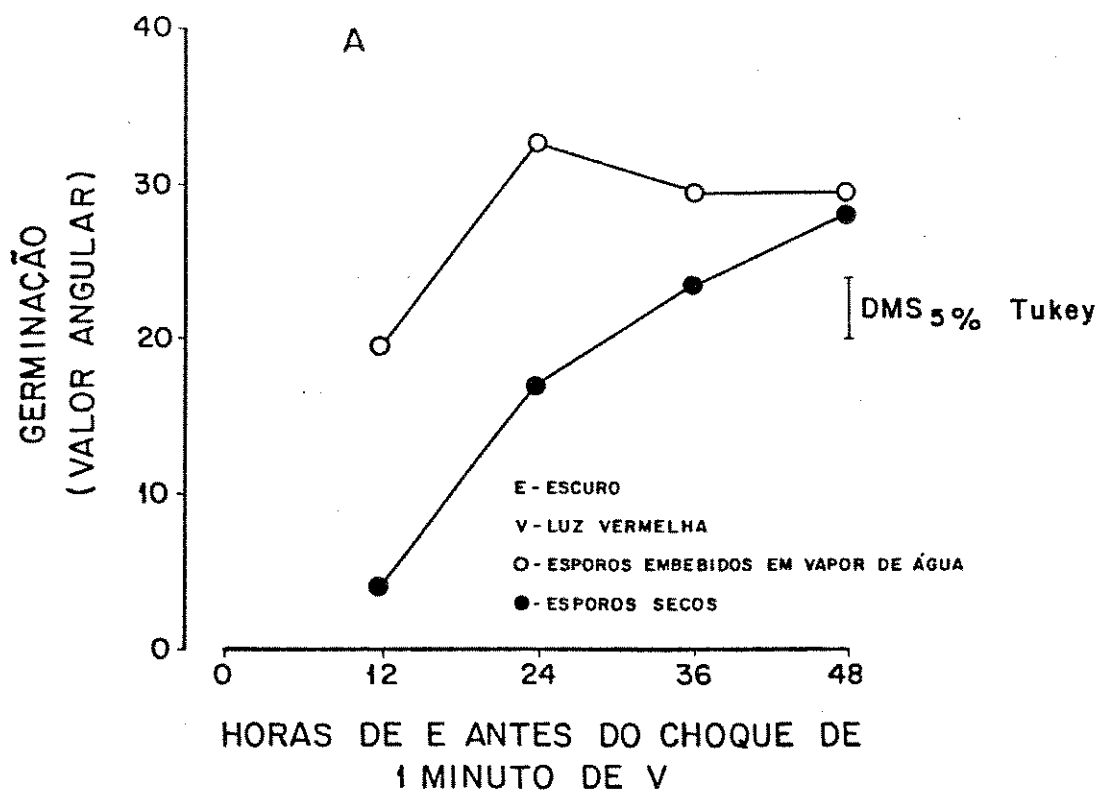
B - Tratamentos luminosos aplicados a esporos pré-embebidos.

C - Tratamentos luminosos aplicados a esporos secos.

LV - Fonte c.

OBS.: No escuro constante não ocorreu germinação para esporos secos ou embebidos em vapor de água.

FIGURA 18



prē-embéidos e a Figura 18C apenas para esporos secos. Para esporos prē-embéidos, a maior resposta de germinação foi obtida após 24 horas de embéição no escuro e para esporos secos após 48 horas (neste caso igual a 36 horas).

Na Figura 19 estão representados resultados de um experimento onde esporos prē-embéidos em vapor de água receberam tratamento luminoso de um minuto de duração após 24, 48, 72 e 96 horas de embéição no escuro. Os mesmos tratamentos foram realizados para esporos secos. A Figura 19A compara respostas de esporos prē-embéidos com esporos secos. Confirmando os resultados obtidos na figura 18, observa-se que as maiores promoções de germinação foram obtidas para esporos prē-embéidos que receberam tratamento luminoso após 24 horas de embéição no escuro e para esporos secos que receberam tratamentos luminosos após 48 horas de embéição no escuro. Os valores de germinação foram estatisticamente iguais para esporos prē-embéidos e esporos secos, após 48 horas de embéição no escuro. Após 72 e 96 horas de embéição no escuro, houve redução da germinação, tanto para esporos prē-embéidos quanto para esporos secos. Entretanto, a diminuição na resposta de germinação, foi estatisticamente maior para esporos prē-embéidos. A Figura 19B mostra o efeito dos tratamentos luminosos em esporos prē-embéidos, mostrando que a resposta de germinação para esporos que receberam tratamento luminoso após 24 horas de embéição no escuro foi maior do que após 48, 72 e 96 horas, sendo que a diminuição da germinação foi gradual. A Figura 19C compara o efeito de tratamentos luminosos para esporos secos, confirmando o que já havia sido demonstrado anteriormente, ou seja, que o melhor período de prē-indu-

FIGURA 19 - Tratamentos luminosos de 1 minuto de duração, aplicados após 24, 48, 72 e 96 horas de embébição no escuro.

A - Comparação entre tratamentos luminosos aplicados a esporos pré-embebidos em vapor de água e esporos secos de *Cyathea delgadii*.

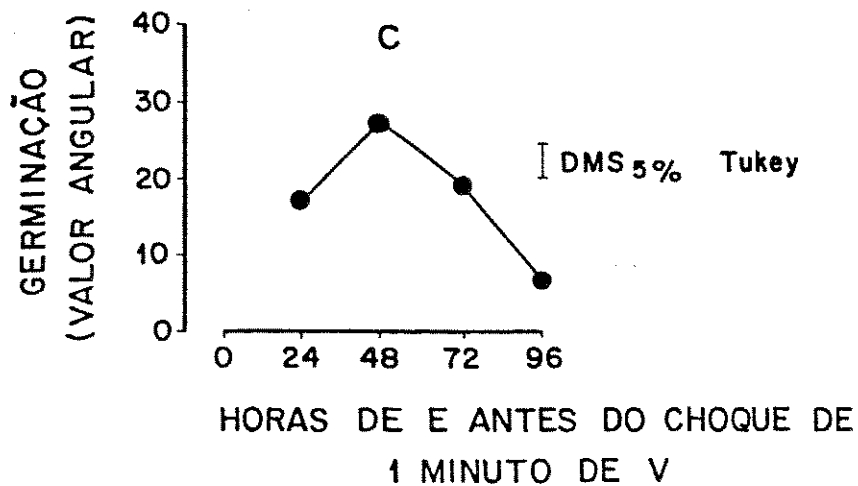
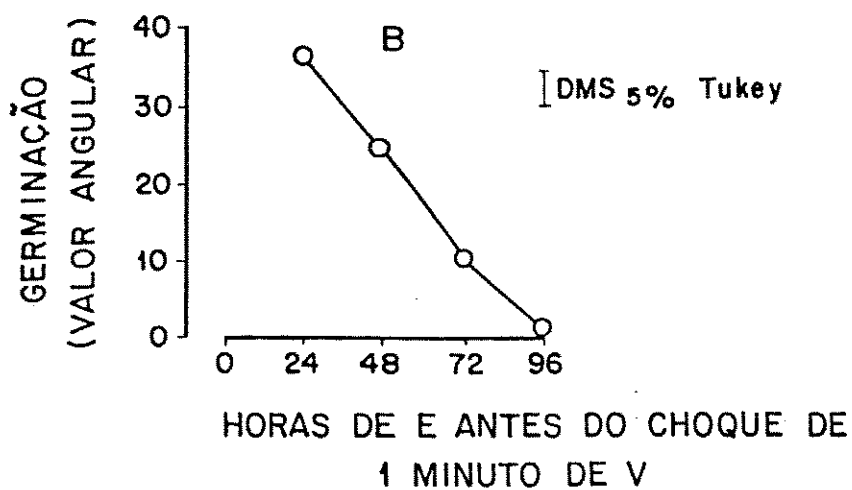
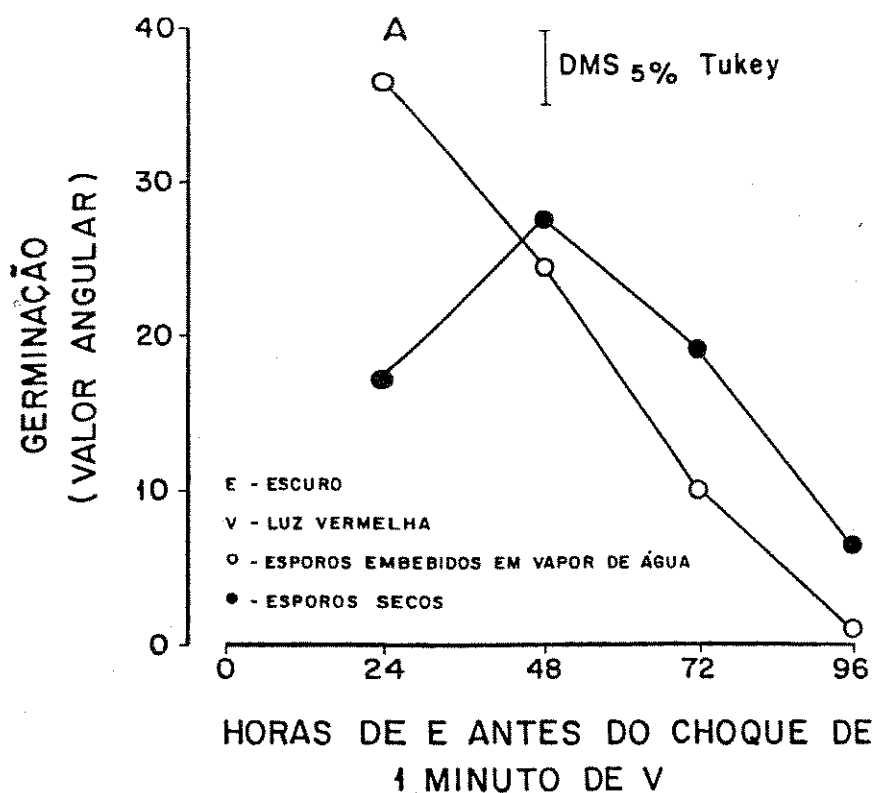
B - Tratamentos luminosos aplicados a esporos pré-embebidos.

C - Tratamentos luminosos aplicados a esporos secos.

LV - Fonte c.

OBS.: No escuro constante não ocorreu germinação para esporos secos ou embebidos em vapor de água.

FIGURA 19



ção, é o de 48 horas de embebição no escuro.

A Figura 20 representa os resultados de um experimento onde se comparou o efeito de tratamentos únicos e tratamentos diários de luz vermelha de 1 minuto de duração, após 24 horas de embebição no escuro, para esporos secos e esporos pré-embebidos. Na Figura 20A, comparam-se resultados de esporos pré-embebidos com resultados de esporos secos. A barra a mostra os resultados do efeito de tratamento único para esporos pré-embebidos e para esporos secos. A germinação foi muito maior para esporos pré-embebidos, confirmando os resultados apresentados nas figuras 18 e 19. Na barra b, estão os resultados para esporos pré-embebidos e esporos secos, que receberam tratamentos luminosos diários, intercalados por períodos de 24 horas de escuro. Também nesse caso, esporos pré-embebidos atingem germinação estatisticamente maior que esporos secos, mas menor que a do controle sob luz constante. A Figura 20B compara os resultados de tratamentos únicos (barra a) ou diários (barra b) para esporos secos, verificando-se que tratamentos diários causam uma grande promoção da germinação, mas que não atinge os valores de germinação sob luz contínua. Na Figura 20C encontram-se os resultados de tratamentos luminosos únicos (barra a) ou diários (barra b) para esporos pré-embebidos em vapor de água. Observa-se que tratamentos diários causam promoção de germinação que não atinge os valores de luz contínua, como mostra a Figura 20A.

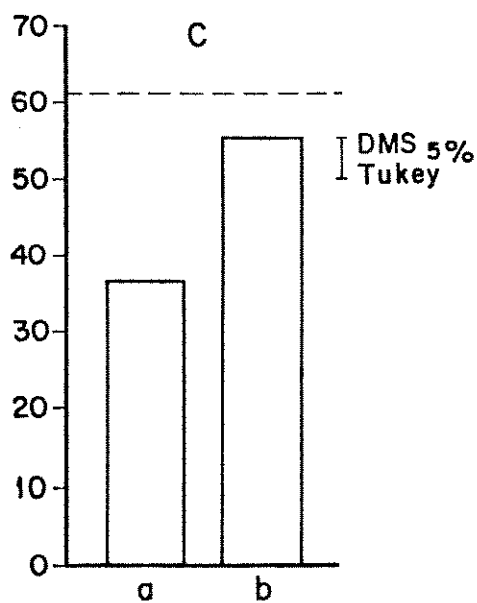
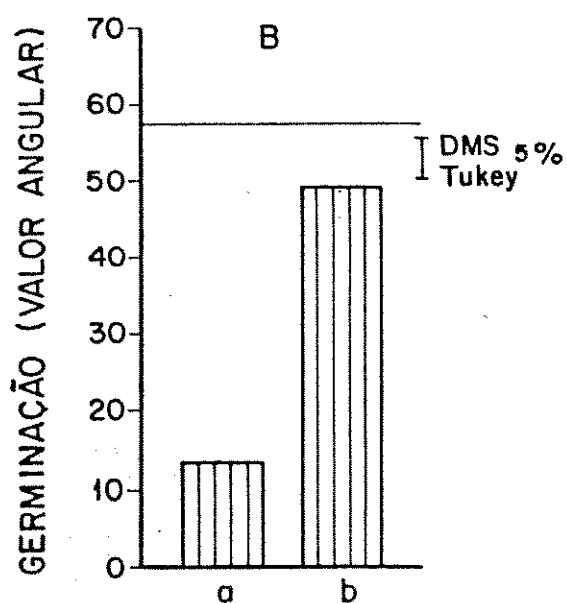
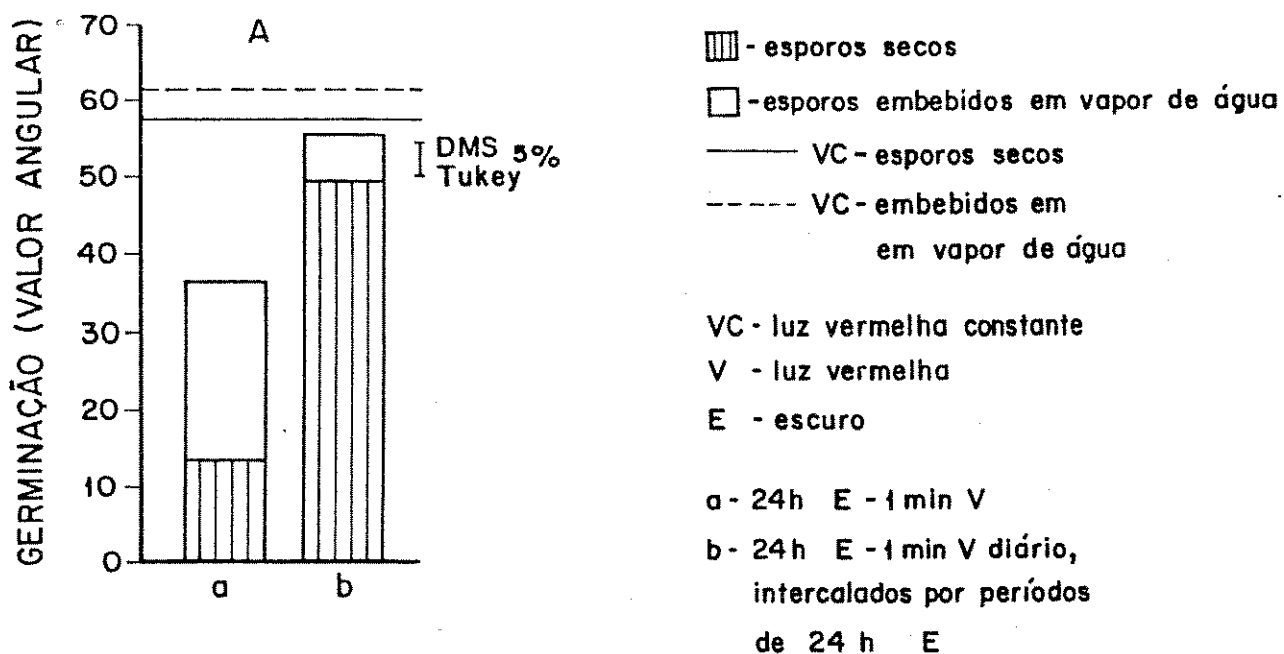
Nos experimentos da Figura 21 esporos secos e esporos pré-embebidos receberam tratamentos luminosos únicos de 1 minuto de duração, após 24 e 48 horas de pré-indução, ou

FIGURA 20 - Tratamentos luminosos de 1 minuto de duração, únicos e diários, aplicados após 24 horas de embebição no escuro.

- A - Comparação entre tratamentos luminosos para esporos pré-embebidos em vapor de água e esporos secos de *Cyathea delgadii*.
- B - Tratamentos luminosos aplicados a esporos secos.
- C - Tratamentos luminosos aplicados a esporos pré-embebidos.

LV - Fonte c.

FIGURA 20





tratamentos diários, com início após 48 horas de embebição no escuro. A Figura 21A compara os efeitos de tratamentos luminosos únicos ou diários aplicados a esporos secos ou esporos pré-embebidos. Para esporos secos (barras a, c), o tratamento luminoso único é mais eficiente em promover a germinação quando aplicado após 48 horas de embebição no escuro, como foi observado nas figuras 18 e 19. Para esporos embebidos (barras b, d) o tratamento único é mais eficiente após 24 horas de embebição no escuro. Nesse experimento, o tratamento luminoso aplicado após 48 horas de embebição no escuro, a esporos pré-embebidos, causou resposta menor do que a de esporos secos (barras c, d). O efeito do tratamento luminoso aplicado após 24 horas de embebição no escuro, para esporos pré-embebidos é confirmado nas figuras 18 e 19. As barras e (esporos secos) e f (esporos pré-embebidos) representam tratamentos luminosos diários, com início após 48 horas de embebição no escuro. Nesse caso, observa-se que a maior promoção ocorreu para esporos secos. As figuras 21B e 21C, comparam o efeito dos tratamentos luminosos para esporos secos (21B) e para esporos pré-embebidos (21C), tornando mais evidentes os resultados apresentados na figura 21A.

Na Figura 22 estão os resultados de tratamentos luminosos de longa duração (8 horas) fornecidos após 24 ou 48 horas de embebição no escuro para esporos secos e esporos pré-embebidos. A Figura 22A compara os efeitos de tratamentos luminosos aplicados a esporos secos e esporos pré-embebidos. Na barra a, o tratamento foi aplicado após 24 horas de embebição no escuro. A maior promoção da germinação ocorreu para esporos pré-embebidos, sendo que a respos

FIGURA 21 - Tratamentos luminosos de 1 minuto de duração, únicos, aplicados após 24 ou 48 horas de embebição no escuro; diários, aplicados após 48 horas de embebição no escuro.

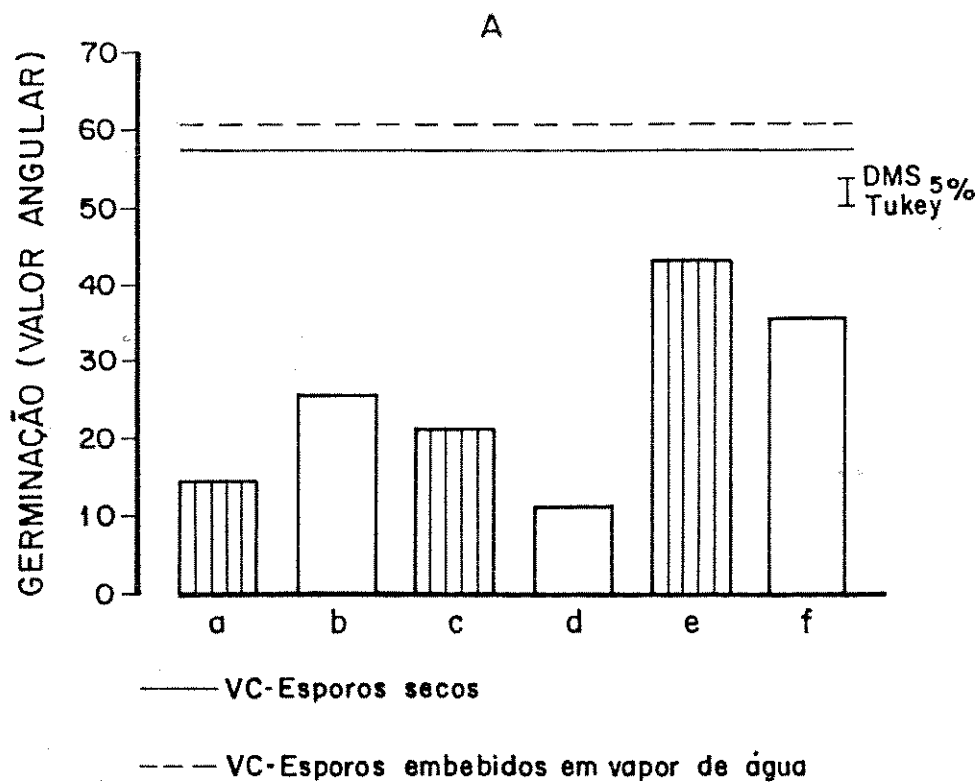
A - Comparação entre tratamentos luminosos para esporos pré-embebidos em vapor de água e esporos secos de *Cyathea delgadii*.

B - Tratamentos luminosos aplicados a esporos secos.

C - Tratamentos luminosos aplicados a esporos pré-embebidos.

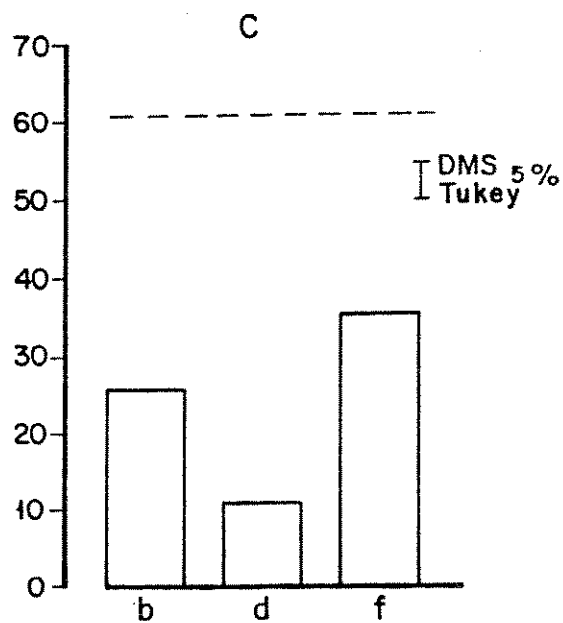
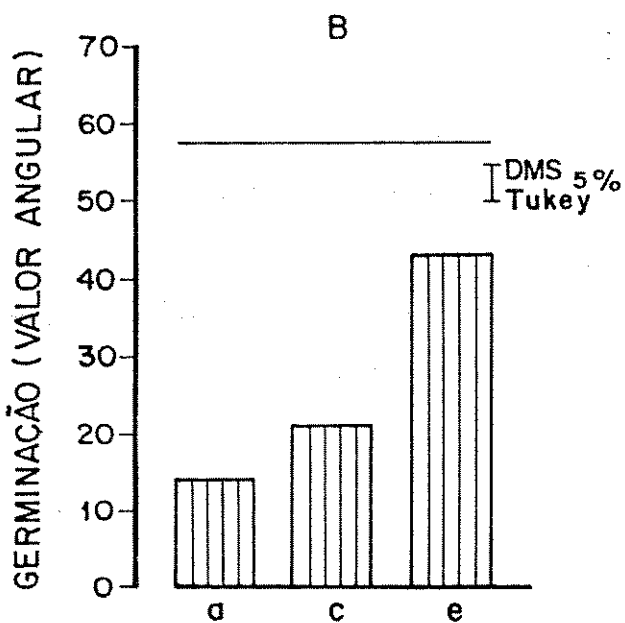
LV - Fonte c.

FIGURA 21



E - escuro  
 V - luz vermelha  
 a, b 24h E - V1 min - E  
 c, d 48h E - V1 min - E  
 e, f 48h E - V1 min diário

▨ - esporos secos  
 □ - esporos embebidos em vapor de água  
 VC - luz vermelha constante



ta de germinação obtida após esse tratamento foi estatisticamente igual à do controle (esporos pré-embebidos sob luz vermelha constante). Houve promoção da germinação de esporos secos, mas esta foi menor do que a de esporos embebidos em vapor de água. Na barra b, os tratamentos luminosos foram aplicados após 48 horas de embebição no escuro. A maior promoção da germinação ainda ocorreu para esporos pré-embebidos, mas houve um aumento da resposta de germinação, para esporos secos. A Figura 22B mostra o efeito dos tratamentos luminosos em esporos pré-embebidos. A promoção da germinação foi igual à do controle de luz contínua quando os tratamentos foram aplicados após 24 ou 48 horas de pré-embebição. Na Figura 22C estão os resultados dos tratamentos luminosos fornecidos a esporos secos. A maior promoção ocorreu quando o tratamento foi aplicado após 48 horas de embebição no escuro, mas a resposta de germinação não atingiu o valor encontrado para o controle de luz contínua.

Os resultados apresentados nas figuras 20, 21 e 22 confirmam as observações de que a pré-embebição não só acelera o período de pré-indução, como também aumenta a fotossensibilidade dos esporos. Respostas de germinação semelhantes às do controle sob luz contínua foram obtidas somente para esporos pré-embebidos que receberam tratamentos luminosos de 8 horas de duração, após 24 ou 48 horas de embebição no escuro. Esporos pré-embebidos que passaram a receber tratamentos diários de 1 minuto de luz vermelha após 48 horas de embebição no escuro, parecem sofrer uma diminuição em sua fotossensibilidade cujo "máximo" parece ocorrer após 24 horas de embebição no escuro.

FIGURA 22 - Tratamentos luminosos de 8 horas de duração, aplicados após 24 ou 48 horas de embebição no escuro.

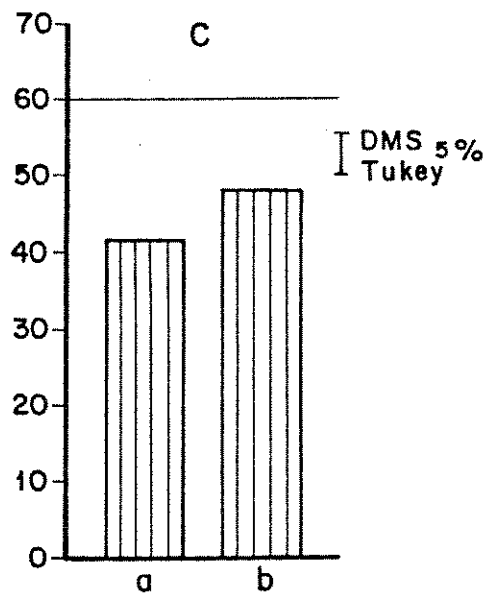
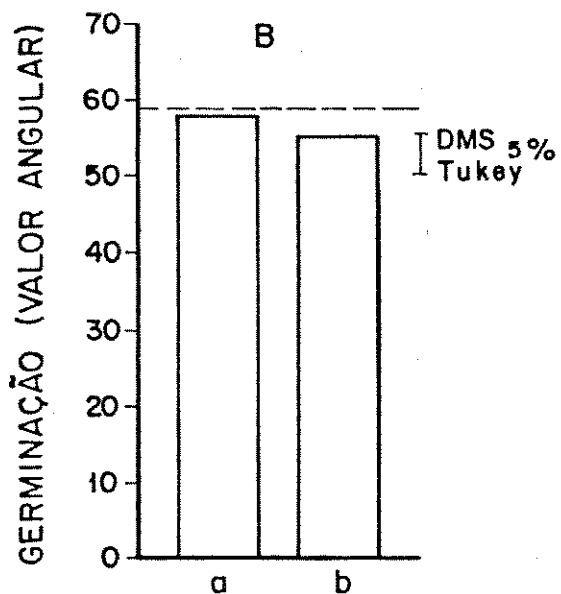
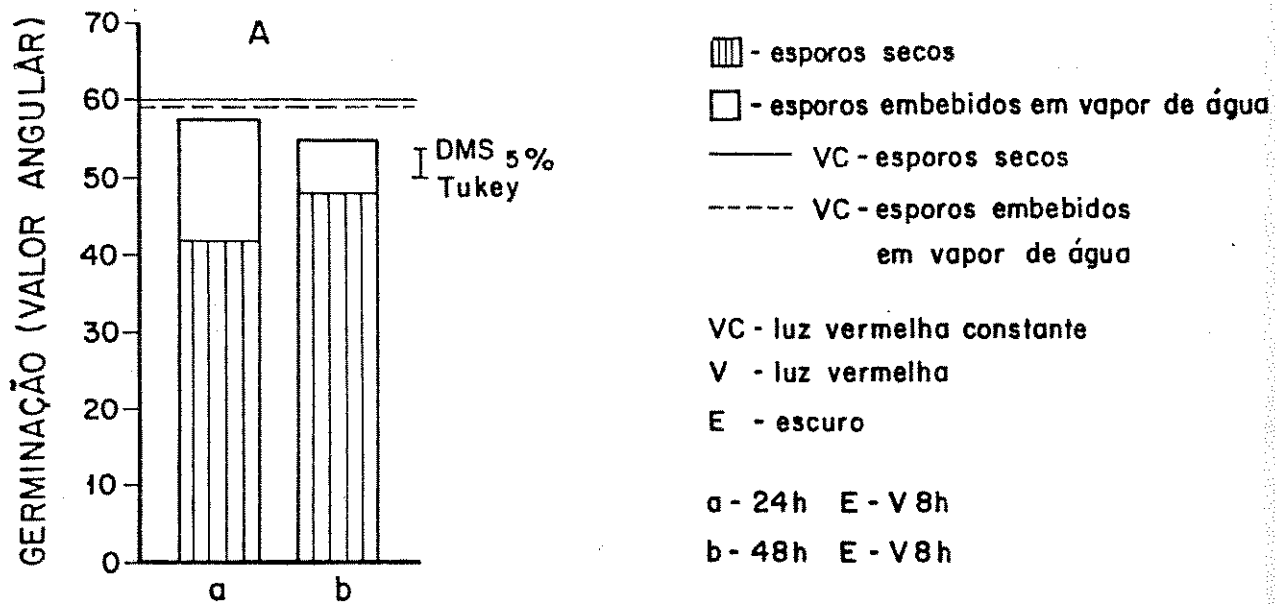
A - Comparação entre tratamentos luminosos para esporos pré-embebidos em vapor de água e esporos secos de *Cyathea delgadii*.

B - Tratamentos luminosos aplicados a esporos pré-embebidos.

C - Tratamentos luminosos aplicados a esporos secos.

LV - Fonte c.

FIGURA 22



### 3. PRÉ-EMBEBIÇÃO EM SOLUÇÃO OSMÔTICA DE POLIETILENOGLICOL

A pré-embebição em solução osmótica de polietilenoglicol (PEG) 6.000, na concentração de 288g/litro foi realizada com o objetivo de se verificar se esse tratamento acelera a germinação de esporos de *Cyathea delgadii*. Portanto, nestes experimentos, as contagens de germinação foram feitas somente até o 7º dia, já que, em geral, a estabilização ocorre nesse período.

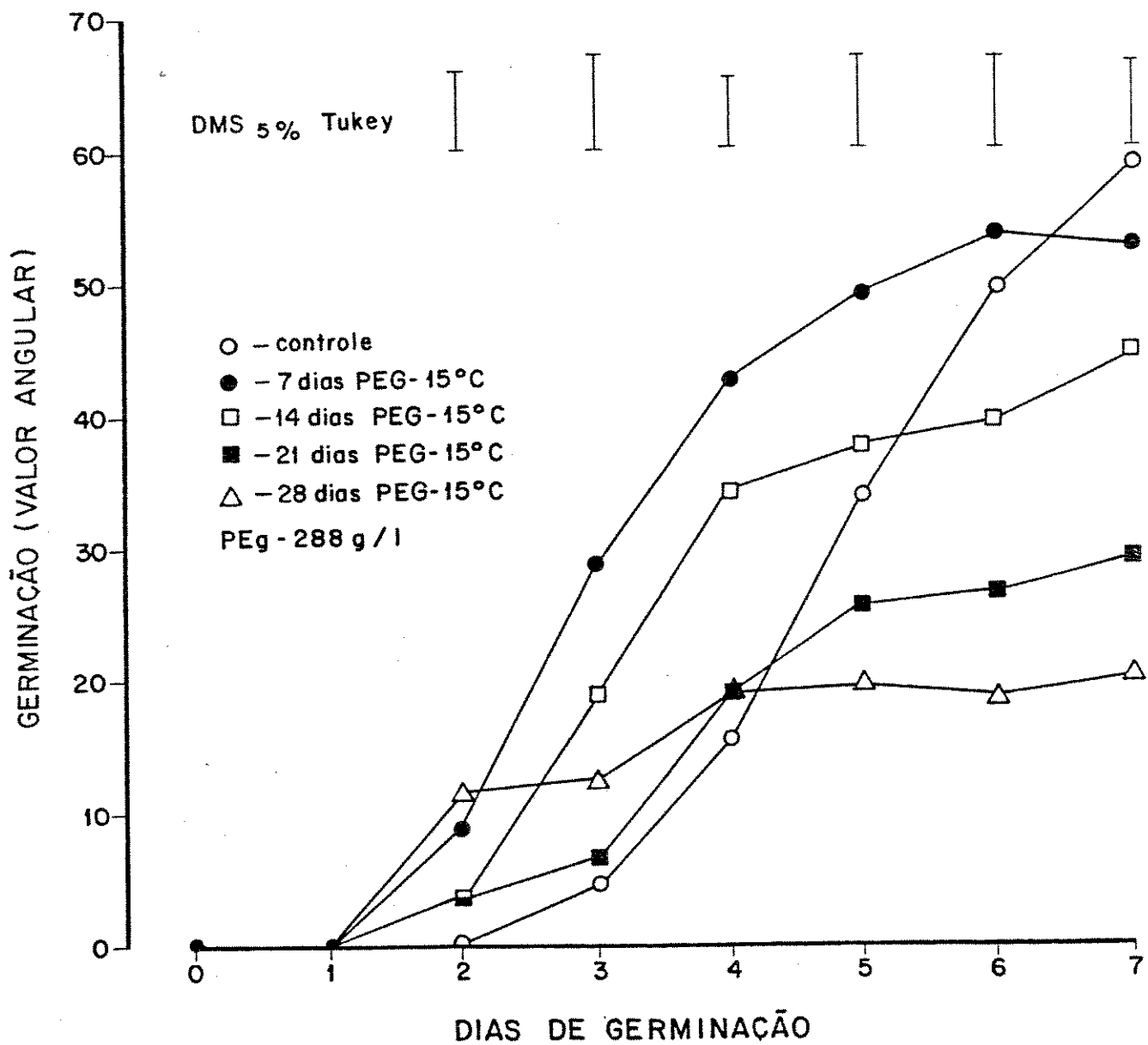
A Figura 23 representa as curvas de germinação para esporos pré-embebidos por 7, 14, 21 e 28 dias em solução de PEG e que a seguir foram transferidos para solução nutritiva sob luz fluorescente branca constante e temperatura de 25°C. Esporos pré-embebidos em solução de PEG, durante uma semana, apresentaram os maiores valores de germinação, do segundo ao quinto dia, em comparação ao controle (esporos não pré-embebidos). No sétimo dia, a germinação foi menor do que a do controle e no sexto dia, os valores foram semelhantes estatisticamente. À medida que se aumentou o período de pré-embebição em solução de PEG, houve uma inibição da germinação, embora nos primeiros dias de embebição, a germinação tenha sido acelerada. Esporos pré-embebidos durante 7 e 28 dias em solução de PEG, apresentaram os maiores valores de germinação, no segundo dia de contagem. Os esporos pré-embebidos por 28 dias apresentaram os valores de germinação mais baixos no 7º dia.

A pré-embebição em solução de polietilenoglicol, por um período de uma semana acelera e sincroniza a germinação

FIGURA 23 - Germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25<sup>o</sup>C, para esporos de *Cyathea delgadii*, pré-embebidos em solução osmótica de polietilenoglicol. PEG 6.000 foi usado na concentração de 288g/litro.



FIGURA 23



de esporos de *Cyathea delgadii*, mas causa uma inibição da porcentagem final de germinação. Períodos mais prolongados de pré-embebição em solução de polietilenoglicol, embora também sincronizem o processo, parecem causar danos aos esporos, visto que causam redução nas porcentagens finais de germinação, além de ocorrer grande incidência de fungos nesse material.

#### 4. EFEITO DE 3-4 DICLOROFENILDIMETILURÉIA

O DCMU foi usado com o objetivo de verificar se a fotossíntese influencia a germinação de esporos de *Cyathea delgadii*.

A Tabela 17 mostra os resultados de um experimento onde o efeito de DCMU nas concentrações  $10^{-3}$ M,  $10^{-4}$ M e  $10^{-5}$ M foi testado sobre a germinação de esporos de *Cyathea delgadii*. DCMU na concentração de  $10^{-3}$ M inibiu completamente a germinação de esporos, sob luz contínua. Concentração de  $10^{-4}$ M causou inibição parcial e não houve inibição quando se utilizou a concentração de  $10^{-5}$ M, sendo que os gametófitos se apresentaram semelhantes aos do controle, ou seja, a célula protonemal apresentou cloroplastos.

#### 5. PESO SECO E PESO FRESCO

A Tabela 18 mostra o peso fresco e seco de esporos secos (dia zero) de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação. A amostra inicial continha 50 mg de esporos. Não houve alteração no peso fresco entre os dias ze

TABELA 17 - Efeito de DCMU, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii* sob luz fluorescente branca constante, a 25°C

	Germinação Valor angular
Controle	54,91 c
DCMU 10 <sup>-5</sup> M	51,67 c
DCMU 10 <sup>-4</sup> M	18,63 b
DCMU 10 <sup>-3</sup> M	0,0 a
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	5,54

TABELA 18 - Peso fresco e peso seco de esporos secos (dia zero) de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca contínua, a 25°C.

Dias de germinação	Peso fresco mg	Peso seco mg
0	50,0 a	47,23 a
7	49,0 a	28,37 b
14	61,96b	30,32 b
DMS <sub>5%</sub> (Tukey)	5,06	4,03

ro e sete, mas houve uma grande diminuição no peso seco, neste período. Houve aumento de peso fresco entre o sétimo e o décimo quarto dia, período em que grande parte dos esporos germinaram e que tem início o desenvolvimento do gametófito. Não houve diferença entre os pesos secos de material com 7 dias e com 14 dias.

## 6. EXTRAÇÕES E DOSAGENS

Foram feitas extrações e dosagens de lipídios livres, clorofila, proteínas solúveis, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e amido para esporos secos (dia zero) e após 7 e 14 dias de embebição para a germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25°C.

### - Lipídios

A Figura 24 representa o conteúdo de lipídios livres para esporos secos (dia zero) e após 7 e 14 dias de germinação. A ordenada da esquerda representa os valores de dosagens em mg/100 mg de esporos (peso inicial); a da direita representa a germinação em valor angular e a abscissa, os dias de germinação. Aproximadamente metade dos lipídios livres foi consumida durante os primeiros 7 dias de germinação. Os valores obtidos para os dias 7 e 14 foram iguais estatisticamente.

A Tabela 19 mostra a relação entre conteúdo de lipídio e pesos fresco e seco (Tabela 18) para esporos secos, e após 7 e 14 dias de germinação. Observa-se que o conteúdo

FIGURA 24

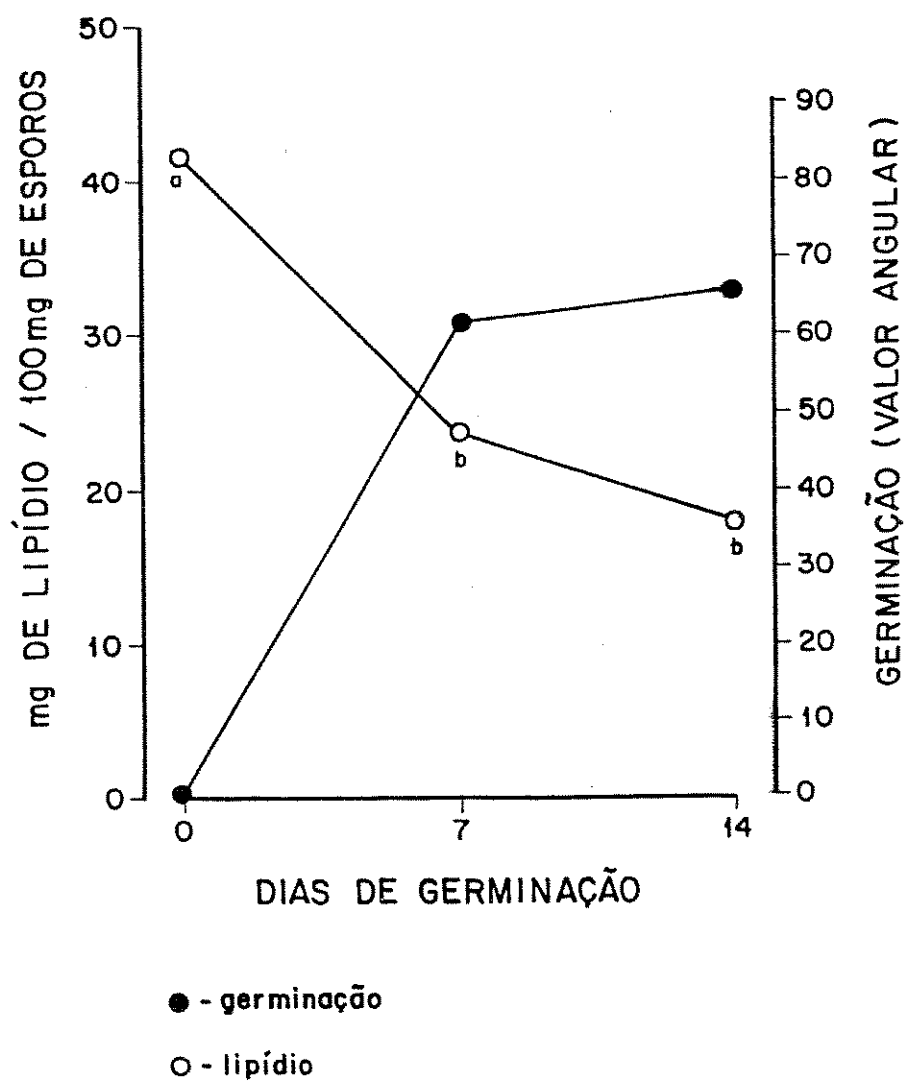


FIGURA 24 - Conteúdo de lipídios livres em esporos secos (dia zero) de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25°C.

TABELA 19 - Relação entre conteúdo de lipídio e pesos fresco e seco (dados da tabela 18) em esporos secos de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca contínua, a 25°C

PF - peso fresco

PS - peso seco

Dias de germinação	mg lipídio/mg PF	mg lipídio/mg PS
0	0,43	0,46
7	0,28	0,48
14	0,14	0,30

do de lipídio diminuiu durante os 14 dias, em relação ao peso fresco. Manteve-se constante do dia 0 ao dia 7, em relação ao peso seco e diminuiu no dia 14.

O espectro de transmissão de luz do óleo bruto de esporos secos, na faixa da luz visível (400 a 800 nm) foi feito (Figura 25) e comparado ao espectro de transmissão do óleo bruto de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*) (Figura 26) com o objetivo de se verificar se havia muita diferença no padrão de transmissão de óleos diferentes, extraídos por métodos semelhantes. O óleo de esporos (Figura 25) absorveu totalmente a luz azul, sendo que ocorreu aumento de transmissão da luz verde e vermelha, havendo uma queda a 660 nm e novamente aumentando a 680 nm. As porcentagens de transmitância foram baixas para luz vermelha (máximo em torno de 13%) e vermelho extremo (máximo em torno de 30%), em relação às sementes de algodão, cujo óleo bruto (Figura 26) também absorveu completamente a luz azul e houve aumento gradativo da transmitância à medida que o comprimento de onda aumentou. As porcentagens máximas de transmitância ocorreram para vermelho extremo (ao redor de 72%).

A Figura 27 é o gráfico de cromatografia gasosa dos ácidos graxos componentes do óleo de esporos secos de *Cyathia delgadii*, tendo como padrão o tempo de retenção do ácido oléico. Foram observados 9 picos. Os cálculos das porcentagens de cada ácido presente no óleo de esporos estão na Tabela 20. O ácido oléico (46,87%) é o principal constituinte, seguido do ácido palmítico (27,5%), e do ácido linoléico (20,71%). Ácidos palmitoléico, esteárico, linolênico, ficosenóico e beênico ocorrem em pequenas quantidades, além de um ácido graxo não identificado pelo tempo



FIGURA 25

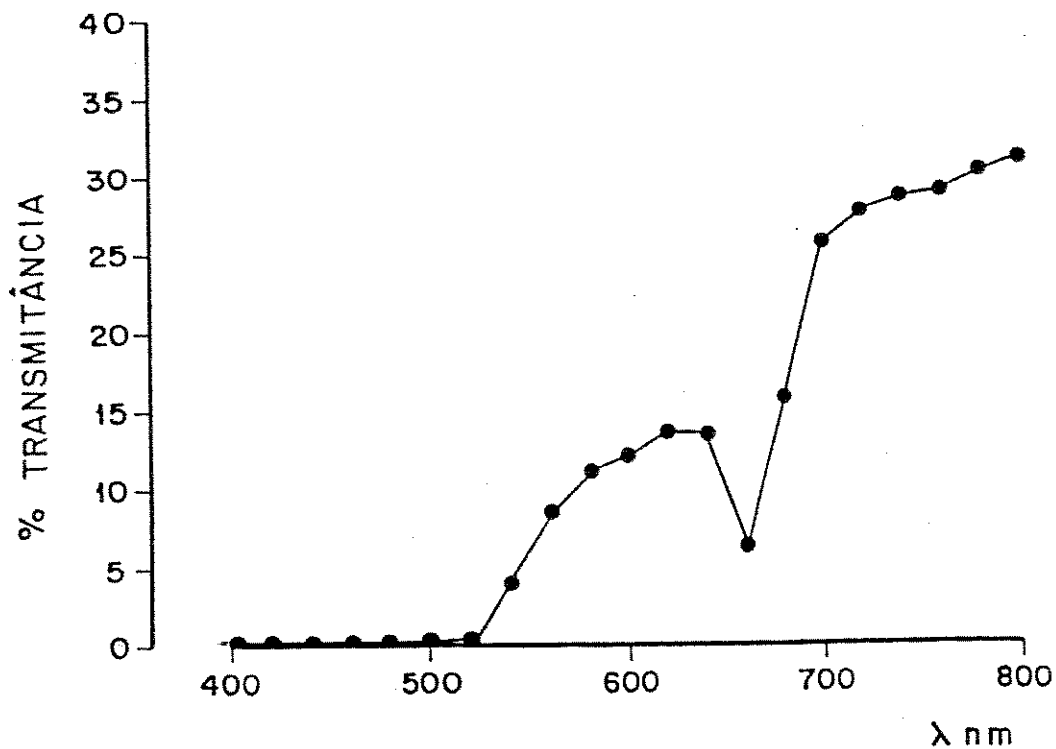


FIGURA 25 - Espectro de transmissão de luz do óleo de esporos secos na faixa da luz visível (400 a 800 nm).

FIGURA 26

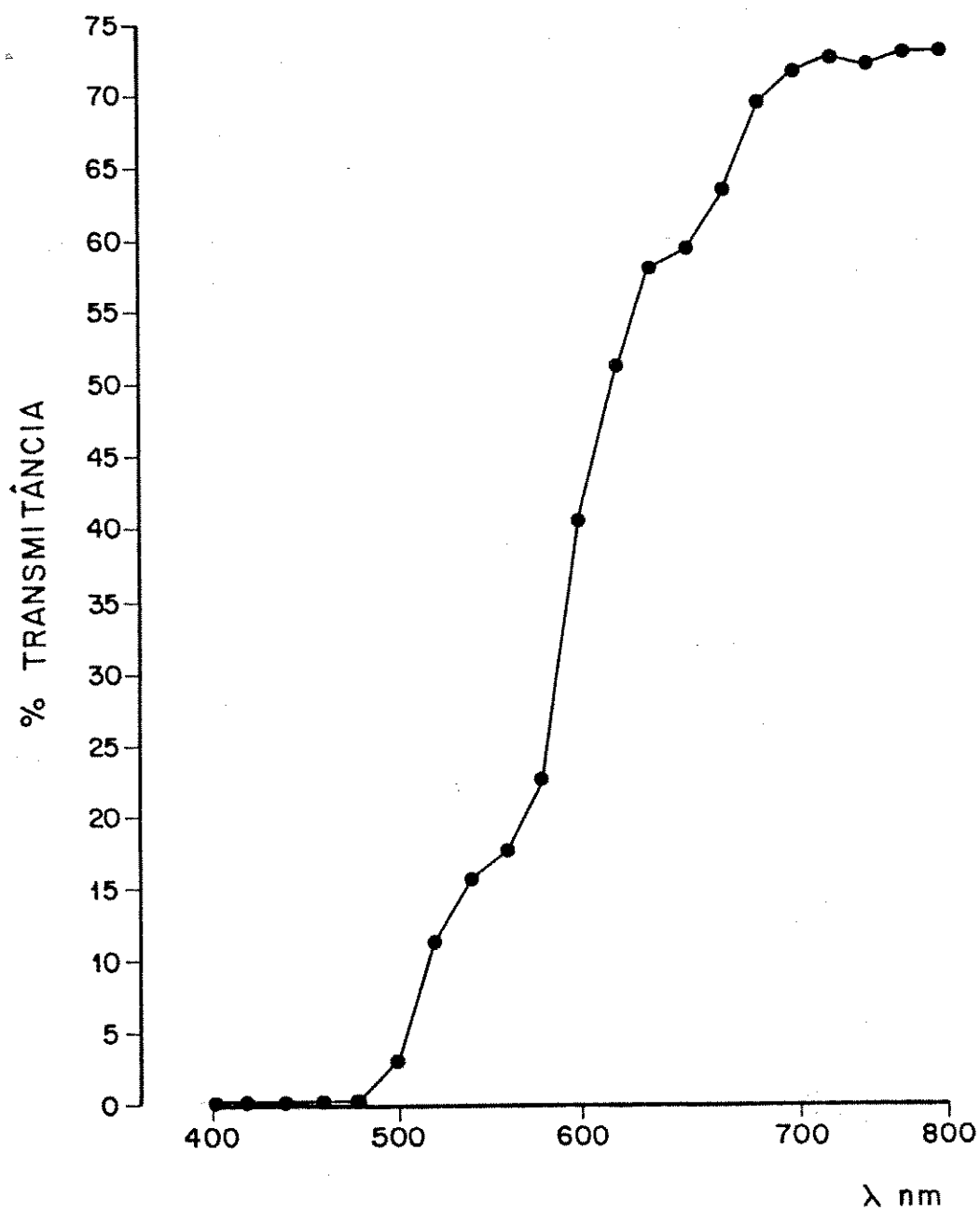


FIGURA 26 - Espectro de transmissão de luz do óleo de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*) na faixa da luz visível (400 a 800 nm).

FIGURA 27 - Cromatografia gasosa dos ácidos graxos componentes do óleo de esporos secos de *Cyathea delgadii*.  
Padrão: tempo de retenção do ácido oléico.  
As setas indicam picos que são mostrados na tabela 20.

FIGURA 27

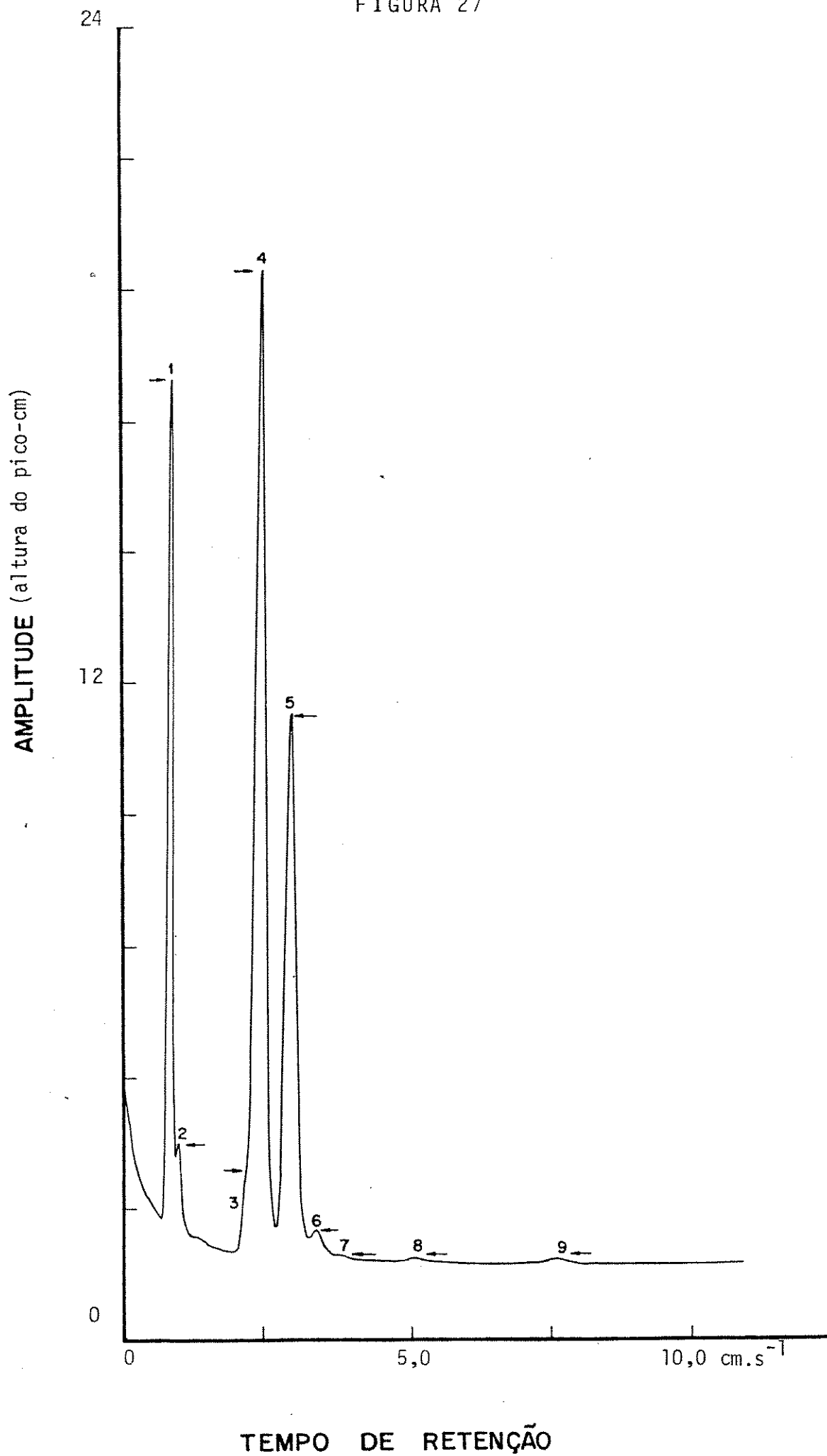


TABELA 20 - Composição de ácidos graxos de óleo de esporos secos de *Cyathea delgadii*.

Padrão: tempo de retenção do ácido oléico.

Pico	Ácido graxo		% do Total
1	Palmitico	16:0	27,5
2	Palmitoléico	16:1	2,2
3	Esteárico	18:0	1,3
4	Oléico	18:1	46,87
5	Linoléico	18:2	20,71
6	Não identificado		0,89
7	Linolênico	18:3	traços
8	Ficosenóico	20:1	0,22
9	Beênico	22:0	0,22

de retenção.

- Clorofila

A Figura 28 representa os espectros de absorção de luz (400 a 700 nm) para a fração éter (Figura 28A) e fração acetona 80% (Figura 28B), extraídas de esporos secos. As figuras indicam que não há clorofila nesses esporos, pois não foram detectados picos de absorção na faixa de luz vermelha.

O pico de absorção que ocorreu na fração éter pode ser resultante da extração de outros pigmentos, como carotenóides, que são removidos juntamente com lipídios livres.

Na Figura 29 estão representados os valores de clorofila para esporos secos e após 7 e 14 dias de germinação. A ordenada da esquerda representa os valores de clorofila em mg/100 mg de esporos (peso inicial). Após 7 dias de germinação, o conteúdo de clorofila foi de 301  $\mu$ g/100 mg de esporos e após 14 dias, foi de 1,65 mg/100 mg de esporos. Observa-se um grande aumento no conteúdo de clorofila, entre os dias 7 e 14. Nessa fase, a maior parte dos esporos já germinou e ocorre desenvolvimento dos gametófitos jovens.

A Tabela 21 mostra que o conteúdo de clorofila aumenta no decorrer da germinação tanto em relação ao peso fresco como ao peso seco. O aumento foi proporcionalmente maior em relação ao peso seco.

FIGURA 28

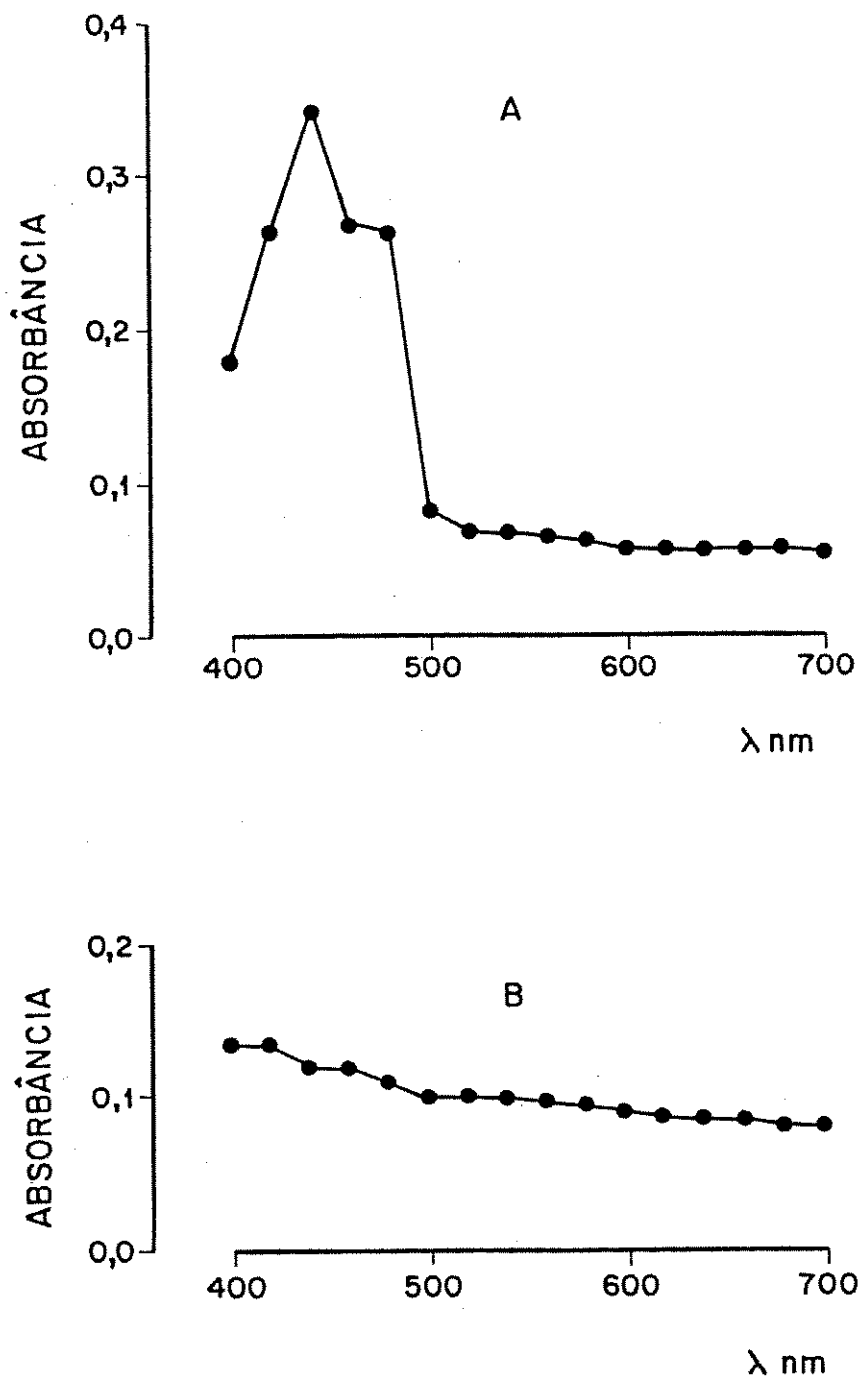


FIGURA 28 - Espectros de absorção de luz de extratos de esporos secos de *Cyathea delgadii*.  
A - Fração éter dietílico  
B - Fração acetona 80%

FIGURA 29

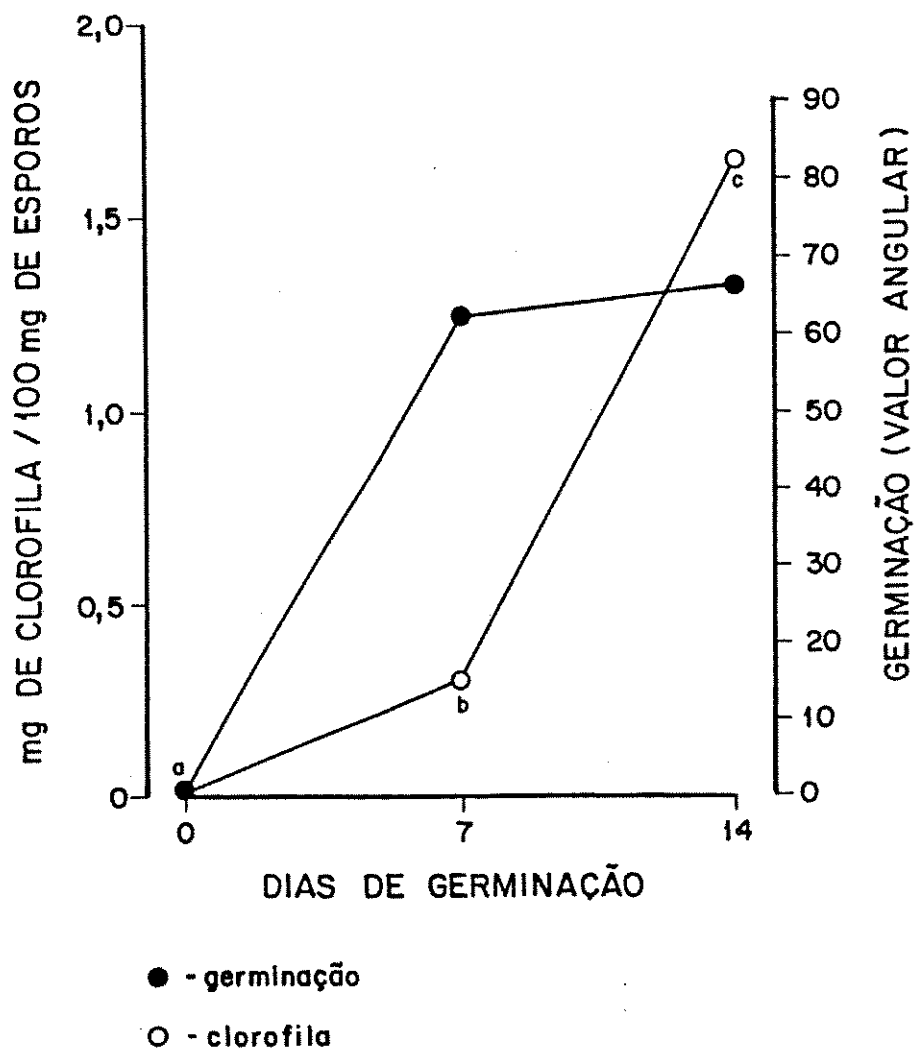


FIGURA 29 - Conteúdo de clorofila em esporos secos de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25°C.



TABELA 21 - Relação entre conteúdo de clorofila e pesos fresco e seco (dados da tabela 18) em esporos secos de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca contínua, a 25°C.

PF - peso fresco

PS - peso seco

Dias de germinação	µg clorofila/mg PF	µg clorofila/mg PS
0	0	0
7	3,0	5,3
14	13,0	27,0

### - Proteínas Solúveis

A Figura 30 representa os valores de proteínas solúveis para esporos secos e após 7 e 14 dias. A ordenada da esquerda mostra o conteúdo de proteínas em mg/100 mg de esporos (peso inicial). Esporos apresentaram um conteúdo de 1,20 mg de proteínas em 100 mg de esporos. No sétimo dia, o conteúdo de proteínas solúveis aumentou para 3,07 mg/100 mg de esporos e no décimo quarto dia para 5,95 mg/100 mg de esporos. Esses valores foram estatisticamente diferentes.

Observa-se que ocorre síntese de proteínas durante a germinação de esporos de *Cyathea delgadii*.

A Tabela 22 mostra a relação entre o conteúdo de proteína e pesos fresco e seco (ver tabela 18) em esporos secos e após 7 e 14 dias de germinação. Observa-se que o conteúdo de proteína aumentou tanto em relação ao peso fresco quanto em relação ao peso seco. O aumento de proteínas durante a germinação foi proporcionalmente maior em relação ao peso seco.

### - Açúcares e Polissacarídeos Solúveis

O conteúdo de açúcares e polissacarídeos solúveis em esporos secos e após 7 e 14 dias de germinação é mostrado na Figura 31. Na ordenada da esquerda estão representados os valores de açúcares solúveis totais em mg/100 mg de esporos (peso inicial). O conteúdo de açúcares solúveis totais de esporos secos foi de 1,84 mg/100 mg de esporos. No sétimo dia, o conteúdo encontrado foi de 1,65 mg/100 mg de espo-

FIGURA 30

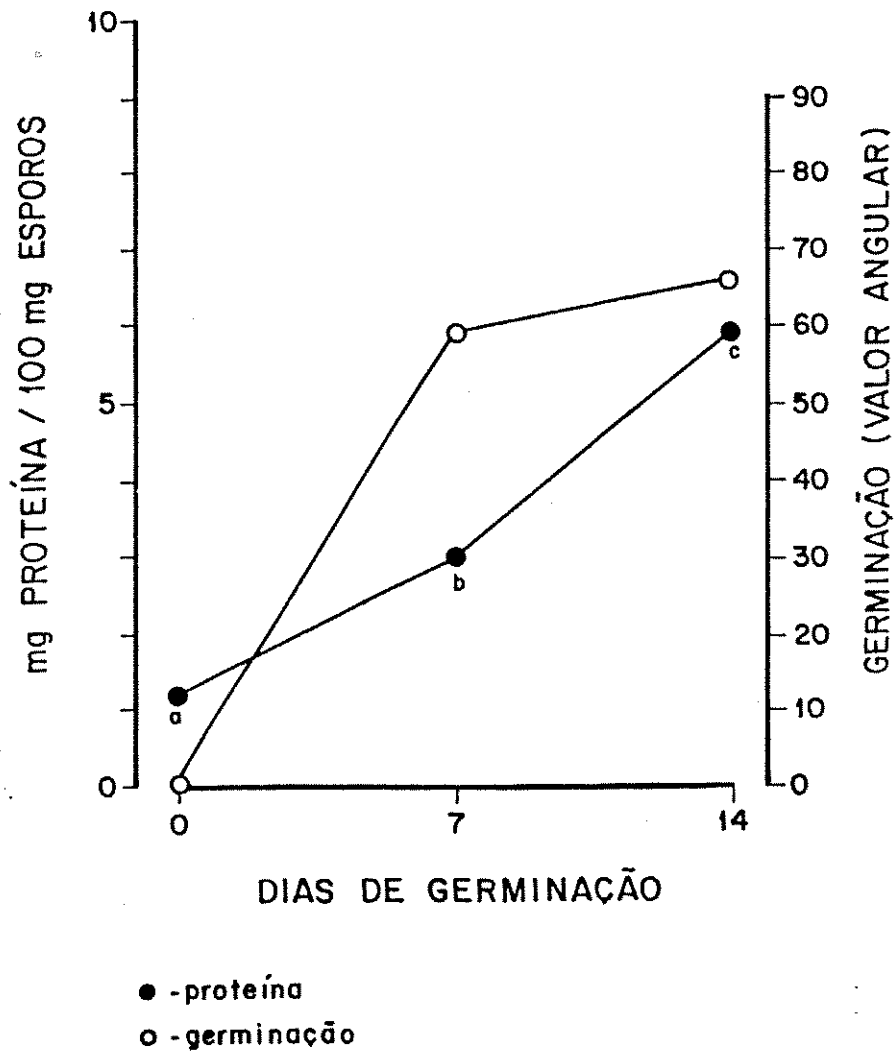


FIGURA 30 - Conteúdo de proteínas solúveis, em esporos secos de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25°C.

TABELA 22 - Relação entre conteúdo de proteína e pesos fresco e seco (dados da tabela 18) em esporos secos de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação, sob luz fluorescente branca contínua, a 25°C.

PF - peso fresco

PS - peso seco

Dias de germinação	$\mu\text{g}$ proteína/ mg PF	$\mu\text{g}$ proteína mg PS
0	12,0	12,0
7	31,0	54,0
14	48,0	98,0

ros. Os valores encontrados nos dias 0 e 7 foram diferentes estatisticamente, indicando que houve redução no conteúdo de açúcares solúveis totais durante a germinação de esporos de *Cyathea delgadii*. No décimo quarto dia, o valor encontrado foi de 8,0 mg/100 mg de esporos, mostrando que houve aumento no conteúdo de açúcares solúveis totais entre o 7º e o 14º dia.

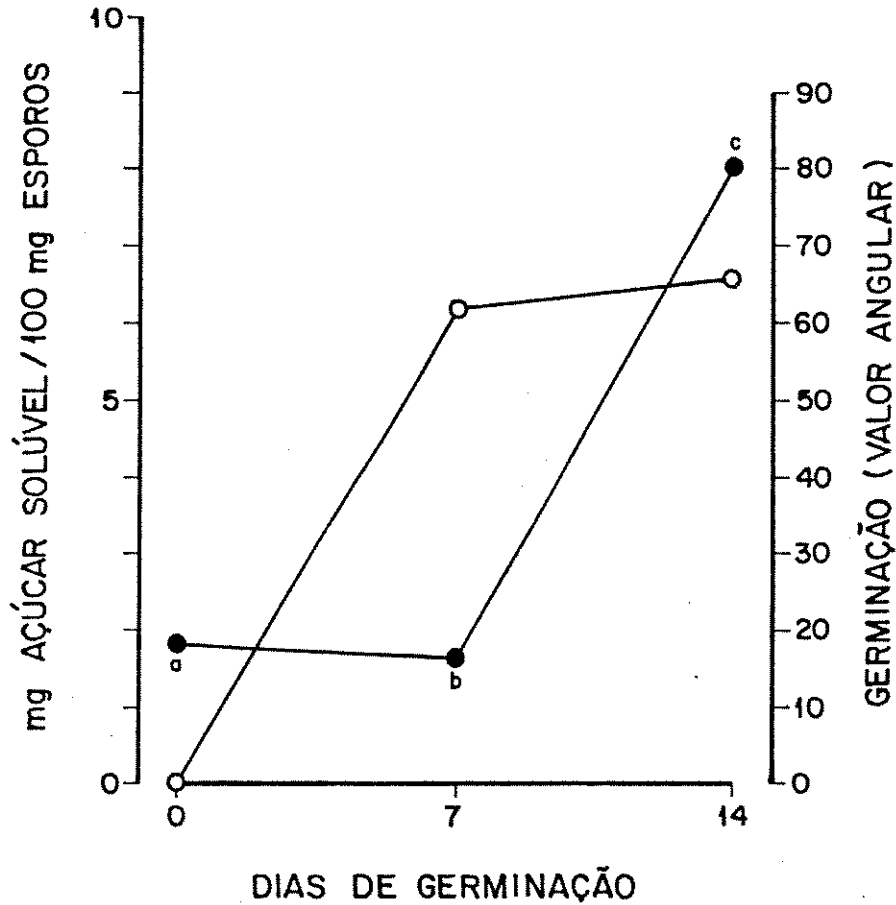
Na Tabela 23 está a relação entre conteúdo de açúcares e polissacarídeos solúveis e pesos fresco e seco (Tabela 18), em esporos secos e após 7 e 14 dias de germinação. O conteúdo de açúcares e polissacarídeos solúveis diminuiu no dia 7, em relação ao peso fresco. Ocorre aumento de açúcares solúveis totais, durante os 14 dias, em relação ao peso seco.

#### - Açúcares Redutores

A Figura 32 mostra o conteúdo de açúcares redutores presente em esporos secos e após 7 e 14 dias de germinação. Na ordenada da esquerda estão os valores de açúcares redutores em  $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$  de esporos (peso inicial). Em esporos secos foram encontradas 162,60  $\mu\text{g}$  de açúcares redutores em 100 mg de esporos. Após 7 dias de germinação, o valor encontrado foi de 245,20  $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$  de esporos e após 14 dias, 634,20  $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$  de esporos. Os três valores são diferentes estatisticamente, indicando que houve um aumento no conteúdo de açúcares redutores nesse período.

A Tabela 24 mostra a relação entre o conteúdo de açúcares redutores e os pesos fresco e seco (Tabela 18), em esporos secos e após 7 e 14 dias de germinação. Observa-se

FIGURA 31



- - açúcares e polissacarídeos solúveis
- - germinação

FIGURA 31 - Conteúdo de açúcares e polissacarídeos solúveis (fração MCW e fração etanol 10%), em esporos secos de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25°C.

Fração MCW - açúcares solúveis  
Fração etanol 10% - polissacarídeos solúveis

TABELA 23 - Relação entre conteúdo de açúcares e polissacarídeos solúveis e pesos fresco e seco (dados da tabela 18), em esporos secos de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca contínua, a 25°C.

PF - peso fresco

PS - peso seco

Dias de germinação	$\mu\text{g}$ açúcares solúveis/ mg PF	$\mu\text{g}$ açúcares solúveis/ mg PS
0	18	19
7	16	28
14	64	130

FIGURA 32

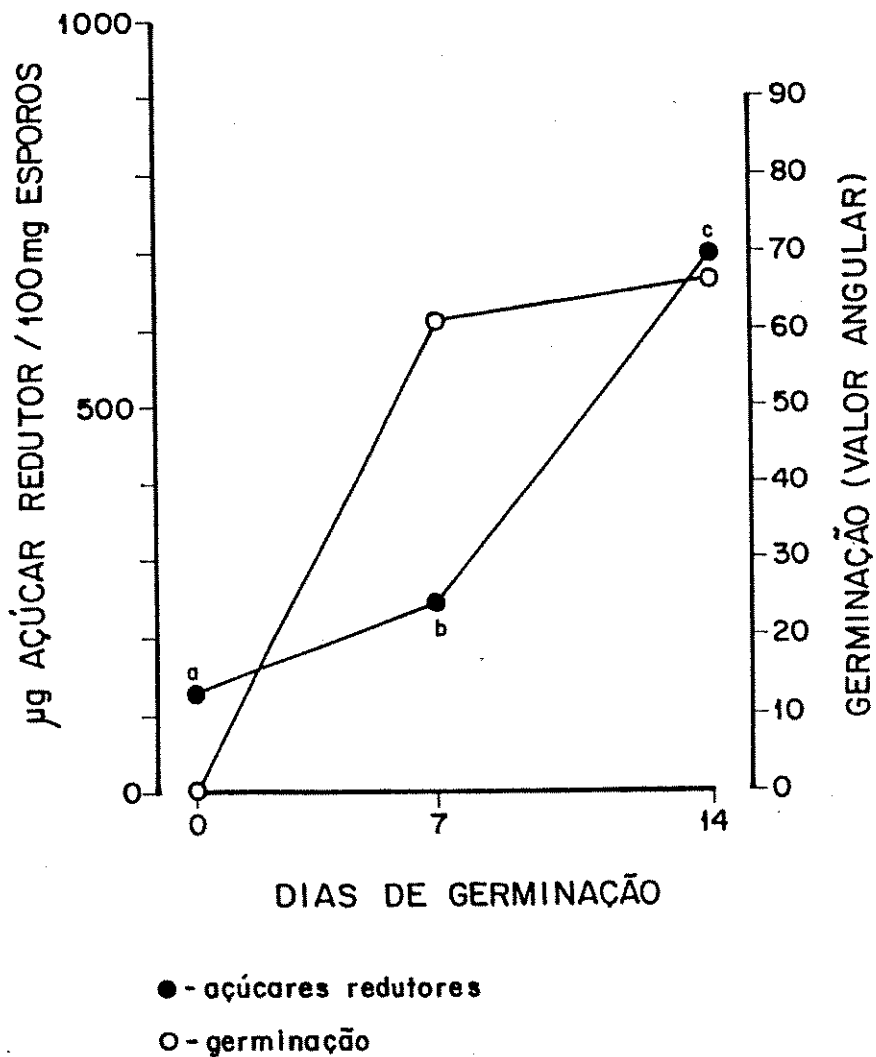


FIGURA 32 - Conteúdo de açúcares redutores (fração MCW e fração etanol 10%) em esporos secos de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25°C.



TABELA 24 - Relação entre conteúdo de açúcares redutores e pesos fresco e seco (dados da tabela 18), em esporos secos de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca contínua, a 25°C.

PF - peso fresco

PS - peso seco

Dias de germinação	$\mu\text{g}$ açúcares redutores / mg PF	$\mu\text{g}$ açúcares redutores / mg PS
0	1,6	1,0
7	2,4	4,0
14	5,2	10,0

que o conteúdo de açúcares redutores aumentou, tanto em relação ao peso fresco, como em relação ao peso seco. Os valores foram proporcionalmente maiores em relação ao peso seco.

- Amido

O conteúdo de amido para esporos secos e após 7 e 14 dias de germinação é mostrado na Figura 33. Na ordenada da esquerda estão representados os valores de amido em mg/100 mg de esporos (peso inicial). Em esporos secos foram encontrados 421 µg de amido em 100 mg de esporos. Após 7 dias de germinação o conteúdo encontrado foi de 567,80 µg e no décimo quarto dia, foi de 5113,80 µg em 100 mg/esporos. Os três valores são estatisticamente diferentes, indicando haver um aumento no conteúdo de amido durante esse período.

A Tabela 25 mostra a relação entre o conteúdo de amido e os pesos fresco e seco (Tabela 18) em esporos secos e após 7 e 14 dias de germinação. Observa-se que o conteúdo de amido aumentou durante esse período, tanto em relação ao peso seco como ao peso fresco.

Em resumo, o peso seco sofre uma redução de 1,66 vezes entre os dias 0 e 7. Embora os conteúdos relativos de lipídio se mantenham constantes nos dias 0 e 7, considerando-se os valores de peso seco, os conteúdos absolutos realmente diminuem no sétimo dia, visto que o peso seco sofre uma redução. Com relação aos açúcares solúveis totais, há um aumento de seu conteúdo, em relação ao peso seco, no dia 7. Em termos absolutos, há uma pequena redução dos açúcares solúveis no sétimo dia, considerando-se a redução do

FIGURA 33

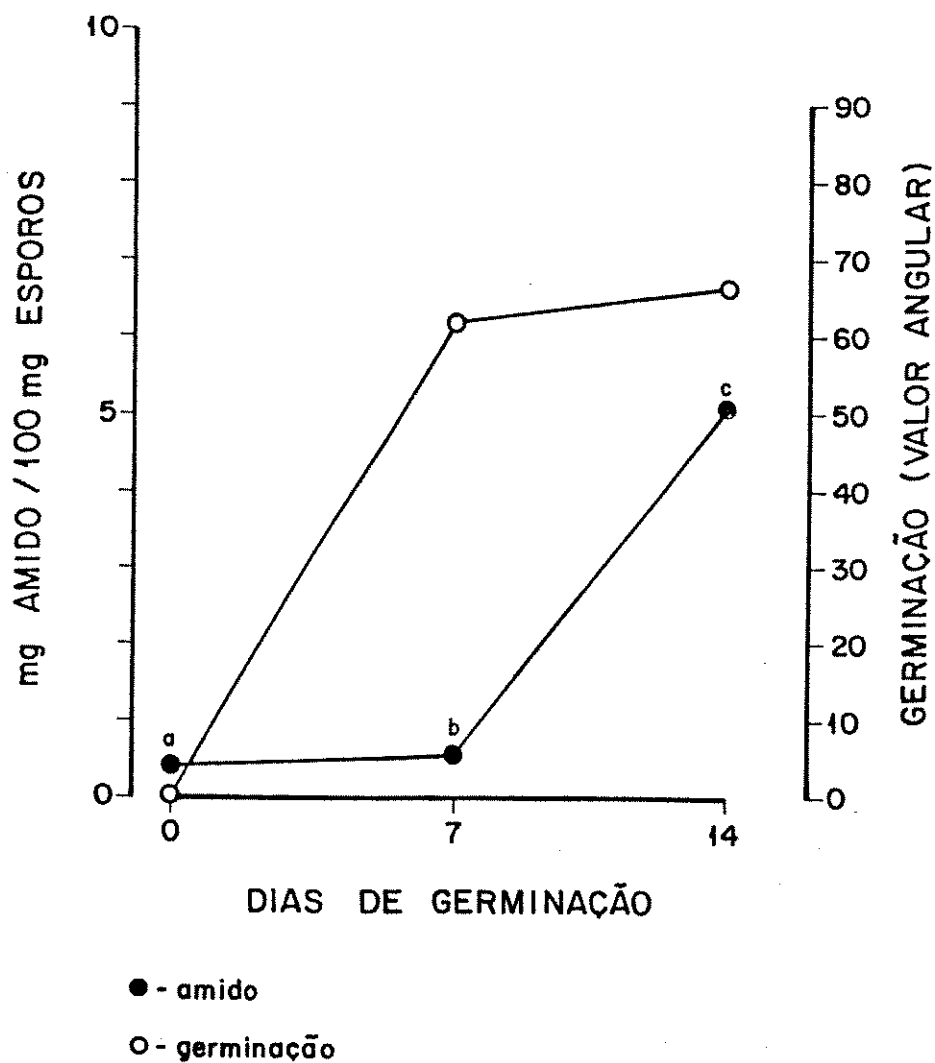


FIGURA 33 - Conteúdo de amido em esporos secos de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25°C.

TABELA 25 - Relação entre conteúdo de amido e pesos fresco e seco (dados da tabela 18), em esporos secos de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca contínua, a 25°C.

PF - peso fresco

PS - peso seco

Dias de germinação	$\mu\text{g}$ amido / mg PF	$\mu\text{g}$ amido/ mg PS
0	4,0	4,0
7	5,0	9,0
14	41,0	84,0

peso seco. Quanto às proteínas, açúcares redutores e amido, estes aumentam durante o período estudado.

## 7. ASPECTOS CITOQUÍMICOS

Aspectos citoquímicos de esporos secos e após 4 e 7 dias de embebição para a germinação, foram estudados com o objetivo de se detectar possíveis diferenças no padrão citoplasmático, no conteúdo de radicais catiônicos totais e radicais aniônicos.

A coloração pela hematoxilina eosina foi usada para se evidenciar o conteúdo nuclear e radicais negativos (coráveis pela hematoxilina) e radicais positivos (coráveis pela eosina).

Cortes corados pela hematoxilina-eosina (HE) são mostrados na Figura 34. Esporos corados por esse método apresentam os núcleos evidenciados pela hematoxilina. O citoplasma mostrou-se globular e foi corado pela eosina, indicando a presença de estruturas contendo radicais catiônicos. No material germinado (com 7 dias), as características observadas para a célula protonema se assemelharam às do esporo seco. Os rizóides apresentaram suas paredes coradas pela hematoxilina, indicando a presença de radicais aniônicos. O conteúdo citoplasmático foi corado pela eosina (Figura 35).

Nas Figuras 36, 37, 38, 39 e 40, são mostrados cortes de esporos e gametófitos intactos corados pelo azul de toluidina a pH 4,0, para detecção de radicais aniônicos.

Esporos secos (dia 0) apresentaram seus núcleos evi

- FIGURA 34 - Cortes de esporos secos de *Cyathea delgadii* corados pela hematoxilina-eosina.  
Podem ser notadas as exinas evidenciadas pela hematoxilina e citoplasma globular corado pela eosina.  
Aumento: 2.680 X
- FIGURA 35 - Cortes de gametófitos de *Cyathea delgadii*, com 7 dias de embebição, corados pela hematoxilina-eosina.  
Nota-se o citoplasma globular corado pela eosina e o núcleo da célula protonemal (seta) e as paredes corados pela hematoxilina.  
Aumento: 1.850 X

FIGURA 34

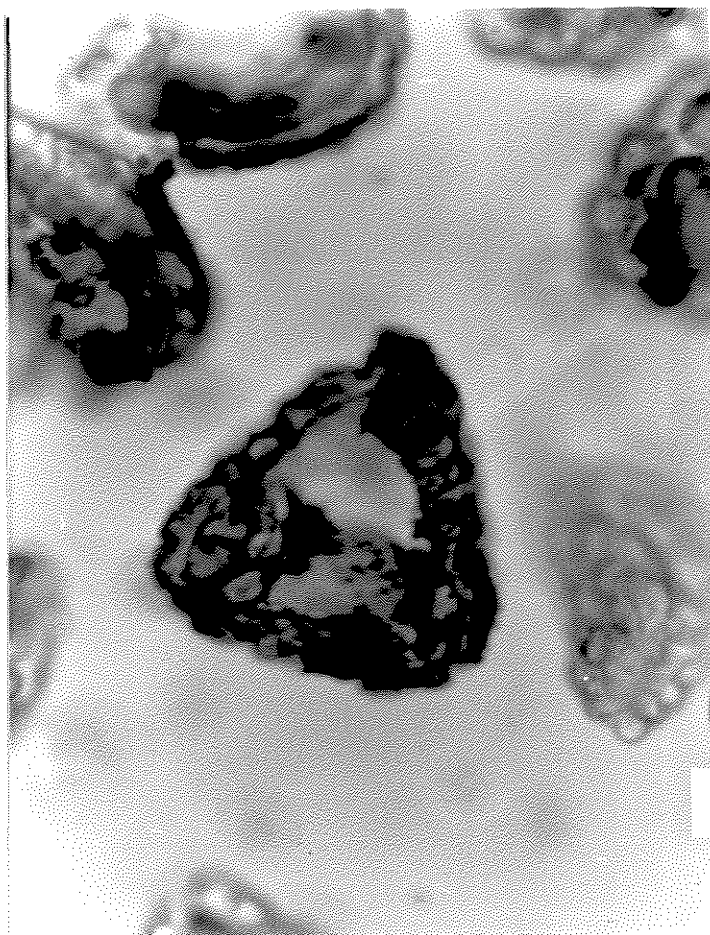


FIGURA 35



denciados em azul e um conteúdo citoplasmático pouco corado. A exina apresentou-se levemente ortocromática (Figura 36). A ortocromasia ocorre devido à baixa disponibilidade e o grande distanciamento entre os radicais aniônicos (grupos fosfato, carboxila e sulfato). Ocorre pouca associação do corante devido à escassez desses radicais. No decorrer da germinação (Figura 37) ocorreu um aumento na metacromasia do conteúdo citoplasmático das células protonemais e rizoidais. A ortocromasia apresentada pela exina foi salientada. A metacromasia ocorre quando há maior disponibilidade e maior proximidade dos grupos aniônicos, permitindo um maior empilhamento das moléculas do corante. Na Figura 38, nota-se a forma de trilete da cicatriz e a metacromasia ao nível das paredes celulares, também em material com 7 dias de embebição.

Na Figura 39, observa-se que gametófitos intactos (7 dias), também foram intensamente corados, salientando a metacromasia das células rizoidais.

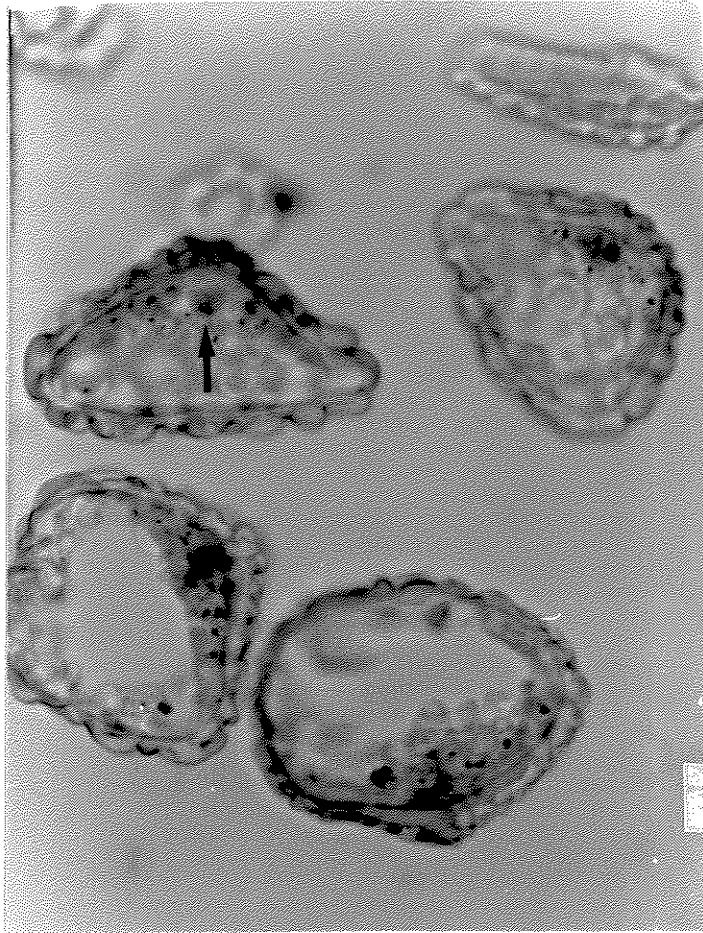
Na Figura 40, observa-se que as moléculas formadoras da exina exibem birrefringência, quando observados em luz polarizada com analisador e polarizador cruzados. Um corpo birrefringente é o que apresenta duas direções de propagação de luz, com um índice de refração para cada uma delas. Notam-se grânulos de amido no interior do esporo e menor birrefringência na região da cicatriz.

Nas figuras 41, 42 e 43 são mostrados cortes (0 e 7 dias de embebição) de esporos e gametófitos intactos (7 dias de embebição) corados pelo xylidine ponceau a pH 2,5 para radicais catiônicos totais.

Xylidine ponceau é um corante ácido cujas moléculas



- FIGURA 36 - Cortes de esporos secos de *Cyathea delgadii* corados pelo azul de toluidina a pH 4,0.  
Observam-se os núcleos corados em azul (seta), conteúdo citoplasmático pouco evidenciado e fraca coloração da exina.  
Aumento: 1.850 X
- FIGURA 37 - Cortes de gametófitos de *Cyathea delgadii*, com 7 dias de embebição corados pelo azul de toluidina a pH 4,0.  
Percebe-se um aumento da ortocromasia na exina e metacromasia nas células protonemais e rizoidais.  
Aumento: 1.850 X



FI GURA 37



FIGURA 38 - Cortes de gametófitos de *Cyathea delgadii*, com 7 dias de embebição, corados pelo azul de toluidina a pH 4,0. Observa-se a cicatriz em forma de trilete e metacromasia. Aumento: 2.960 X

FIGURA 39 - Gametófito intacto de *Cyathea delgadii*, com 7 dias de embebição, corados pelo azul de toluidina a pH 4,0. Observa-se conteúdo granular no interior do rizóide e metacromasia de sua parede. Aumento: 925 X

FIGURA 38

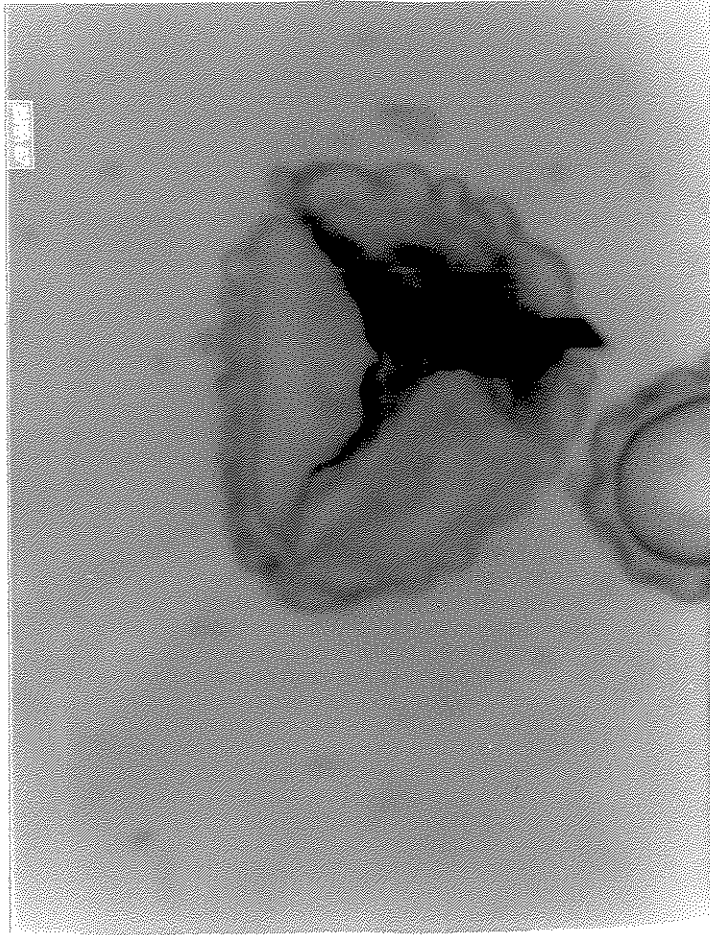


FIGURA 39

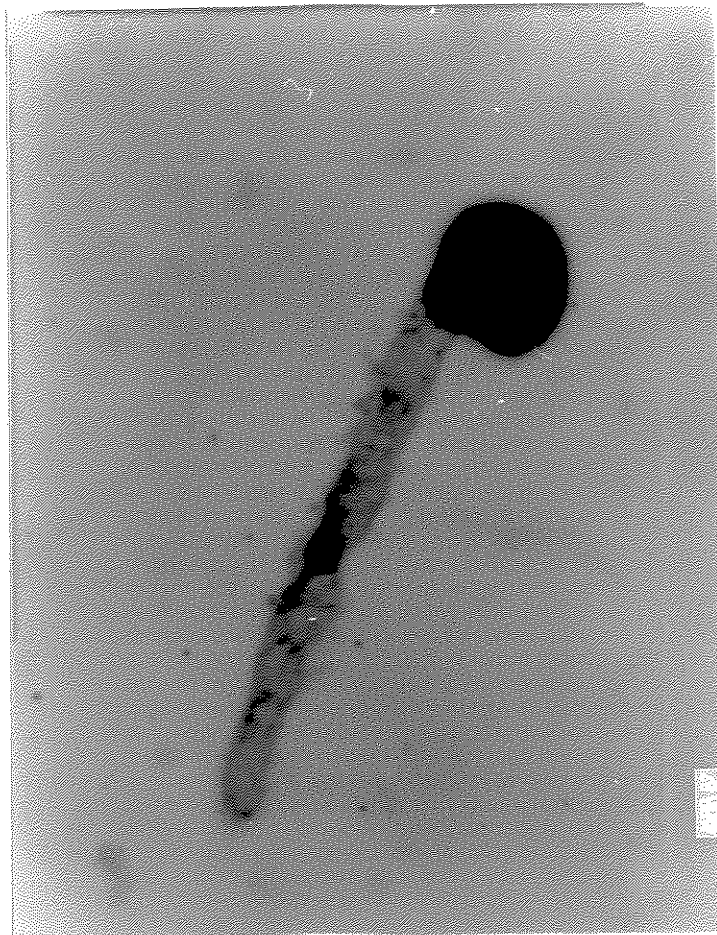
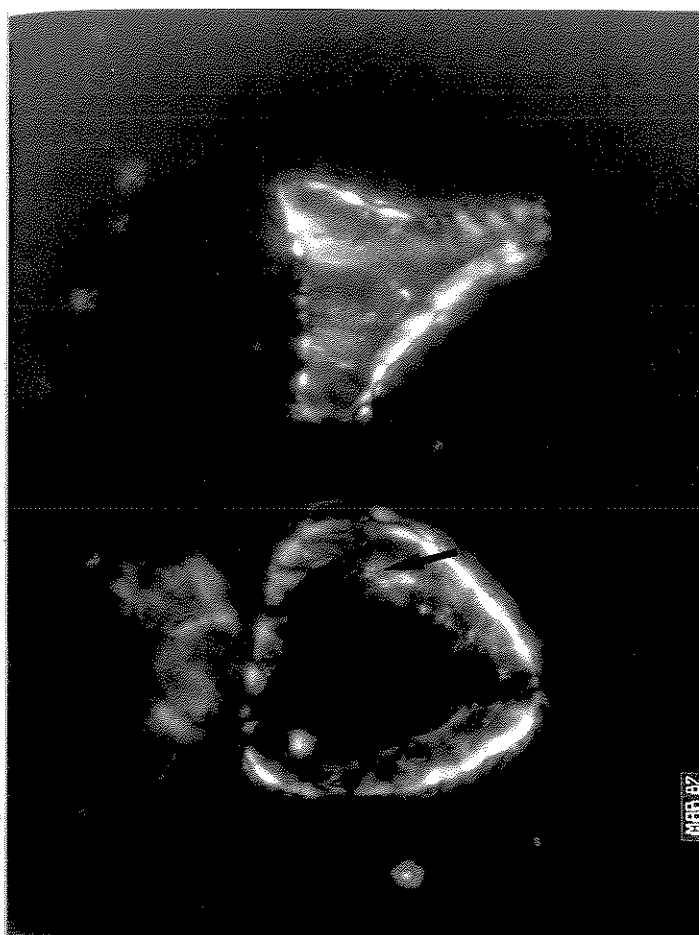


FIGURA 40 - Cortes de esporos secos de *Cyathea delgadii* corados pelo azul de toluidina a pH 4,0, observados em microscópio de polarização com analisador e polarizador cruzados. Nota-se birrefringência ao nível das exinas e a presença de grânulos de amido (seta).  
Aumento: 1.850 X

FIGURA 40



possuem o agrupamento  $-SO_3^-$  livre, ligando-se aos radicais amino das proteínas, que se encontram protonados no pH utilizado para a coloração.

Esporos secos quando corados com xylidine ponceau revelaram a presença de material em forma de glóbulos em seu interior (Figura 41). Foi observada uma gradativa perda do padrão globular no material corado, nas células protonemais, durante a germinação. Nos rizóides, observa-se a presença de material corado pelo xylidine ponceau, para gametófitos com 7 dias (Figura 42).

Durante a germinação, houve um aumento na intensidade de coloração do material evidenciado por esse corante. Pode ainda ser observado um deslocamento desse material, em direção à cicatriz e rizóide, o que foi salientado quando observados os gametófitos intactos, com 7 dias de embebição (Figura 43).

As Figuras 44 e 45 mostram esporos secos e após 7 dias de embebição, tratados pela pepsina ou tripsina, ambas enzimas proteolíticas. Os controles utilizados para os tratamentos enzimáticos após coloração pelo xylidine ponceau revelaram um padrão de proteínas semelhante ao obtido pelo material corado por esse método, sem qualquer tratamento enzimático prévio (Figuras 41 e 42).

Esporos e gametófitos jovens tratados pela pepsina ou tripsina tiveram seu conteúdo de proteínas removido. O padrão de remoção diferiu entre esporos secos (Figura 44) e germinados (Figura 45). As extrações foram mais eficientes para o material germinado. Aparentemente, os tratamentos com pepsina ou tripsina tiveram o mesmo efeito.

Esporos secos apresentam suas proteínas contidas em

corpos protéicos globulares altamente agregadas. Essa agregação pode dificultar a ação das enzimas. Gametófitos jovens apresentam as proteínas desagregadas. Não se verifica presença de corpos protéicos nesse material, o que deve facilitar a ação das enzimas proteolíticas.



FIGURA 41 - Cortes de esporos secos de *Cyathea delgadii* corados pelo xylidine-ponceau a pH 2,5.

Nota-se a presença de material globular corado no interior dos esporos. As exinas não se coram pelo xylidine-ponceau.

Aumento: 1.850 X

FIGURA 42 - Cortes de gametófitos de *Cyathea delgadii*, com 7 dias de embebição, corados pelo xylidine-ponceau a pH 2,5.

Observam-se perda do padrão globular das proteínas presentes na célula protonemal e reação positiva ao corante, nas células rizoidais.

Aumento: 1.850 X

FIGURA 41

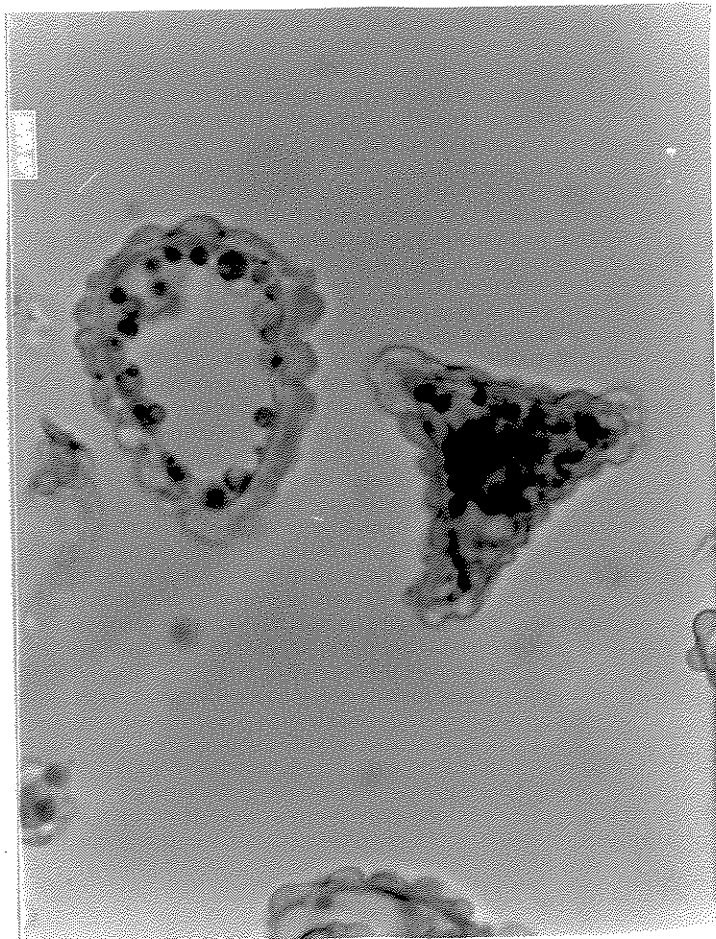


FIGURA 42

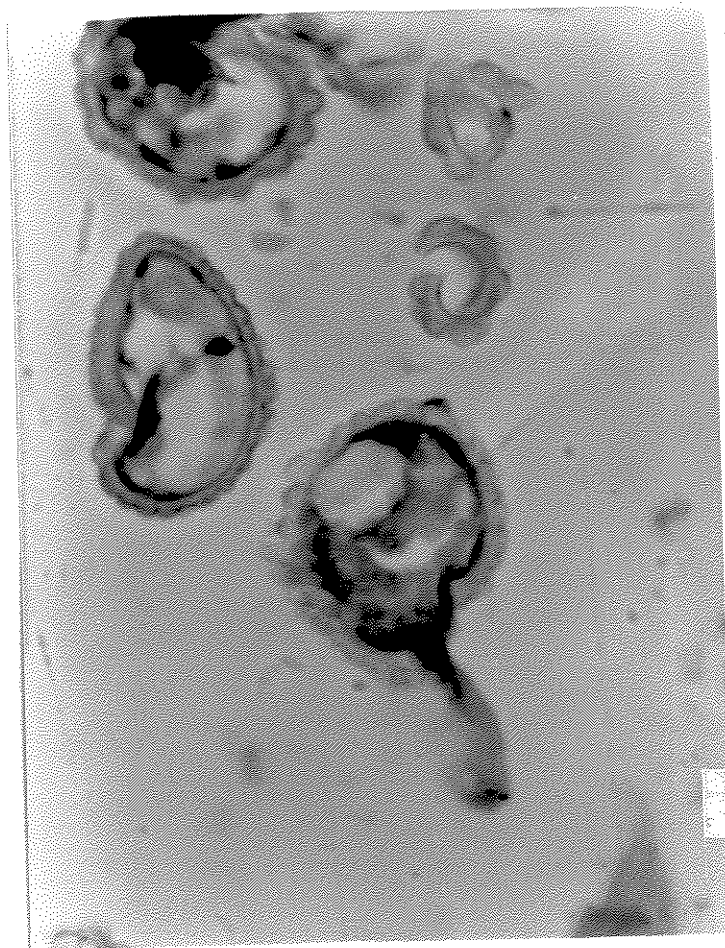


FIGURA 43 - Gametófitos intactos de *Cyathea delgadii*, com 7 dias de embebição, corados pelo xylidine-ponceau a pH 2,5. Observa-se a presença de material fortemente corado na região da cicatriz e no interior dos rizóides.  
Aumento: 740 X

FIGURA 43

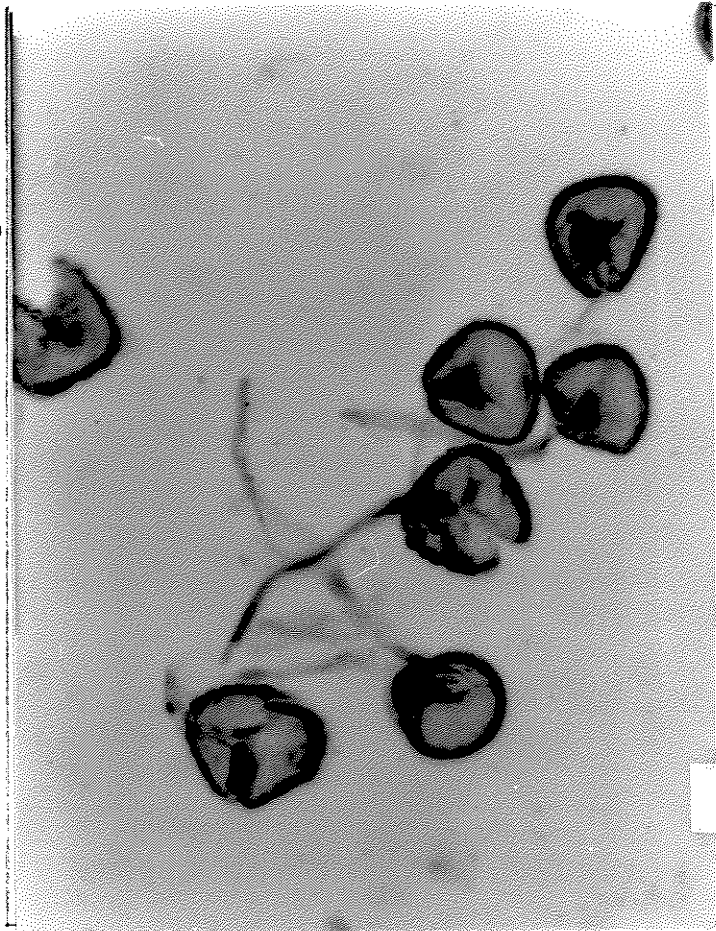


FIGURA 44 - Cortes de esporos secos de *Cyathea delgadii* submetidos à digestão pela pepsina e posteriormente corados pelo xylidíne-ponceau a pH 2,5.

Nota-se a remoção de grande parte do material evidenciado pelo corante.

Aumento: 2.680 X

FIGURA 45 - Cortes de gametófitos de *Cyathea delgadii*, com 7 dias de embebição, submetidos à digestão pela tripsina e a seguir corados pelo xylidíne-ponceau a pH 2,5.

Nota-se a remoção total do material evidenciado pelo corante.

Aumento: 2.680 X

FIGURA 44

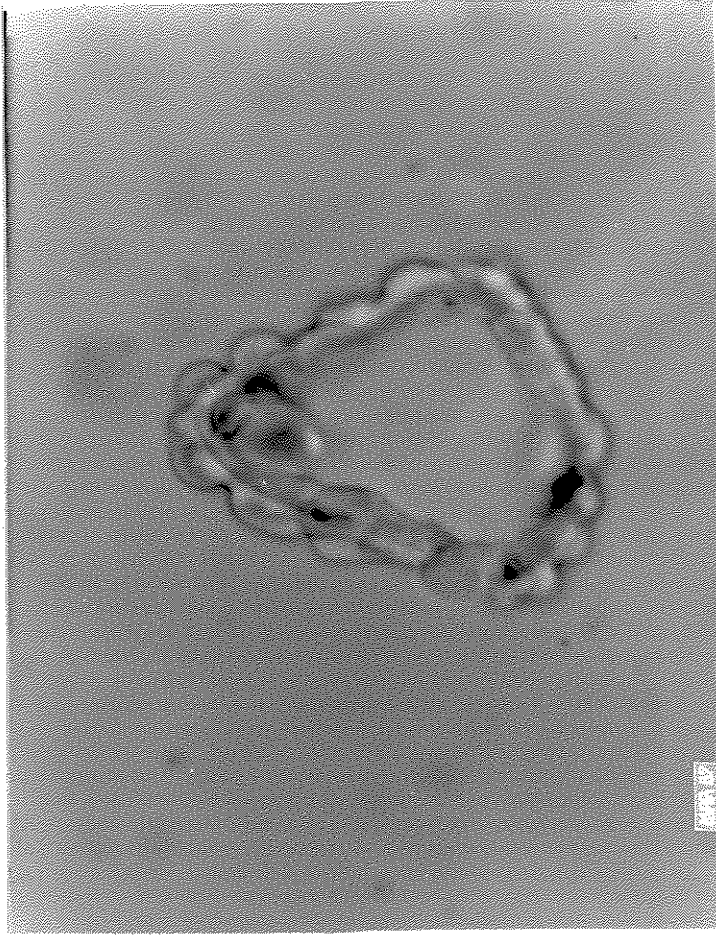
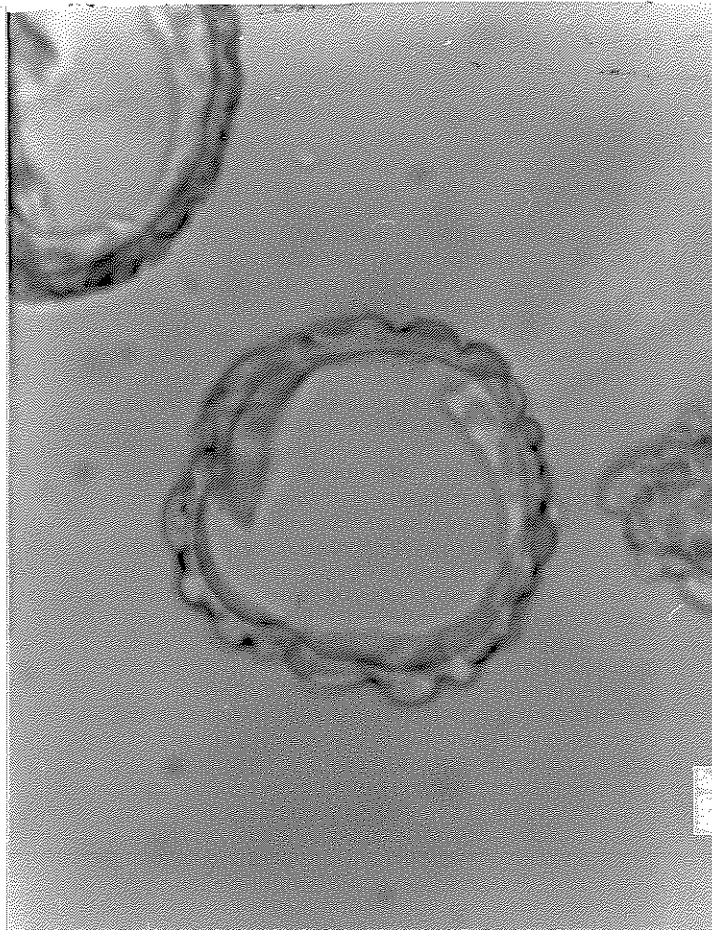


FIGURA 45



## 8. CONCLUSÕES DOS RESULTADOS OBTIDOS

a) O período de pré-indução para esporos de *Cyathea delgadii* compreende um mínimo de 24 horas de embebição.

b) Esporos sempre respondem ao tratamento de 1 minuto de luz vermelha, quando este é fornecido após um período de 48 horas de embebição no escuro, independentemente da coleta e do período de armazenamento a 4°C.

c) Tratamentos luminosos diários de 1 minuto de duração promovem altas taxas de germinação, porém menores do que a germinação sob luz constante.

d) O tempo de escape da reversão do efeito de tratamento curto de luz vermelha por tratamento curto de vermelho extremo é de 8 horas.

e) Quanto mais baixa a temperatura de pré-indução, menor se torna a sensibilidade dos esporos ao tratamento luminoso de curta duração; temperaturas altas parecem causar inibições irreversíveis da fotossensibilidade.

f) Quanto menor o tempo de exposição à temperatura

alternante (10, 15, 20 e 30°C) durante o período de pré-indução, maior o efeito indutor do tratamento luminoso.

g) Tratamentos de 4 horas de luz vermelha ou branca, após o período de pré-indução, causam as maiores respostas de germinação, que, no entanto, não atingem as taxas dos controles em luz constante. Tratamentos de 48 ou 120 horas de luz, utilizando-se lâmpada gro-lux induziram respostas semelhantes aos controles em luz contínua.

h) Luz azul causa uma pequena indução da germinação.

i) A pré-embebição em vapor de água reduz o período de pré-indução e aumenta a fotossensibilidade dos esporos aos tratamentos luminosos de curta duração.

j) A pré-embebição em solução de polietilenoglicol, por uma semana, acelera e sincroniza a germinação de esporos mas reduz a taxa final de germinação.

l) Lipídios livres diminuem durante os primeiros sete dias de germinação; açúcares solúveis totais também diminuem e aumentam proteínas, clorofila, açúcares redutores e amido, durante esse período.

m) O peso fresco dos esporos se mantém constante nos primeiros sete dias de embebição e o peso seco diminui. Não há alteração do peso seco entre os dias 7 e 14.



n) Estudos citoquímicos mostraram que o conteúdo citoplasmático é granular, para esporos secos e que o núcleo é ovalado. Estas observações foram feitas após coloração com hematoxilina eosina.

A coloração com azul de toluidina mostra que esporos secos apresentam a exina ortocromática, o mesmo ocorrendo para o citoplasma. Os núcleos se coraram em azul. Durante a germinação houve aumento da metacromasia das paredes celulares e do conteúdo citoplasmático, após essa coloração.

Pela coloração com xylidine-ponceau, observa-se que as proteínas são globulares em esporos secos e que tornam-se difusas e em maior quantidade após a germinação. A digestão enzimática pela pepsina ou tripsina confirmou que o material corado pelo xylidine-ponceau é de natureza proteica.

- D I S C U S S Ã O -

A *Cyathea delgadii* Sternb. é uma espécie de pteridófito arbórea que cresce em uma grande variedade de condições ecológicas através de sua ampla faixa de distribuição fitogeográfica. Ocorre na América do Sul e no Brasil e se concentra na Mata Atlântica, principalmente nos Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro (TRYON, 1986).

Neste trabalho, foi mostrado que a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* teve início entre os terceiro e quarto dias, confirmando os dados de MARCONDES-FERREIRA (1983). A partir do 7º dia, a curva de germinação atingiu a estabilidade. Já, MARCONDES-FERREIRA (1983), observou que a curva de germinação atingia a estabilização a partir do 12º dia, para esporos da mesma espécie. Essa diferença na estabilização das curvas de germinação pode ser explicada pelo fato de que as respostas de esporos são bastante variadas. A variação ocorre não somente entre espécies, mas entre amostras de esporos de uma mesma população (SUGAI *et al.*, 1977). Possivelmente, MARCONDES-FERREIRA (1983) deve ter trabalhado com uma amostra cuja germinação era um pouco mais lenta.

A germinação de esporos fotossensíveis pode ser di-

vidida em três fases seqüenciais: fase de pré-indução, no escuro, na qual os esporos embebem água e tornam-se sensíveis à radiação; uma fase de indução, onde a luz pode induzir a máxima germinação e a fase de pós-indução, onde os fotoprodutos desencadeiam os processos que irão terminar em protusão de rizóide ou da célula protonemal (TOWILL e IKUMA, 1975a).

Em um experimento preliminar foi constatado que os esporos de *Cyathea delgadii* respondem com uma baixa germinação a um tratamento de luz vermelha, de 1 minuto de duração. Esse tratamento foi realizado após 48 horas de embebição no escuro. Segundo resultados de MARCONDES-FERREIRA e FELIPPE (1984) esse seria o período de pré-indução para esporos de *Cyathea delgadii*. Esses autores trabalharam com períodos longos de radiação. Procurou-se então confirmar esses dados utilizando-se o tratamento indutor de curta duração: 1 minuto de luz vermelha. Esse tratamento foi fixado e foi variado o tempo de embebição no escuro. Foi constatado que são necessárias pelo menos 24 horas de embebição no escuro para que os esporos se tornem sensíveis a esse tratamento luminoso. Portanto, para esporos de *Cyathea delgadii*, o período de pré-indução parece ser de no mínimo 24 horas de embebição no escuro. A germinação foi maior após 48 horas de embebição no escuro. Neste trabalho, foi sempre utilizado como período de pré-indução, as 48 horas de embebição no escuro. Assim, os tratamentos luminosos foram aplicados após esse período, na maior parte dos experimentos.

O tratamento luminoso foi aplicado a diversas coletas, com diferentes períodos de armazenamento, após o pe-

riodo de prē-indução. Todas as amostras responderam c o m baixa germinação e houve diferença de amplitude da resposta entre as coletas. Apōs 275 dias de armazenamento, houve uma diminuição da resposta, quando se trabalhou com a mesma coleta. Novamente, ē confirmado o fato de que as respostas de esporos ā luz sōo muito variadas e parecem se alterar dependendo do local, ēpoca de coleta e armazenamento (FURUYA, 1983).

O efeito do tratamento luminoso de 1 minuto de duraçāo que foi aplicado apōs o perīodo de prē-indução, foi revertido por aplicaçāo subsequente de vermelho extremo de 5 minutos de duraçāo. Hā uma correlaçāo direta e positiva e n t r e a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* e o nūmero crescente de horas de escuro(2 a 8 horas) intercaladas entre os tratamentos de luz vermelha e vermelho extremo. O "escape" da reversāo do efeito da luz vermelha pelo vermelho extremo se completa apōs 8 horas de escuro intercalados entre os dois tratamentos de luz. Esse tipo de resposta indica que o fitocromo estā envolvido no processo de germinação desses esporos. MARCONDES-FERREIRA (1983) trabalhando com tratamentos luminosos diārios, de 1 hora de duraçāo, observou a reversāo do efeito da luz vermelha pelo vermelho extremo, em esporos de *Cyathea delgadii*. Os resultados atuais confirmam sua observaçāo.

Quando foram realizados 1, 2, 3, 4 ou 5 tratamentos de 1 minuto de luz vermelha, com inīcio apōs a prē-indução e intercalados por perīodos de 24 horas de escuro, houve uma correlaçāo positiva entre as porcentagens de germinação e o nūmero de tratamentos luminosos fornecidos.

Foram tambēm testados tratamentos luminosos de lon-

ga duração (1,2,4,6,8 e 10 horas de luz). Esses tratamentos foram realizados após o período de pré-indução. Foram utilizadas 3 fontes luminosas. A germinação atingiu a estabilização após 4 horas de luz para lâmpadas fluorescentes branca e vermelha. Valores de germinação aumentaram gradualmente com uso de lâmpada gro-lux e filtro de papel celofane vermelho. As 3 fontes luminosas causaram a mesma promoção de germinação após 8 horas de luz. Tal promoção, entretanto, não atingiu os valores de germinação encontrados para esporos submetidos à iluminação contínua. Paralelamente foi testado o efeito do tratamento luminoso de 1 minuto, utilizando-se as 3 fontes luminosas. Observou-se que a lâmpada gro-lux associada ao papel celofane vermelho foi a que promoveu as mais altas porcentagens de germinação. As diferenças encontradas para as 3 fontes luminosas devem ser provenientes de diferenças na qualidade das luzes que cada lâmpada emite. A lâmpada gro-lux é a mais eficiente para os tratamentos de curta duração. Para os tratamentos de longa duração, entretanto, a estabilização só ocorreu após 8 horas de luz, com o uso dessa lâmpada.

A lâmpada fluorescente branca emite radiações de todos os comprimentos de onda do espectro luminoso, mas com baixa emissão de vermelho extremo e além. A lâmpada fluorescente vermelha exibe alguma contaminação com luz azul, o que foi verificado pelo uso de espectroscópio manual Carl Zeiss-Jena. O sistema lâmpada gro-lux-papel celofane vermelho foi o que exibiu luz vermelha isenta de contaminações.

Foram testados ainda tratamentos luminosos de 24, 48 e 120 horas. Constatou-se que tratamentos de 48 e 120 horas de luz, utilizando-se o sistema filtro-lâmpada gro-

lux, atingiram os valores de germinação obtidos para luz contínua. Há evidências de que existem dois tipos de respostas de esporos de *Cyathea delgadii* aos tratamentos luminosos: resposta aos tratamentos de curta duração e resposta aos tratamentos de longa duração.

Respostas semelhantes também ocorrem em esporos de outras espécies. Para *Lygodium japonicum*, SUGAI *et al.* (1977), trabalhando com 3 amostras coletadas em anos diferentes e estocadas por períodos e em temperaturas diferentes, observaram que em 2 amostras a germinação ocorria após rápida exposição à luz vermelha (2 minutos). Na terceira amostra, várias horas eram necessárias para que a germinação atingisse o valor alcançado pelas outras após receberem poucos minutos de luz. Observaram também que tratamentos intermitentes de 5 minutos de luz vermelha, realizados a cada 1, 2 ou 4 horas, em um período de 24 horas, causavam a mesma promoção de germinação que o tratamento de 24 horas contínuas de luz vermelha. Os autores comentam que o papel fisiológico dos tratamentos intermitentes é obscuro.

Para esporos de *Thelypteris kunthii*, HUCRABY e RAGHAVAN (1981a), observaram que tratamento de 18 horas de luz vermelha induzem a máxima germinação. Tratamento de 5 minutos de luz vermelha fornecidos a cada hora, durante um período de 18 horas induzem alta promoção de germinação que entretanto foi menor do que o tratamento de 18 horas contínuas. Esses autores verificaram que o efeito do tratamento de 8 horas de luz vermelha é revertido por tratamento de 5 minutos de vermelho extremo.

Para explicar o efeito da promoção da germinação pelos tratamentos luminosos intermitentes, os autores sugerem que a fotoindução da germinação de esporos tanto para *Lygodium japonicum* como para *T. hedyotis kunthii* não possui reciprocidade. A germinação não dependeria apenas do número de quanta de luz interceptados pelos esporos, mas também da duração do período no qual a luz está sendo oferecida.

Uma resposta diferente foi encontrada para esporos de *Pteris vittata* (FURUYA *et al.*, 1982). Os autores verificaram que os esporos apresentam 61,4% de germinação após receberem tratamentos luminosos de 5 minutos (luz vermelha  $1,0 \text{ W.m}^{-2}$ ), após um período de 7 dias de pré-indução. Aparentemente, apenas um tipo de resposta à luz ocorre nesses esporos.

Para esporos de *Lygodium japonicum*, que também germinam após curtos períodos de exposição à luz, TOMIZAWA *et al.*, (1982) encontraram uma correlação entre os níveis de FVe e a porcentagem de esporos germinados. Observaram que os níveis de FVe diminuem gradualmente no escuro subsequente ao tratamento luminoso indutor. FVe desaparece totalmente após 8 horas de escuro. Entretanto, quando tratamento subsequente de vermelho extremo foi fornecido após esse período, há resposta de germinação, indicando que houve escape da reversão do efeito da luz vermelha pelo vermelho extremo. Houve atuação de FVe embora esse pigmento não estivesse mais sendo detectado espectrofotometricamente. FURUYA (1983), mostra um modelo para a atuação do fitocromo na germinação de esporos onde o FVe tornaria ativo um composto desconhecido X, que estaria inativo no esporo mantido

no escuro. FURUYA (1985) também sugere que a fototransformação de FV a FVe seria sincrônica e gradual em uma amostra de esporos. Entretanto, alguns esporos germinariam com baixas porcentagens de FVe e outros, somente com altas porcentagens de FVe.

No caso da germinação de sementes induzida pela luz, ela parece ser determinada pela porcentagem de FVe sobre o nível do fitocromo total. A porcentagem parece ser muito variável, dependendo das espécies (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1982). No caso de esporos, poderia existir uma faixa de porcentagens de FVe, dentro da qual os esporos germinariam.

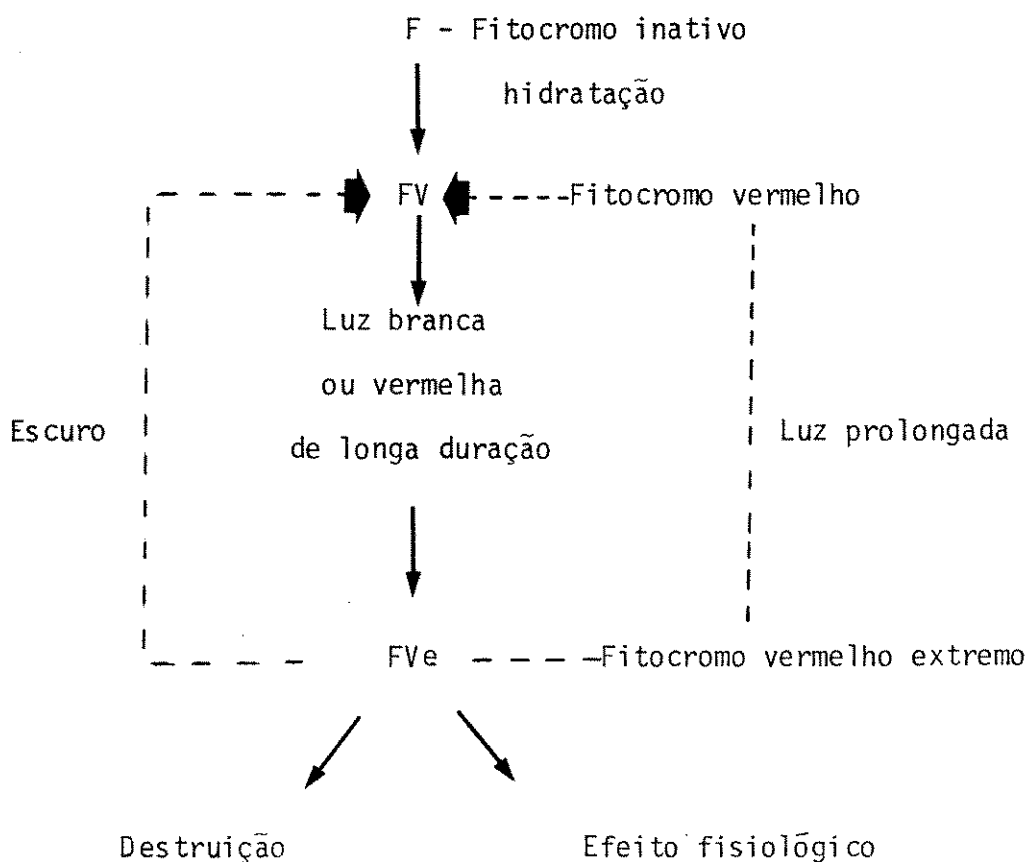
BUTLER *et al.* (1963) mostraram que a forma FVe do fitocromo é muito menos estável que a forma FV e que a destruição irreversível de fitocromo, ocorre devido à destruição dessa forma. Concluíram também que as formas FV e FVe não absorvem apenas luz nos comprimentos de onda 660 nm e 730 nm respectivamente. Esses comprimentos de onda seriam os picos de máxima absorção para cada forma do pigmento. Ambos teriam amplas bandas de absorção. O FVe também teria alguma absorção a 660 nm. Irradiações muito prolongadas com comprimentos de onda que poderiam ser absorvidos pelas duas formas do pigmento, levariam a um equilíbrio dinâmico entre as duas formas. Uma fonte de luz monocromática levaria ao "estado fotoestacionário", no qual as proporções de FV e FVe são mantidas constantes. Luz vermelha contínua estabeleceria um estado fotoestacionário com alta proporção de FVe. Parte do "pool" de FVe poderia ser destruída se o tratamento luminoso fosse prolongado e parte reverteria a FV, mantendo-se níveis baixos de FVe.

Um mecanismo semelhante poderia explicar o efeito

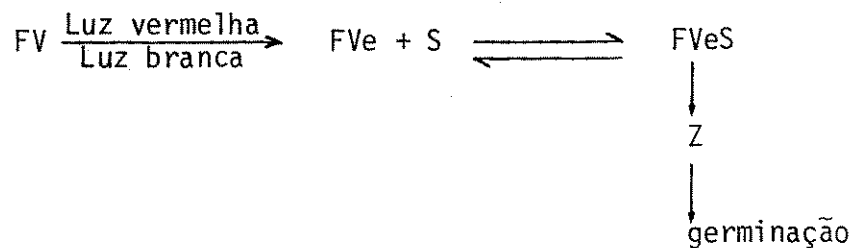


de tratamentos luminosos longos, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*. Esses tratamentos mostram uma saturação entre 4 a 8 horas de luz, dependendo da fonte luminosa utilizada (ou também da intensidade).

Como a fototransformação do fitocromo de esporos parece ser sincrônica e gradual, o fitocromo FV gradualmente seria convertido a FVe. Tratamentos de 1 hora de luz formariam um pequeno "pool" de FVe, visto que, parte dele retornaria a FV e parte seria destruída pela própria luz. Alguns esporos seriam capazes de germinar com esses níveis de FVe. Tratamentos de 4 horas ou mais excitariam um "pool" maior de FVe. Luz contínua levaria ao "estado fotoestacionário", mantendo níveis muito baixos de FVe. As interações poderiam ser resumidas no seguinte esquema (baseado em SMITH, 1975a,b):



Espécies como *Cyathea delgadii*, na verdade, poderiam responder a níveis muito baixos de FVe, ou, numa segunda hipótese, o FVe seria rapidamente utilizado para a germinação. SMITH (1975b) propõe um modelo para explicar o envolvimento do fitocromo em sementes, atuando indiretamente, via conjugação com um metabólito já existente:



S seria um composto já existente, instável. Sua conjugação com FVe induziria a síntese de um outro composto Z. Este promoveria a germinação.

Para esporos de *Cyathea delgadii*, o FVe poderia se conjugar rapidamente a S formando Z, permitindo sua atuação antes da destruição, no caso de tratamentos luminosos de longa duração.

No caso dos tratamentos luminosos curtos e intermitentes, observa-se também uma resposta de saturação de luz, mas os resultados são semelhantes para esporos tratados com 4 a 8 horas de luz ou que receberam 5 minutos de luz intermitente (1 minuto) num período de 5 dias. Nesse caso, poder-se-ia sugerir que o FVe formado em baixos níveis após esse tratamento luminoso seria mais estável no escuro, do que quando submetido a tratamentos luminosos mais prolongados. A destruição de FVe no escuro seria mais lenta, permitindo sua conjugação com S e subsequente formação de Z. Os níveis de Z variariam também para cada esporo. Poder-se-ia

considerar que Z formado após tratamentos intermitentes, poderia ser estocado até atingir os níveis ideais para induzir a germinação. Alguns esporos teriam quantidades suficientes de Z para induzir a germinação após 1 minuto de luz. Outros necessitariam estocar Z após subseqüentes tratamentos luminosos intermitentes.

Entretanto, todos os modelos propostos para explicar a atuação do fitocromo nos diversos processos por ele mediados, são apenas hipotéticos. É difícil aliar a esses modelos, as inúmeras interações metabólicas que estão ocorrendo paralelamente às respostas mediadas pela luz.

Tratamentos longos de luz azul aplicados após a pré indução, induziram pequenas respostas de germinação. Quando foram associados tratamentos longos de luz vermelha com tratamentos longos de luz azul, esta não impediu a manifestação do efeito indutor da luz vermelha. MARCONDES - FERREIRA (1983) verificou que a luz azul promovia baixa porcentagem de germinação de esporos de *Cyathea delgadii*. A promoção foi revertida pelo vermelho extremo. O efeito inibidor do vermelho extremo foi fracamente revertido pela luz azul.

SUGAI (1971) observou que a luz azul revertia o efeito promotor da luz vermelha, em esporos de *Pteris vittata*. Os espectros de ação da luz azul tiveram picos a 440 nm e 380 nm sugerindo que o sistema fitocromo não estaria envolvido nas respostas mediadas pela luz azul. Esporos de *Matteuccia struthiopteris* têm a germinação dependente da luz. Comprimentos de onda entre 400 e 750 nm promovem sua germinação, mas os dois picos maiores de promoção ocorrem a 550 e 625 nm e o menor a 450 nm (JARVIS e WILKINS, 1973). A promoção da germinação pela luz azul foi verificada tam-

bem para esporos de *Onoclea sensibilis* (TOWILL e IKUMA, 1973). Luz vermelha e vermelho extremo também promoveram a germinação dessa espécie. O espectro de absorção dos esporos intactos revelou a presença de clorofila e de carotenóides. RAGHAVAN (1973), trabalhando com esporos de *Cheilanthes farinosa* verificou que a exposição desses esporos a tratamentos luminosos de luz vermelha de baixa intensidade promove sua germinação. Essa promoção não é revertida pela exposição subsequente ao vermelho extremo, mas é revertida por luz azul fornecida antes ou depois do tratamento com luz vermelha. Propõe que a presença de um pigmento que absorve a luz azul interfere nos processos de transformação do fitocromo. Sugere que o pigmento que absorve luz azul, na forma reduzida evita a transformação FVe a FV, mas na forma oxidada inibe a transformação do FV a FVe. TOMIZAWA *et al.* (1983), verificaram que em esporos de *Lygodium japonicum*, a luz azul inibe totalmente a germinação, mas permite a manutenção de níveis de 16% de FVe. Eles sugerem que o sistema que absorve luz azul poderia eliminar um passo específico do processo de germinação e não estaria atuando diretamente na fotoconversão do fitocromo. SUGAI *et al.* (1984) determinaram um espectro de ação entre 250 e 800 nm para a inibição da promoção da germinação de esporos de *Pteris vittata*, induzida pela luz vermelha. Observaram que não ocorreu nenhuma transmissão de luz através das paredes dos esporos na faixa entre 260 a 340 nm. Os comprimentos de onda mais efetivos em reverter o efeito da luz vermelha tiveram os picos a 370, 440 e 730 nm. Sugerem que os compostos relacionados às flavinas seriam os mais prováveis fotorreceptores das luzes UV, UVlonga e azul. SUGAI e FURUYA (1985)

determinaram também o espectro de ação para a inibição da germinação de esporos de *Adiantum capillus-veneris*, induzida pela luz vermelha. Foram observados dois grandes picos a 275 e 440 nm. Observaram também que as paredes dos esporos apresentaram um pequeno pico de transmitância a 270 nm. A transmitância teve um aumento abrupto em torno de 350 nm e foi de mais de 80% na faixa compreendida entre 400 a 500 nm. A luz UV é mais efetiva em *Adiantum*, do que em *Pteris vittata* (SUGAI *et al.*, 1984).

O espectro fotoacústico de esporos secos e paredes de esporos de *Cyathea delgadii* mostra que a amplitude do sinal diminui em ambos na faixa compreendida entre 300 a aproximadamente 750 nm. As amplitudes foram menores para os esporos intactos. Esses resultados indicam que a transmitância foi crescente nessa faixa.

Nessa espécie, o pigmento que absorve luz azul não parece interferir nos processos de fototransformação do fitocromo, mas parece causar uma promoção muito baixa da germinação. Isto poderia ocorrer devido ao fato de que as paredes dos esporos absorvem grande parte da luz azul, diminuindo sua absorção pelo sistema de pigmentos em questão, ou por contaminação por outros comprimentos de onda.

MARCONDES-FERREIRA e FELIPPE (1984), verificaram que esporos recém coletados de *Cyathea delgadii* germinaram a 15, 20, 25 e 30°C, com a maior germinação a 25°C e os armazenados por 7 meses somente germinaram a 20, 25 e 30°C. Esporos armazenados por 14 meses foram submetidos a temperaturas alternadas; não ocorreu germinação a 25-35, 25-40 e 25-45°C.

Neste trabalho foi verificado o efeito de temperaturas constantes (5 a 45°C) durante o período de pré-indução

ou durante os períodos de pré e pós-indução, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*. Os esporos receberam tratamentos únicos de 1 minuto de luz vermelha, após a pré-indução, ou tratamentos intermitentes diários de 1 minuto de luz vermelha, intercalados por períodos de 24 horas de escuro. Para esporos que receberam tratamento único de 1 minuto de luz vermelha, não houve indução da germinação nas temperaturas de pré-indução de 5, 10, 15, 20, 35, 40 e 45°C. A germinação para esporos pré-induzidos a 30°C foi menor do que a obtida a 25°C. Para esporos que receberam tratamentos luminosos diários, houve um aumento gradual da germinação, de 5 a 25°C, indicando reversão parcial da inibição causada pelas temperaturas baixas durante a pré-indução. A pequena inibição causada a 30°C foi totalmente revertida. O efeito inibidor das temperaturas de 35, 40 e 45°C não foi revertido pelos tratamentos luminosos diários. Quanto mais baixa a temperatura de pré-indução, menor foi a fotossensibilidade dos esporos.

As temperaturas testadas na pré e pós-indução causaram inibição da germinação, em relação a 25°C, para esporos que receberam tratamentos luminosos únicos. Quando se forneceram tratamentos luminosos diários as temperaturas de 5, 10, 15, 30, 35, 40 e 45°C inibiram totalmente a fotoindução. A temperatura de 20°C causa redução da germinação.

Temperaturas alternadas (25-5°C a 25-45°C) foram aplicadas em ciclos de 8-16 horas, 12-12 horas e 16-8 horas, durante a pré-indução ou durante a pré e pós-indução. Nesse caso os esporos receberam apenas tratamento luminoso único, de 1 minuto de duração. Quanto menor o tempo de exposição à temperatura alternante, durante o período de pré

indução, maior o efeito indutor do tratamento luminoso, para as temperaturas alternantes de 10, 15, 20 e 30°C. Temperaturas alternantes de 5, 35, 40 e 45°C causaram inibição total da germinação.

Para esporos que receberam tratamentos de alternância de temperaturas durante a pré-indução e a pós-indução, observou-se que quanto menor o tempo de exposição à temperatura alternada (entre 10 a 20°C) maior foi a resposta de germinação.

As temperaturas de 5, 30, 35, 40 e 45°C, inibem o efeito do tratamento luminoso, quando alternadas com a de 25°C, durante a pré-indução e a pós-indução.

A fase de pré-indução de esporos de *Onoclea sensibilis* é dependente de oxigênio e é inibida pela aplicação de cicloheximida (TOWILL e IKUMA, 1975a,b). A fase de pós-indução também envolve processos oxidativos e é inibida pela cicloheximida, se esta substância for aplicada imediatamente após o tratamento luminoso indutor. A fase oxidativa da pós-indução pode ser inibida pela anaerobiose e o processo de "escape" da inibição é lento, implicando em síntese de uma substância ou substâncias (possivelmente enzimas) necessárias para o processo de germinação.

TOWILL (1978) verificou que a germinação de esporos de *Onoclea sensibilis* é controlada pela luz e temperatura. Temperaturas de 30°C podem induzir máxima germinação no escuro, em torno de 60 a 95% da germinabilidade induzida por uma dose saturante de luz vermelha. Sugere que o mecanismo de termossensibilidade é diferente do de fotossensibilidade. Utilizando substâncias que parecem atuar a nível de membranas celulares, sugeriu que o grau de hidratação e possíveis mu

danças na propriedade das membranas exerceriam um papel na mudança da sensibilidade de esporos de *Onoclea* às temperaturas.

CHEN e IKUMA (1979), trabalhando com esporos de *Onoclea sensibilis*, verificaram que tratamentos de 8 ou mais horas de 40°C aplicados durante a fase de pré-indução reduzem reversivelmente o desenvolvimento da fotossensibilidade.

Temperatura de 40°C aplicada logo após o tratamento luminoso indutor também inibe a germinação, reversivelmente. Temperaturas abaixo de 25°C causam inibição da germinação, quando aplicadas durante a pré e pós-indução e 30 e 35°C estimulam a germinação. Os esporos de *Onoclea sensibilis* são mortos a 50°C (CHEN e IKUMA, 1979). Eles sugerem que a cicloheximida aplicada na pré e a pós-indução inibe a síntese de uma proteína de curta duração, que é necessária na fase de pós-indução. Entretanto, não está claro, em que processo ou processos específicos as temperaturas altas e a anaerobiose estariam atuando. Acrescentam que a fase de pré-indução está envolvida na preparação da máxima fotossensibilidade enquanto que a pós-indução, com processo específicos que levam à germinação.

REYNOLDS (1982) observou que esporos de *Sphaerotetris cooperi* apresentam duas fases oxidativas: uma fase inicial (0 a 120 horas de embebição) que é resistente ao cianeto de potássio e uma fase posterior a esse período que é inibida pelo cianeto de potássio. Tratamento de alta temperatura (50°C por 90 minutos) durante a fase resistente ao cianeto de potássio induz à fase respiratória sensível ao cianeto de potássio e inibe completamente a germinação, re



versivelmente. Sugere que nessa espécie hajam mecanismos respiratórios alternativos.

A germinação de *Cyathea delgadii* foi drasticamente afetada pelas temperaturas. As inibições causadas por temperaturas altas foram irreversíveis, mas não se sabe se ocorreu morte dos esporos. As temperaturas poderiam estar agindo principalmente a nível metabólico, nos esporos de *Cyathea delgadii*. Sabe-se que a fase de pré-indução é metabolicamente ativa. Essa fase envolveria uma série de etapas que tornariam o esporo preparado para receber o estímulo luminoso e germinar, quando em condições adequadas. Temperaturas devem atuar tanto na fase de pré-indução como na de pós-indução, considerando-se principalmente, que nessas fases processos enzimáticos e respiratórios estão ocorrendo.

Sementes de algumas espécies, cuja umidade é equilibrada em atmosfera saturada podem vir a germinar mais rápido. Por exemplo, sementes de *Allium porrum* que estiveram em equilíbrio com atmosfera saturada de umidade por 30 dias, a 10°C tiveram seu T 50 (dias para atingir metade da germinação final) reduzido de 8,5 para 0,5 (HEYDECKER e COOLBEAR, 1977). O pré-tratamento inicia a formação de compostos ricos em energia, aumenta o DNA e especialmente RNA, nas regiões de crescimento, diminui a atividade ribonucleásica e torna mais ativa a renovação da síntese proteica. Quando as sementes novamente são desidratadas até a umidade inicial, aumenta a atividade mitocondrial, melhora a preservação da ultraestrutura aliada às mudanças sequenciais na elasticidade e viscosidade do protoplasma. Isto é acompanhado da desrepressão de genes que conferem às plan-

tas resistência à desidratação, ao aquecimento, ao resfriamento e salinidade. Tais fatores tendem a desidratar o protoplasma (HEYDECKER e COOLBEAR, 1977).

Neste trabalho, esporos de *Cyathea delgadii* foram submetidos à pré-embebição em vapor de água durante uma semana, em condições ambientais. O objetivo do pré-tratamento foi verificar se havia aceleração do processo da germinação ou se o período de pré-indução seria alterado. A pré-embebição aumentou as porcentagens de germinação após 3 e 4 dias de embebição, em comparação aos esporos secos. O período de pré-indução foi reduzido para 24 horas e houve um nítido aumento da fotossensibilidade para esporos pré-embebidos em vapor de água. Após 48 horas, a germinabilidade desses esporos foi semelhante à encontrada para esporos secos. Após 72 e 96 horas de embebição no escuro houve uma diminuição da germinação, tanto para esporos pré-embebidos em vapor de água, quanto para esporos secos. Esporos pré-embebidos apresentaram valores de germinação maiores que os encontrados para esporos secos, quando receberam tratamentos luminosos diários de 1 minuto de duração. Nesse caso, os tratamentos foram iniciados após 24 horas de embebição no escuro (período de máxima fotossensibilidade). Quando os tratamentos luminosos diários foram fornecidos a esporos pré-embebidos após 48 horas de embebição no escuro, a germinabilidade foi menor do que a de esporos secos. Os esporos pré-embebidos tiveram redução da fotossensibilidade após esse período. Quando esporos pré-embebidos receberam tratamento luminoso de 8 horas de duração, após 24 horas de embebição no escuro, apresentaram resposta de germinação estatisticamente semelhante ao controle de luz contí-

nua. A promoção da germinação encontrada para esporos secos foi menor do que a de esporos pré-embebidos, após tratamento luminoso igual.

A pré-embebição em vapor de água durante uma semana poderia agir antecipando e sincronizando os processos metabólicos que devem ocorrer durante a fase de pré-indução. Também a hidratação do fitocromo parece ocorrer mais rapidamente, após o tratamento de pré-embebição, já que a fase de pré-indução no escuro foi reduzida para 24 horas, após esse tratamento. Observou-se que um maior número de esporos pré-embebidos germina após o tratamento luminosos de 1 minuto de duração, quando comparados aos esporos secos. Isto indica que houve aumento da fotossensibilidade. Duas hipóteses poderiam ser lançadas para explicar o aumento da fotossensibilidade:

- um "pool" maior de fitocromo FV ficaria disponível e sofreria fototransformação para FVe após o tratamento luminoso de curta duração. Como consequência, um maior número de esporos germinaria;

- dentro da amostra, um maior número de esporos teria atingido as condições metabólicas necessárias para a germinação, necessitando apenas do estímulo final complementar, fornecido pelo tratamento luminoso. Se for analisado o modelo proposto por SMITH (1975b), da existência de um composto S, já existente nas células, este poderia ser lentamente sintetizado durante a pré-embebição atingindo níveis maiores do que os encontrados em esporos secos. Um maior conteúdo de S estaria disponível para se associar ao FVe e formar Z, levando à germinação.

Outro fato observado foi que tanto esporos pré-embe

bidos em vapor de água quanto esporos secos, parecem entrar em dormência secundária após períodos prolongados de embebição no escuro. O processo parece ser mais rápido para esporos pré-embebidos, cuja germinabilidade diminui gradualmente após 24 horas de embebição no escuro. A dormência secundária é induzida em sementes de alface c.v. *Grand Rapids*, quando embebidas em água, no escuro, por vários dias (KHAN, 1980/81). Tratamento osmótico das sementes, na luz ou tratamento com ácido giberélico ( $GA_3$ ) no escuro, evitam a dormência secundária. Esses tratamentos aceleram a germinação. O tratamento osmótico causa um aumento da formação de polirribossomos e aumenta a incorporação de leucina  $^{14}C$ . O autor sugere que a luz e talvez o hormônio, durante o tratamento osmótico, acelerem a germinação por acelerarem a síntese de proteínas. Sugere também que giberelinas, citocininas e inibidores provavelmente estejam envolvidos na regulação das dormências primária e secundária de sementes. Talvez um processo semelhante poderia também ocorrer para esporos de samambaias.

Hipóteses alternativas são também propostas por SMITH (1975b) para explicar a dormência secundária ou foto-dormência de sementes. Ele sugere que o fitocromo FV poderia ser instável e poderia ser destruído se permanecesse nessa forma durante muito tempo. A irradiação subsequente com luz vermelha não causaria a formação de FVe suficiente para desencadear a germinação. Outra hipótese é a de que a substância S seria instável e dependeria de síntese contínua. Com o passar do tempo, a capacidade para sua síntese diminuiria e seu nível se tornaria muito reduzido para interagir com FVe. Também essas hipóteses parecem convenient-

tes para se tentar explicar a possível dormência secundária que parece ocorrer em esporos de *Cyathea delgadii*.

O tratamento osmótico de sementes é um método fisiológico que acelera a germinação de várias espécies. Soluções aquosas de polietilenoglicol, em determinada faixa de concentração, mostram um aumento linear do  $\psi_s$  (potencial osmótico), com o aumento da temperatura (MICHEL e KAUFMANN, 1973). HEYDECKER *et al.* (1975) submeteram sementes de várias espécies de hortaliças ao tratamento osmótico em soluções de polietilenoglicol 6000, a -12,3, -11,6 e -10,8 bars, nas temperaturas de 10, 15 e 20°C respectivamente. Observaram que esse tratamento reduz o tempo de germinação das sementes testadas. HEYDECKER e WAINWRIGHT (1976) trataram osmoticamente sementes de *Cyclamen persicum* em soluções de polietilenoglicol -8,0 e -11,0 bars (241 e 288 g PEG 6000 por 1 Kg de água) a 15°C, durante 3, 4 e 5 semanas. Observaram que a velocidade de germinação aumentou progressivamente, quanto maior o tempo de tratamento. Não houve diminuição na porcentagem de germinação.

Várias alterações bioquímicas parecem ocorrer durante o tratamento osmótico. Para sementes fotoblásticas positivas o tratamento deve ser realizado na presença de luz. Segundo KHAN *et al.* (1980/81), uma ação contínua e ininterrupta de FVe é necessária para se alcançar o máximo efeito do tratamento osmótico. Os autores verificaram que em sementes de alface o tratamento causa uma aceleração no tempo de síntese de RNA, bem como um aumento na síntese de RNA. Sementes de alface tratadas osmoticamente, na luz, por 14 dias, mostram aceleração da formação de polirribossomos e incorporação de leucina  $^{14}C$  em proteínas durante incuba

ção a 25°C. Foi observada também a ativação ou síntese de diversas enzimas, incluindo fosfatases ácidas e esterases. O GA<sub>3</sub> a 50 µM durante o tratamento osmótico aumenta também a atividade de enzimas. O tratamento osmótico poderia afetar processos metabólicos chave, relacionados com a quebra de moléculas de proteínas e lipídios e a reciclagem de ésteres fosfatados.

Esporos de *Cyathea delgadii* pré-embebidos em solução osmótica de PEG 6000 durante uma semana, sob luz contínua, apresentaram aceleração da germinação, do segundo ao quinto dia de embebição em solução nutritiva, em comparação ao controle (esporos que não foram tratados osmoticamente). Entretanto, a germinação final foi menor que a do controle. Tratamentos osmóticos mais prolongados causaram inibição da germinação final. Ocorreu grande contaminação por fungos, após tratamentos prolongados, que poderiam ser nocivos aos esporos. A temperatura de 15°C utilizada para o tratamento osmótico, poderia talvez causar uma termodormência quando fornecida durante um período muito longo. Outra possibilidade é a de que os tratamentos osmóticos longos tenham causado a morte de muitos esporos da amostra.

Os esporos de samambaias poderão servir como material para o estudo de alterações fisiológicas a nível celular, que ocorrem após os tratamentos osmóticos.

SUGAI e FURUYA (1968) verificaram que a reversão da inibição da germinação de esporos de *Pteris vittata* causada pela luz azul, era obtida por luz vermelha contínua. O efeito da luz vermelha não era afetado pela presença de CMU (3-(*p*-clorofenil) - 1,1 - dimetiluréia). Sugeriram que

esse processo não estava relacionado à fotossíntese.

TOWILL e IKUMA (1973) estudaram o espectro de ação do fotocontrole da germinação de esporos de *Onoclea sensibilis* L. O espectro de absorção dos esporos intactos revelou a presença de clorofila e carotenóides. Esporos embebidos em soluções de DCMU (3-4 diclorofenildimetilurêia) nas concentrações de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  M durante o período de germinação, não sofreram inibição, exceto esporos embebidos em DCMU a  $10^{-4}$  M e irradiados com luz azul. Os autores sugeriram que os processos fotossintéticos não estariam envolvidos na germinação.

ZILBERSTEIN *et al.* (1984a), observaram que em esporos de *Pteris vittata*, a formação de clorofila é um processo induzido pelo fitocromo. O processo ocorre no escuro, após irradiações curtas de luz vermelha e precede a primeira divisão e a protrusão do rizóide. A formação de clorofila nos esporos mantidos no escuro, difere da síntese de clorofila mediada pela luz em angiospermas e gimnospermas, onde o processo é enzimático, ainda que apresente uma fase dependente da fotoconversão de fitocromo.

O DCMU na concentração de  $10^{-4}$  M causou inibição da germinação de esporos de *Cyathea delgadii* em luz contínua. Isto poderia significar que a energia fornecida pela fosforilação fotossintética seria também utilizada durante a germinação. Esporos secos (não pré-embebidos em vapor de água) necessitam de tratamentos luminosos muito longos (48 horas ou mais) para atingirem os valores de germinação alcançados pelos tratamentos de luz contínua. Esporos pré-embebidos em vapor de água atingem germinabilidade semelhante à obtida em luz contínua após tra-

tamentos de 8 horas de luz ou após tratamentos diários de 1 minuto. A embebição em vapor de água, poderia atuar sincronizando e aumentando a síntese de clorofila, após os tratamentos luminosos realizados depois do período de pré-indução. Isto poderia aumentar o suprimento energético e favoreceria a sincronização da germinação.

O peso fresco de esporos de *Cyathea delgadii* não variou entre esporos no dia 0 e após 7 dias de germinação. Entretanto, o peso seco sofreu uma grande redução nesse período. Esses dados indicam que nessa fase há grande consumo de substâncias de reserva e ao mesmo tempo, grande absorção de água. Após 14 dias, observa-se aumento no peso fresco e no peso seco, possivelmente por que os gametófitos já se encontram em fase de síntese de metabólitos.

Os lipídios livres constituem cerca de 43% do peso fresco dos esporos secos de *Cyathea delgadii*. A proporção em relação ao peso seco é praticamente a mesma, visto que esporos secos apresentam apenas 5% de água. O conteúdo de lipídios é reduzido para quase metade, após 7 dias de embebição e nessa fase, parece atingir a estabilidade. O conteúdo pouco se altera após 14 dias. Os dados indicam que há grande consumo de lipídios durante a germinação, o que acarreta uma grande diminuição no peso seco dos esporos.

O espectro de transmissão de luz do óleo de esporos revelou que há absorção total da luz azul. O mesmo ocorre para óleo bruto de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*). Entretanto, os dois óleos apresentaram padrões diferentes de transmissão. O óleo de esporos é muito viscoso e apresentou uma queda da transmissão na região da luz vermelha (660 nm). A grande absorção da luz azul pode ser devida à



concentração de carotenóides nesses óleos. Aventou-se a possibilidade do óleo atuar como filtro de luz dentro desses esporos. O fitocromo de protonemas de *Adiantum capillus veneris* parece estar localizado na membrana plasmática ou no ectoplasma (WADA *et al.*, 1983). Sendo assim, parte da luz incidiria inicialmente sobre algumas dessas moléculas e parte deveria ultrapassar o conteúdo citoplasmático para atingir o pigmento. Isto dependeria da posição do esporo. É importante observar que a maior transmissão ocorre na faixa da luz vermelha e do vermelho extremo, nesse óleo.

A cromatografia gasosa do óleo de esporos revelou que o principal ácido graxo constituinte é o ácido oléico, seguido do ácido palmítico e do linoléico.

Esporos de *Anemia phyllitidis* contêm 56% de lipídios, dos quais 86% são triglicerídios. Os maiores componentes dos triglicerídios são os ácidos oléico e linoléico, seguidos do ácido palmítico (GEMMICH, 1977). O autor observou que em esporos embebidos, o conteúdo de lipídios totais diminuiu imediatamente após a indução da germinação. Após 12 dias, a mobilização dos lipídios de reserva e a síntese de novos lipídios atingiram o equilíbrio. Mais de 50% dos lipídios totais foram metabolizados nesse período.

Em *Pteris vittata*, GEMMICH (1979), observou que os lipídios constituem 42% do peso seco dos esporos. Cerca de 50% desses lipídios já foram metabolizados após 10 dias e nesse período ocorre o equilíbrio entre mobilização e síntese.

Em esporos secos de *Adiantum capillus-veneris* L., os lipídios também constituem cerca de 47% do peso fresco de esporos. Mais de 50% desses lipídios são consumidos após

10 dias de embebição para a germinação. O peso seco dos esporos também foi reduzido para menos da metade do original, após 10 dias de embebição (MINAMIKAWA *et al.*, 1984).

DEMAGGIO e STETLER (1985), apresentaram resultados bioquímicos sobre esporos clorofilados de *Onoclea sensibilis* e *Matteuccia struthiopteris* e não clorofilados de *Dryopteris filix-mas*. Em *Onoclea* e *Matteuccia*, os lipídios constituem 27% do peso dos esporos e em *Dryopteris*, aproximadamente 40%. Durante a embebição, os lipídios foram hidrolizados e após a germinação diminuíram 12,5% em *Onoclea* e *Matteuccia* e quase 50% em *Dryopteris*.

Os esporos de *Cyathea delgadii* assemelham-se mais aos padrões de distribuição e mobilização de lipídios, encontrados em *Anemia phyllitidis*, *Pteris vittata*, *Adiantum capillus-veneris* e *Dryopteris filix-mas*.

Os esporos secos de *Cyathea delgadii* não são clorofilados, como os esporos de *Dryopteris filix-mas*. Após 7 dias de germinação foram encontrados 5,3 µg de clorofila por mg de peso seco de esporos e após 14 dias, 27 µg por mg de peso seco de esporos. Esporos secos de *Pteris vittata* (GEMMICH, 1980), também não apresentam clorofila. Após 2 ou 3 dias de embebição, foram detectados 60 µg de clorofila por grama de esporos. O conteúdo de clorofila encontrado para essa espécie após 7 dias e 15 dias foi semelhante ao encontrado para esporos de *Cyathea delgadii*.

As proteínas solúveis representam 1,2% do peso seco dos esporos secos de *Cyathea delgadii*. Após 7 dias esse conteúdo aumenta para 5,4% e após 14 dias, para 9,8%. Observa-se que ocorreu síntese de proteínas durante a germinação de *Cyathea delgadii*.

A síntese de proteínas durante a germinação de esporos já foi verificada para diversas espécies de pteridófitas. RAGHAVAN (1976, 1977b) utilizando timidina  $^3\text{H}$  e leucina  $^3\text{H}$ , observou síntese de ácidos nucleicos e proteínas durante a germinação de esporos de *Anemia phyllitidis*, induzida pelo ácido giberélico. Ele sugere que a síntese contínua de proteínas é essencial para a hidrólise do material de reserva, aumento do protoplasto, divisão do núcleo do esporo e formação da célula protonemal durante a germinação. Em esporos de *Pteris vittata*, cuja germinação é induzida por radiações curtas de luz vermelha, RAGHAVAN (1977a) observou a hidrólise dos grânulos de proteína de reserva, 12 horas após a radiação. A síntese de proteínas foi verificada pela incorporação de leucina  $^3\text{H}$  no núcleo e no citoplasma, durante as etapas iniciais da germinação. NAGATANI *et al.* (1983) observaram a incorporação de aminoácidos  $^{14}\text{C}$  durante a germinação de esporos fotoinduzidos de *Adiantum capillus-veneris*. ZILBERSTEIN *et al.* (1984b) também observaram incorporação de metionina  $^{35}\text{S}$  em proteínas de 30.000 d e 48.000 d, após 16 horas da fotoindução, em esporos de *Pteris vittata*. Durante a germinação de esporos de *Onoclea sensibilis* HUCKABY e MILLER (1984) estudaram as proteínas solúveis de rizóides e de células protonemais. As proteínas solúveis encontradas nos rizóides foram quantitativamente diferentes nos rizóides. Eles sugerem que devam ocorrer proteínas específicas de rizóides. A diferença na composição de proteínas solúveis em rizóides e células protonemais sugere uma distribuição diferencial de organelas entre as duas células bem como síntese diferencial de proteínas no

citoplasma dessas duas células.

Em espécies como *Onoclea sensibilis*, *Matteuccia struthiopteris* e *Dryopteris filix-mas* as proteínas constituem 14%, 15% e 5% do peso dos esporos, respectivamente. Nesses casos, elas atuam também como material de reserva. Durante o início da germinação, há redução de 80% das proteínas de reserva (DEMAGGIO e STETLER, 1985).

Os açúcares e polissacarídeos solúveis constituem 1,9% do peso seco do esporo seco de *Cyathea delgadii*. O conteúdo destes diminuiu após 7 dias de germinação, indicando que houve consumo de parte desses açúcares durante essa fase. No 14º dia houve um nítido aumento dos açúcares solúveis totais.

O conteúdo de açúcares redutores é muito baixo para esporos secos de *Cyathea delgadii*, correspondente a cerca de 0,1% do peso seco dos esporos. O conteúdo destes aumenta após 7 dias de germinação, embora continue baixo (cerca de 0,4% do peso seco dos esporos).

Ocorre amido em quantidades muito pequenas nos esporos secos de *Cyathea delgadii* (cerca de 0,4% do peso seco dos esporos). Houve um pequeno aumento de amido após 7 dias de embebição para a germinação e após 14 dias, houve um grande aumento no conteúdo de amido (aumento de cerca de 10 vezes).

TOWILL (1980, 1985) mostrou que em esporos de *Onoclea sensibilis*, a irradiação com luz vermelha, durante 3 minutos, acelera o acúmulo de amido e aumenta a germinação dos esporos. Sugeriu que um fotorreceptor comum é o mediador da germinação foinduzida e do acúmulo de amido. Observou também que esses esporos apresentam reserva de sacaro-

se. A sacarose é degradada e o amido é sintetizado durante a germinação, enquanto os lipídios seriam mobilizados durante o desenvolvimento inicial do gametófito. A degradação da sacarose e a síntese de amido não estão relacionadas nessa espécie. A degradação da sacarose é aumentada pela luz e pode ocorrer sem a síntese de amido. A fotoindução da síntese de amido pode, por outro lado, ocorrer sem a degradação da sacarose. Os dois processos parecem ser independentes.

MINAMIKAWA *et al.* (1984) observaram uma redução no conteúdo de açúcares totais e açúcares redutores, durante a germinação de esporos de *Adiantum capillus-veneris*. Sugeriram que os açúcares solúveis, incluindo os açúcares redutores poderiam participar como fornecedores de carbono e como fontes de energia durante o período de embebição, quando as vias de degradação dos lipídios não estariam ainda em plena atividade.

Em esporos de *Cyathea delgadii*, os açúcares solúveis totais poderiam atuar também como fonte de carbono e de energia durante os primeiros dias da germinação. Açúcares redutores começariam a ser sintetizados durante a germinação, ou poderiam se originar da hidrólise dos açúcares totais. Após 7 dias, ocorre aumento de amido. Este poderia estar relacionado com a síntese de novas fontes de carbono ou com processos de hidrólise dos açúcares totais.

A hematoxilina-eosina foi usada para uma visualização geral dos esporos secos e após 4 e 7 dias de embebição para a germinação. A eosina é um corante ácido e se liga aos radicais positivos e a hematoxilina atua como corante básico, evidenciando geralmente o conteúdo nuclear e radi-

cais negativos (LISON, 1953; POLICARD *et al.*, 1957). Por esse método, os esporos de *Cyathia delgadii* apresentaram seu citoplasma granular e corado pela eosina. Os núcleos e as exinas foram mais evidenciados pela coloração com hematoxilina. Os rizóides do material germinado apresentaram suas paredes coradas pela hematoxilina, evidenciando a presença de radicais negativos.

O azul de toluidina é um corante básico portador de radicais  $\text{NH}_3^+$  livres em sua molécula, ligando-se portanto a grupos aniônicos, destacando-se grupos fosfato ( $-\text{PO}_4^{--}$ ), carboxila ( $-\text{COO}^-$ ) e sulfato ( $-\text{SO}_3^-$ ) (KIERNAN, 1981; VIDAL, 1977).

Soluções de azul de toluidina (AT) em água, na concentração de  $10^{-7}\text{M}$  apresentam coloração azul claro com pico de absorção a 635 nm. O aumento da concentração para a  $10^{-6}\text{M}$  provoca um abaixamento dos valores de absorbância, ocorrendo um hipocromismo. Um aumento subsequente da concentração de  $10^{-6}\text{M}$  a  $10^{-4}\text{M}$  acentua o hipocromismo a 635 nm e surge um novo pico de absorção a 590-598 nm. Esse fenômeno é denominado metacromasia. É um evento espectral caracterizado por um abaixamento do pico da absorção, acompanhado pelo deslocamento do pico para comprimentos de onda mais curtos (deslocamento hipsocrômico). Em células e tecidos, as estruturas metacromáticas apresentam-se róseo-avermelhadas, enquanto as ortocromáticas em azul ou esverdeadas. Uma das causas para a manifestação do evento é a formação de dímeros, trímeros e tetrâmeros por empilhamento das moléculas do corante. A metacromasia dos tecidos torna-se mais evidente quanto maior o número disponível e a proximidade dos grupos aniônicos (VIDAL, 1987).

Cortes de esporos secos de *Cyathea delgadii* corados por esse método apresentaram os núcleos evidenciados em azul e o citoplasma pouco corado. Durante a germinação foi notado um aumento na metacromasia do conteúdo citoplasmático das células protonemais e rizoidais. As paredes celulares dos rizóides de gametófitos com 7 dias de germinação foram intensamente coradas, salientando a metacromasia. O aumento da metacromasia indica que houve um aumento da disponibilidade de radicais negativos durante a germinação, possivelmente devido à síntese de ácidos nucleicos (RNA) e seu acúmulo citoplasmático. Isto possibilitou um maior empilhamento das moléculas do corante e consequente diminuição no seu pico de absorção quando ligado ao material "in situ". Fenômeno semelhante foi observado em cotilédones de sementes de soja (*Glycine max*), durante a germinação (CORTELAZZO, 1986).

A metacromasia que ocorre em rizóides de gametófitos jovens de *Cyathea delgadii* deve estar relacionada a processos de alongamento celular; já que os rizóides encontram-se em fase de crescimento.

Paredes celulares jovens são ricas em pectinas e há pouca celulose. Também contém uma glicoproteína rica em aminoácido hidroxiprolina. Em paredes celulares de *Acer pseudoplatanus* e *Lycopersicum esculentum*, a hidroxiprolina está ligada covalentemente a resíduos de arabinose. Essa glicoproteína já foi chamada de "extensina", mas ainda não há evidências de que esteja envolvida no controle do alongamento de paredes celulares. Evidências indicam que a glicoproteína não se liga covalentemente a nenhum outro políme-

ro componente da parede celular. O processo de alongamento celular é altamente complexo e controlado por hormônios vegetais como auxinas, giberelinas e citocininas. Fatores como transporte de água, diferenças de potencial osmótico e de turgescência e extensibilidade da parede celular também controlam o alongamento celular. As auxinas parecem causar afrouxamento da parede celular e crescimento em diversas variedades de tecidos caulinares. A teoria para explicar a ação da auxina considera que ligações químicas entre os polímeros da parede celular seriam quebradas em resposta à excreção de prótons  $H^+$  do local. Condições ácidas promoveriam o afrouxamento das paredes. O abaixamento do pH poderia enfraquecer certas interações iônicas, como as que envolvem grupos carboxilas ou outros, influenciando as pontes de hidrogênio e certos tipos de associações hidrofóbicas. Há evidências que respaldam a teoria "ácida" do crescimento celular. Entretanto, há dificuldades no que concerne ao período em que o pH abaixa e os meios que induzem a esse abaixamento (HALL *et al.*, 1984).

Um abaixamento do pH das paredes celulares de rizóides de gametófitos de *Cyathea delgadii*, poderia estar ocorrendo devido aos processos de alongamento celular. Este evento favoreceria possivelmente, a liberação de radicais aniônicos, levando ao maior empilhamento das moléculas de azul de toluidina, com aparecimento da metacromasia.

Esporos não germinados e observados em luz polarizada com analisador e polarizador cruzados apresentaram birrefringência das exinas e presença de alguns grânulos de amido no interior. A birrefringência ocorre quando o material apresenta duas direções de propagação da luz, com um



Índice de refração para cada uma delas (VIDAL, 1987). A birrefringência apresentada pelas paredes dos esporos foi menor na região da cicatriz, indicando um menor adensamento dos biopolímeros nessa região que se rompe durante a germinação.

Xylidine ponceau é um corante ácido cujas moléculas possuem o grupamento  $-SO_3^-$  livre, sendo portanto utilizado para a detecção de proteínas totais, ligando-se aos radicais amino das mesmas, que se encontram protonados no pH 2,5 utilizado para a coloração (VIDAL, 1970).

Cortes de esporos secos de *Cyathea delgadii* corados por esse corante revelaram a presença de corpos protéicos globulares no interior. Foi observada uma gradativa perda do padrão globular do material corado, nas células protoneis, durante a germinação. Presença de proteínas foi detectada no interior dos rizóides de gametófitos intactos com 7 dias de embebição. Durante a germinação, o material parece também se deslocar em direção à cicatriz e rizóide. Os tratamentos enzimáticos com pepsina ou tripsina confirmaram a presença de proteínas em esporos secos e gametófitos jovens. As extrações foram, no entanto, mais eficientes para o material germinado. Possivelmente devido ao desarranjo dos corpos protéicos observado durante a germinação, a atuação das enzimas foi mais eficiente nesse material. Durante a germinação observou-se um aumento na intensidade de coloração do material evidenciado pelo xylidine ponceau. Este fato indica que houve síntese de proteínas durante os primeiros 7 dias de embebição para a germinação, em esporos de *Cyathea delgadii*. O aumento no conteúdo de proteínas solúveis durante a germinação desses esporos foi verificado por meio de dosagens bioquímicas.

O desarranjo dos corpos protéicos verificado durante

a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* foi observado também para células de cotiledones de soja (*Glycine max*) durante a germinação indicando transferência desse material dos locais de reserva para os locais de crescimento (CORTE LAZZO, 1986).

O aumento na metacromasia e a diferença no padrão das proteínas durante a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* foram graduais. Essas alterações foram observadas também para esporos com 4 dias de embebição, que não foram apresentados neste trabalho. Tais eventos puderam ser notados com nitidez no material com 7 dias de embebição.

De um modo geral, os trabalhos sobre a citologia de esporos de pteridófitas dão mais ênfase aos padrões de divisão celular.

RAGHAVAN (1976) estudou aspectos da morfologia celular e síntese de macromoléculas durante a germinação de esporos de *Pteris vittata*. O autor fixou o material em solução a 10% de acroleína, a 5°C, durante a noite. A desidratação foi feita iniciando em metil celosolve e após, os esporos foram embebidos em glicol metacrilato. Colorações foram feitas com azure B ou azul de toluidina. Foi usada autoradiografia para o estudo da síntese de RNA, DNA e proteínas.

O estudo citoquímico da germinação de esporos de *Anemia phyllitides* foi também feita por RAGHAVAN (1976). Foi usado o mesmo método de fixação utilizado para esporos de *Pteris vittata*. O autor utilizou também o azure B (para detectar RNA e DNA), reagente de Feulgen (para detecção de DNA), ácido-periódico de Schiff (PAS) para detecção de açúcares insolúveis. Para detecção de proteínas, utilizou o

azul de bromofenol mercúrico e anilina azul black. Métodos de autoradiografia foram também usados para o estudo da síntese de DNA, RNA e proteínas.

Resultados desses dois trabalhos mostram grânulos de vários tamanhos e formatos que reagem positivamente aos corantes para detecção de proteínas em ambas as espécies. A síntese de DNA, RNA e proteínas ocorre durante a germinação dessas espécies. Lipídios não foram visualizados após as preparações citológicas.

RAGHAVAN (1980) apresentou os resultados de estudos citológicos realizados para esporos de diversas espécies de pteridófitas. As principais conclusões são que os esporos são estruturas extremamente secas, com um núcleo rodeado por uma série de organelas e grânulos de reserva. O núcleo ovalado é constituído principalmente de cromatina desidratada. As espécies citadas pelo autor são *Osmunda regalis*, *Matteuccia struthiopteris*, *Onoclea sensibilis*, *Pteris vittata*, *Anemia phyllitidis*, *Lygodium japonicum* e *Thelypteris dentata*.

HUCKABY e RAGHAVAN (1981b) estudaram o padrão de germinação de esporos de espécies de pteridófitas pertencentes aos gêneros *Cyathea* e *Dicksonia*. Tanto para *Cyathea australis* como para *Cyathea cooperi*, a germinação se inicia aparentemente pela abertura da exina após 3 dias sob luz vermelha ou vários dias sob luz branca. A exina se rompe no polo proximal (região da cicatriz) do esporo tetraédrico, ao longo dos braços do trilete. O rizóide se forma após uma divisão assimétrica do esporo, pela formação de uma parede paralela ao plano equatorial (base do esporo). O padrão de abertura da exina e formação do rizóide, em es

poros de *Cyathea delgadii* parece ser semelhante ao encontrado nessas espécies.

Neste trabalho, os esporos foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,2M a pH 7,4 e glutaraldeído a 5% (KIERNAN, 1981). Os métodos de desidratação e inclusão em parafina são os métodos convencionais de processamento. Entretanto, foi possível se obter cortes dos esporos, com 8  $\mu$ m de espessura. Os corantes, hematoxilina-eosina, azul de toluidina e xylidine ponceau utilizados permitiram evidenciar núcleos, estruturas citoplasmáticas granulares globosas, corpos protéicos, grãos de amido e detecções de alterações do padrão de proteínas bem como aumento de metacromasia durante a germinação. Lipídios não foram evidenciados pois foram provavelmente extraídos durante o processo de desidratação.

- R E S U M O -

As pteridófitas representam um grupo que produz esporos potencialmente úteis para análises fisiológicas e bioquímicas da germinação. No Brasil, há poucos estudos sobre a germinação de esporos de samambaias. Decidiu-se então realizar estudos dos aspectos da fotomorfogênese de esporos de *Cyathea delgadii*, cuja germinação é dependente de luz. Estudou-se também aspectos da mobilização e síntese de metabólitos durante a germinação. Paralelamente, foram feitos estudos citoquímicos.

A germinação foi realizada em meio de cultura líquida, em câmara de crescimento, com temperatura e luz controladas. Foi verificada a germinação sob luz branca constante para esporos coletados em diferentes épocas do ano. Efeito de tratamentos luminosos curtos únicos ou intermitentes e de tratamentos luminosos longos foi verificado em esporos secos e em esporos pré-embebidos em vapor de água, utilizando-se diferentes fontes luminosas. Foi observada a reversão do efeito da luz vermelha pelo vermelho extremo. Efeito de luz azul foi estudado. Esporos foram pré-embebidos em solução osmótica de polietilenoglicol e seu efeito na germinação sob luz branca foi estudado. Efeito de DCMU tam-

bem foi estudado. Verificou-se o efeito de temperaturas constantes e temperaturas alternadas para esporos que receberam tratamentos luminosos indutores de curta duração.

Extrações e dosagens de lipídios, clorofila, proteínas, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e amido foram, realizadas para esporos secos e após 7 e 11 dias de embebição para a germinação, sob luz branca contínua a 25°C.

Estudos citoquímicos para detecção de radicais aniônicos e radicais catiônicos totais foram realizados para esporos secos e após 4 e 7 dias de embebição sob luz branca contínua, a 25°C.

Os esporos são produzidos durante o ano inteiro. Em geral, a germinação começa a partir do 30 dia de embebição e no 70 dia atinge a estabilidade.

A germinação dos esporos ocorre após tratamentos curtos únicos de luz, em baixas porcentagens. Tratamentos luminosos curtos diários induzem taxas altas de germinação. O efeito desses tratamentos é semelhante a tratamentos de longa duração (4 a 8 horas de luz) fornecidos após o período de pré-indução.

O período de pré-indução é de 48 horas de embebição, para esporos secos e se reduz para 24 horas para esporos pré-embebidos em vapor de água durante uma semana.

A pré-embebição em vapor de água também aumenta a fotossensibilidade dos esporos. Estes apresentam porcentagens de germinação muito maiores que as observadas para esporos secos, após tratamentos luminosos de curta duração.

Tanto a fase de pré-indução quanto a fase de pós-

indução são drasticamente afetadas pela temperatura. Temperaturas abaixo de 25°C reduzem a germinação. Temperaturas altas (35, 40 e 45°C) causam inibição total e irreversível da germinação.

Tratamentos longos de luz azul causam uma promoção muito pequena da germinação. A luz azul não impede a manifestação do efeito da luz vermelha.

A pré-umbebição em solução osmótica de polietilenoglicol durante uma semana acelerou a germinação dos esporos, mas causou redução na porcentagem final da germinação. Tratamentos osmóticos mais prolongados reduziram bastante a germinabilidade desses esporos.

O DCMU nas concentrações de  $10^{-3}$  M e  $10^{-4}$  M, causou inibição da germinação.

O peso seco dos esporos diminui em quase 50% durante os 7 primeiros dias de umbebição. O peso fresco se mantém constante nesse período. Após 14 dias, os pesos seco e fresco começam a aumentar.

Os lipídios livres constituem mais de 40% do peso seco dos esporos de *Cyathea delgadii*. Cerca de 50% desses lipídios são consumidos durante o início da germinação.

As proteínas solúveis são sintetizadas durante a germinação.

Açúcares solúveis totais diminuem durante a primeira semana. Após duas semanas há um grande aumento no conteúdo desses açúcares. Açúcares redutores que constituem parcela muito pequena dos açúcares totais, aumentam durante a germinação. Amido também ocorre em pequenas quantidades no esporo seco e aumenta durante a germinação.

Esporos secos de *Cyathea delgadii* não contêm clorofila.

Cortes de esporos secos e após 7 dias de embebição para a germinação, corados pela hematoxilina-eosina apresentaram citoplasma granular globoso. Os núcleos foram evidenciados por essa coloração.

Cortes corados pelo azul de toluidina a pH 4,0 apresentaram os núcleos corados em azul. Durante a germinação, ocorre um aumento da metacromasia, indicando maior disponibilidade de radicais aniônicos.

A coloração pelo xylidine ponceau, a pH 2,5 mostrou a presença de corpos protéicos em cortes de esporos secos de *Cyathea delgadii*. Durante a germinação há um desarranjo desses corpos protéicos. A presença das proteínas foi confirmada por digestões enzimáticas com pepsina ou tripsina.



- LITERATURA CITADA -

- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24: 1-15, 1949.
- BIELESKI, R.L. & TURNER, N.A. Separation and estimation of aminoacids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.*, 17: 278-93, 1966.
- BUTLER, W.L., LANE, H.C. & SIEGELMAN, H.W. Nonphotochemical transformation of phytochrome in vivo. *Plant Physiol.*, 38: 514-19, 1963.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-54, 1976.
- CESAR, C.L., VARGAS, H., LIMA, C.A.S., MENDES FILHO, J. & MIRANDA, C.M. On the use of photoacoustic spectroscopy for investigating adulterated or altered powdered coffee samples. *J. Agric. Food Chem.*, 32: 1355-8, 1984.

CHEN, C.Y. & IKUMA, H. Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores. V. Analysis of germination processes by means of temperature. *Plant Physiol.*, 63: 704-8, 1979.

CORTELAZZO, A.L. Proteínas cotiledonares de soja: detecção "in situ" e mobilização durante a germinação. Universidade Estadual de Campinas. 1986. Tese de mestrado.

DEMAGGIO, A.E. & GREENE, C. Biochemistry of fern spore germination. Glyoxylate and glycolate cycle activity in *Onoclea sensibilis* L. *Plant Physiol.*, 66: 922-4, 1980.

----- & STETLER, P.A. Mobilization of storage reserves during fern spore germination. *Proc. R. Soc. Edinb.*, 86B: 195-202, 1985.

DYER, A.F. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In: ----- *The experimental biology of ferns*. London, Academic, 1979. p.253-305.

ESTEVES, L.M. Morfologia e germinação de esporos de *Trichipteris corcovadensis*. Universidade Estadual de Campinas, 1984. Tese de Mestrado.

----- Germinação em espécies dos cerrados: Pteridófitas. In: Congresso Nacional de Botânica, 36., Curitiba, 1985. Curitiba, SBB, 1987. *Anais* (no prelo).

ESTEVES, L.M. & FELIPPE, G.M. Germinação de *Trichipteris corcovadensis*. In: Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, 2., Jaboticabal, 1982. Jaboticabal, UNESP, 1982. *Resumos* p.18-19.

----- & ----- Germinação de esporos de *Trichipteris corcovadensis*. *Cienc. Cult.*, São Paulo, 35 (7: supl.), 751, 1983a.

----- & ----- Morfologia e germinação de esporos de *Trichipteris corcovadensis*. In: Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, 3., Rio Claro, 1983b. Rio Claro, UNESP, 1983. *Programa e Resumos* p.44.

----- & ----- Efeito de luz na germinação de *Polypodium latipes* Langs e Fisch. In: Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, 4., Taubaté, 1984. Taubaté, Universidade Municipal, 1984. *Programa e Resumos* p.47.

----- & ----- Fotossensibilidade de esporos de pteridófitas dos cerrados. *Rev. Bras. Bot.*, 8: 219-22, 1985a.

----- & ----- Germinação de esporos de pteridófitas dos cerrados: *Polypodium latipes*. *Cienc. Cult.*, São Paulo, 37 (7: supl.), 839-40, 1985b.

----- & ----- Efeito da temperatura na germinação de esporos de *Polypodium latipes*. In: Congresso Anual da Sociedade Botânica de São Paulo, 5., Botucatu, 1985c, Botucatu, UNESP, 1985, p.106.

- ESTEVES, L.M. & FELIPPE, G.M. Efeito de luz e temperatura na germinação de *Polypodium latipes*. In: Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, Botucatu, 1985. Botucatu, SBSP, 1987. *Anais* (no prelo).
- , ----- & MELHEM, T.S. Germination and morphology of spores of *Trichipteris corcovadensis*. *Am. Fern J.*, 75: 92-102, 1985.
- FELIPPE, G.M., ESTEVES, L.M., FERREIRA, W.M. & MELHEM, T.S. Spores germination of two tree-ferns. *Proc. R. Soc. Edinb.*, 86B: 450-1, 1985.
- FISHER, R.A. & YATES, F. *Tabelas estatísticas para pesquisa em Biologia, Medicina e Agricultura*, São Paulo. Ed. Polígono e EDUSP, 1971. 150p.
- FURUYA, M. Photomorphogenesis in Ferns. In: SHROPSHIRE JR., W. & MOHR, H. ed. *Photomorphogenesis*. Berlin, Springer-Verlag, 1983. p. 569-600. (Encyclopedia of plant physiology. New Series, v. 16B).
- Photocontrol of spore germination and elementary processes of development in fern gametophytes. *Proc. R. Soc. Edinb.*, 86B: 13-9, 1985.
- , KADOTA, A. & UEMATSU-KANEDA Percent  $P_{FR}$ -dependent germination of spores in *Pteris vittata*. *Plant Cell Physiol.*, 23: 1213-7, 1982.

GEMMRICH, A.R. Mobilization of reserve lipids in germinating spores of the fern *Anemia phyllitidis* L. *Plant Sci. Lett.*, 9: 301-7, 1977.

----- Developmental changes in microbody enzyme activities in germinating spores of the fern *Pteris vittata* Z.. *Pflanzenphysiol.*, 97: 153-60, 1980.

----- Effect of red light and gibberellic acid on lipid metabolism in germinating spores of the fern *Anemia phyllitidis*. *Physiol. Plant.*, 54: 58-62, 1982.

HALL, J.L., FLOWERS, T.J. & ROBERTS, R.M. Cell walls. In: ----- *Plant cell structure and metabolism*. 2. ed. London, Longman, 1984. p.430-72.

HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl sters from lipids. *Lab. Prac.*, 1: 475-6, 1973.

HEYDECHER, W. & COOLBEAR, P. Seed treatments for improved performance-survey and attempted prognosis. *Seed Sci. Technol.*, 5: 353-425, 1977.

----- & WAINWRIGHT, H. More rapid and uniform germination of *Cyclamen persicum* L. *Sci. Hort.*, 5: 183-9, 1976.

-----, HIGGINS, J. & TIRNER, Y.J. Invigoration of seeds? *Seed Sci. Technol.*, 3: 881-8, 1975.

HUCKABY, C.S. & MILLER, J.H. Spore germination and rhizoid differentiation in *Onoclea sensibilis*. *Plant Physiol.*, 74: 656-62, 1984.

----- & RAGHAVAN, V. Photocontrol of spore germination in the fern *Thelypteris kunthii*. *Physiol. Plant.*, 51: 19-22, 1981a.

----- & ----- Spore germination patterns in the ferns, *Cyathea* and *Dicksonia*. *Ann. Bot.*, 47: 397-403, 1981b.

JARVIS, S.J. & WILKINS, M.B. Photoresponses of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro. *J. Exp. Bot.*, 24(83): 1149-57, 1973.

KHAN, A.A. Hormonal regulation of primary and secondary seed dormancy. *Isr. J. Bot.*, 29: 207-24, 1980/1981.

KIERNAN, J.A. *Histological and histochemical methods: theory and practice*. London, Pergamon, 1981. 344p.

LISON, L. *Histochimie et cytochimie animales*. 2. ed. Paris, Gauthier-Villars, 1953. 607p.

MAIA, V. *Técnica histológica*. São Paulo, Atheneu, 1979, p.107-20.

MARCONDES-FERREIRA, W. Efeito de luz e temperatura na germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. Universidade Estadual de Campinas, 1983. Tese de mestrado.

----- & FELIPPE, G.M. Efeito de temperatura na germinação de *Cyathea delgadii*. *Cienc. Cult.*, São Paulo, 34 (7: supl.), 826-7, 1982a.

----- & ----- Efeito de luz e temperatura na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*. In: Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, Jaboticabal, 1982b. Jaboticabal, UNESP, 1982. *Programa e Resumos* p.18.

----- & ----- Effects of light and temperature on the germination of spores of *Cyathea delgadii*. *Rev. Bras. Bot.*, 7: 53-6, 1984.

MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. Factors affecting germination. In: ----- *The germination of seeds*. 3. ed. Oxford, Pergamon, 1982. p.22-49.

MCCREADY, R.M., GUGGOLZ, J., VERNON SILVIERA & OWENS, H.S. Determination of starch and amylose in vegetables. *Anal. Chem.*, 22: 1156-8, 1950.

MICHEL, B.E. Evaluation of the water potentials of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of the other solutes. *Plant Physiol.*, 72: 66-70, 1983.

----- & KAUFMANN, M.R. The osmotic potencial of polyethylene glycol 6000. *Plant. Physiol.*, 51: 914-6, 1973.

- MILLER, J.H. Fern gametophytes as experimental material. *Bot. Rev.*, 34: 361-440, 1968.
- MINAMIKAWA, T., KOSHIBA, T. & WADA, M. Compositional changes in germinating spores of *Adiantum capillus-veneris* L. *Bot. Mag.*, 97: 313-22, 1984.
- MOHR, H. Die Abhängigkeit des protonemawachstums und der protonemapolarität bei farnen vom licht. *Planta*, 47: 127-58, 1956.
- NAGATANI, A., SUZUKI, H. & FURUYA, M. Protein synthesis during photocontrolled progression of the cell cycle in single celled protonemata of the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Develop Growth. Differ.*, 25: 217-26, 1983.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153: 375-80, 1944.
- NORONHA, A., VICENTE, M. & FELIPPE, G.M. Photocontrol of germination of *Cucumis anguria* L. *Biol. Plant.*, 20: 281-286, 1978.
- PEARSE, E.A.G. The chemistry of fixation. In: -----  
*Histochemistry: theoretical and applied*. London,  
Churchill, 1961. p.70-105.



- POLICARD, A., BESSIS, A. & LOCQUIM, M. *Traité de microscopie; instruments et techniques*. Paris, 1967. 608p.
- RAGHAVAN, V. Blue light interference in the phytochrome-controlled germination of the spores of *Cheilanthes farinosa*. *Plant Physiol.*, 51: 306-11, 1973.
- Gibberellic acid-induced germination of spores of *Anemia phyllitidis*: nucleic acid and protein synthesis during germination. *Am. J. Bot.*, 63: 960-72, 1976.
- Gibberellic acid-induced germination of spores of *Anemia phyllitidis*: autoradiographic study of the timing and protein synthesis in relation to cell morphogenesis. *J. Cell. Sci.*, 23: 83-100, 1977a.
- Cell morphogenesis and macromolecule synthesis during phytochrome-controlled germination of spores of the fern *Pteris vittata*. *J. Exp. Bot.*, 28: 439-56, 1977b.
- Cytology, physiology, and biochemistry of fern spores. *Int. Rev. Cytology*, 62: 69-118, 1980.
- RANAL, M.A. Efeito da temperatura e da intensidade luminosa no desenvolvimento de gametófitos de pteridófitas. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, 1983. Tese de mestrado.

RANAL, M.A. Efeito de temperatura na germinação de esporos de pteridófitas ocorrentes em mata seca semidecídua do sudeste brasileiro. In: Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, 5., Botucatu, 1985. Botucatu, UNESP, 1985. *Resumos* p.127.

----- Efeito de intensidade luminosa na germinação de esporos de pteridófitas ocorrentes em mata seca semidecídua do sudeste brasileiro. In: Congresso Nacional de Botânica, 37., Ouro Preto, 1986. Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1986. *Resumos* p.190.

RANDI, A.M. Germinação de *Stevia rebaudiana* Bert. Universidade Estadual de Campinas, 1980. Tese de Mestrado.

----- & FELIPPE, G.M. Luz vermelha e a germinação de *Cyathea delgadii*. In: Congresso Anual da Sociedade Botânica de São Paulo, 5., Botucatu, 1985. Botucatu, UNESP, 1985. *Resumos* p.130.

----- & ----- Efeito de temperaturas na pré-indução em esporos de *Cyathea delgadii*. In: Congresso Nacional de Botânica, 37., Ouro Preto, 1986. Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1986. *Resumos* p.191.

- RANDI, A.M., FELIPPE, G.M. & VÁLIO, I.F.M. Fotoindução de esporos de *Cyathea delgadii*. In: Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, 6., Campinas, 1986. Campinas, UNICAMP, 1986. *Programas e Resumos* p.66.
- REYNOLDS, T.L. Effects of cyanide, salicylhydroxamic acid, and temperatura on respiration and germination of spores of the fern *Sphaeropteris cooperi*. *Physiol. Plant.*, 54: 52-7, 1982.
- ROSENCWAIG, A. *Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy*. New York, John Wiley, 1980. 309p.
- SHANNON, J.C. A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels. *Res. Bul.*, 842: 1-8, 1968.
- SMITH, H. The photomorphogenic response systems and their photoreceptores. In: ----- *Phytochrome and photomorphogenesis*. London, McGraw-Hill, 1975a. p.22-52.
- The photocontrol of seed germination. In: ----- *Phytochrome and photomorphogenesis*. London, McGraw-Hill, 1975b. p.121-136.
- SNEDECOR, G.N. *Statistical Methods*. Iowa, Iowa State Univ., 1962. 534p.

SUGAI, M. Photomorphogenesis in *Pteris vittata*. IV. Action spectra for inhibition of phytochrome-dependent spore germination. *Plant Cell Physiol.*, 12: 103-9, 1971.

----- & FURUYA, M. Photomorphogenesis in *Pteris vittata*. I. Phytochrome-mediated spore germination and blue light interaction. *Plant Cell Physiol.*, 8: 737-48, 1967.

----- & ----- Photomorphogenesis in *Pteris vittata*. II. Recovery from blue-light-induced inhibition of spore germination. *Plant Cell Physiol.*, 9: 671-80, 1968.

----- & ----- Action spectrum in ultraviolet and blue light region for the inhibition of red-light-induced spores germination in *Adiantum capillus-veneris* L. *Plant Cell Physiol.*, 26: 953-6, 1985.

-----, TAKENO, K. & FURUYA, M. Diverse responses of spores in the light-dependent germination of *Lygodium japonicum*. *Plant Sci. Lett.*, 8: 333-8, 1977.

-----, TOMIZAWA, K., WATANABE, M. & FURUYA, M. Action spectrum between 250 and 800 nanometers for the photo-induced inhibition of spore germination in *Pteris vittata*. *Plant Cell Physiol.*, 25: 205-12, 1984.

TOMIZAWA, K., MANABE, K. & SUGAI, M. Changes in phytochrome content during inhibition in spores of the fern *Lygodium japonicum*. *Plant Cell Physiol.*, 23: 1305-8, 1982.

TOMIZAWA, K., SUGAI, M. & MANABE, K. Relationship between germination and  $P_{FR}$  level in spores of the fern *Lygodium japonicum*. *Plant Cell Physiol.*, 24: 1043-8, 1983.

TOWILL, L.R. Temperature and Photocontrol of *Onoclea* spore germination. *Plant Physiol.*, 62: 116-9, 1978.

----- Analysis of starch accumulation and germination in *Onoclea* spores. *Am. J. Bot.*, 67: 88-94, 1980.

----- Mobilization of carbohydrates during germination of spores of *Onoclea sensibilis* L.. *Proc. R. Soc. Edinb.*, 86B: 203-12, 1985.

----- & IKUMA, H. Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores. I. Action spectrum. *Plant Physiol.*, 51: 973-8, 1973.

----- & ----- Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores. II. Analysis of germination processes by means of anerobiosis. *Plant Physiol.*, 55: 150-4, 1975a.

----- & ----- Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores. III. Analysis of germination processes by means of cycloheximide. *Plant Physiol.*, 55: 803-8, 1975b.

- TRYON, R. The biogeography of species, with special reference to ferns. *Bot. Rev.*, 52: 117-156, 1986.
- VÄLIO, I.F.M. & JOLY, C.A. Light sensitivity of the seeds on the distribution of *Cecropia glaziovii* Snethlage (Moraceae) *Z. Pflanzenphysiol.*, 91: 371-6, 1979.
- VIDAL, B.C. Dichroism in collagen bundles stained with xylidine ponceau 2R. *Ann. Histochem.*, 15: 289-96, 1970.
- Acid glycosaminoglycans and endocondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell. Mol. Biol.*, 22: 45-64, 1977.
- Métodos em Biologia Celular. In: ----- & MELLO, M.L.S., ed. *Biologia Celular*. São Paulo, Atheneu, 1987, p.5-34.
- WADA, M., KADOTA, A. & FURUYA, M. Intracellular localization and dichroic orientation of phytochrome in plasma membrane and/or ectoplasm of a centrifuged protonema of fern *Adiantum capillus-veneris* L. *Plant Cell Physiol.*, 24: 1441-7, 1983.
- ZILBERSTEIN, A., ARZEE, T. & GRESSEL, J. Early morphogenetic changes during phytochrome induced fern spore germination. I. The existence of a pre-photoinduction phase and the accumulation of chlorophyll. *Z. Pflanzenphysiol.*, 114: 97-107, 1984a.

ZILBERSTEIN, A., GRESSEL, J., ARZEE, T. & EDELMAN, M. Early morphogenetic changes during phytochrome-induced fern spore germination II. Transcriptional and translational events. *Z. Pflanzenphysiol.*, 114: 109-22, 1984b.