

Á U R E A M A R I A R A N D I

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

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

ORIENTADOR:

PROF. DR. GIL MARTINS FELIPPE

CAMPINAS - SP

1987

- 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 contagem de esporos.....	13
2. Fotomorfogênese.....	15
2.1 - Luz vermelha na determinação do período de pré-indução e tratamentos múltiplos ; reversão vermelho-vermelho extremo	15
2.2 - Tratamentos luminosos de longa duração .	17
2.3 - Luz azul.....	18
2.4 - Espectro fotoacústico de esporos e paredes 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 polietilenglicol.....	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 por 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. Gi toquTmi ca.	36
7.1 - Métodos gerais e citoquTmicos para detef 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
- Pré-embebição em vapor de água durante uma semana.....	83
3. Pré-embebição em solução osmótica de polietileno 1 i c o 1.....	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
PRINCIPAIS CONCLUSÕES.....	136
DISCUSSÃO.....	139
RESUMO.....	174
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	178

- ÍNDICE DE TABELAS -

	Páginas
TABELA 1 - Padronização de amostragem para contagem de esporos durante a germinação de <i>Cyathaea delgadii</i>	42
TABELA 2 - Efeito de tratamentos luminosos de curta duração, na germinação de esporos de <i>Cyathaea 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>Cyathaea 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>Cyathaea 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>Cyathaea 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>Cyathaea delgadii</i> a 25° C.....	66
TABELA 7 - Efeito de temperaturas durante o período de pré-indução, na germinação de esporos de <i>Cyathaea delgadii</i> , que receberam tratamento de 2 minutos de luz vermelha após a pré-indução.....	71
TABELA 8 - Efeito de temperaturas durante o período de pré-indução, na germinação de <i>Cyathaea delgadii</i> , que receberam tratamentos diários de 1 minuto de luz vermelha, intercalados por períodos de 24 horas de escuro.....	73
TABELA 9 - Efeito de temperaturas durante os períodos de pré-indução e pós-indução, sobre a germinação de esporos de <i>Cyathaea delgadii</i> que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha, após a pré-indução. . .	75
TABELA 10 - Efeito de temperaturas durante os períodos de pré-indução e pós-indução, na germinação de esporos de <i>Cyathaea 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 *Cyathea ãelgaãii* 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 *Cyathea ãelgaãii* 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 *Cyathea ãelgaãii*, 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 *Cyathea ãelgaãii*, 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 *Cyathea ãelgaãii*, 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 *Cyathea ãelgaãii*, que receberam tratamento de 1 minuto de luz vermelha após a pré-indução..... 85
- TABELA 17 - Efeito de DCMU, na germinação de esporos de *Cyathea ãelgaãii* sob luz fluorescente branca constante, a 25° C..... 100
- TABELA 18 - Peso fresco e peso seco de esporos secos (dia zero) de *Cyathea ãelgaãii* 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 *Cyathea ãelgaãii* 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 *Cyathea ãelgaãii*. . . 109

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. . 113

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. . 116

TABELA 23 - Relação entre conteúdo de açúcares soljjeveis totais 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..... 119

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..... 121

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. . . . 124

- ÍNDICE DE FIGURAS -

	Pãgi nas
FIGURA 1 - Espectro de transmissão dos papéis celofane vermelho e azul na faixa compreendida entre 400 a 800 nm.....	14
FIGURA 2 - Diagrama do espectrômetro fotoacústico .	21
FIGURA 3 - Curva de germinação sob luz branca contínua, a 25° C para esporos de <i>Cyathea delgada</i>	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 delgadi-L</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 delgadi-i</i>	54
FIGURA 7 - Correlação entre horas de escuro intercaladas entre tratamentos de luz vermelha e vermelho extremo e a germinabilidade de esporos de <i>Cyathea delgadi-i</i>	55
FIGURA 8 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , a 25° C.....	57
FIGURA 9 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgad-ii</i> , a 25° C.....	58
FIGURA 10 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , a 25° C.....	59
FIGURA 11 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração, na germinação de esporos de <i>Cyathea delgadii</i> , a 25° 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° C.....	62
FIGURA 13 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração (24 e 48 horas) na germinação de esporos de <i>Cyathea delgad-L-i</i> , a 25° C. . .	63

- FIGURA 14 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração (24 e 48 horas) na germinação de esporos de *Cyathea aelgaãii*, 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 *Cyathea delgadii*, a 25°C. 68
- FIGURA 16 - Espectro fotoacústico de esporos secos e paredes de esporos de *Cyathea delgadii* 69
- FIGURA 17 - Efeito da pré-umbebição de esporos em vapor de água, na germinação de *Cyathea delgadii* a 25°C. 87
- FIGURA 18 - Tratamentos luminosos de 1 minuto de duração, aplicados após 12, 24, 36 e 48 horas de umbebição no escuro. 88
- FIGURA 19 - Tratamentos luminosos de 1 minuto de duração, aplicados após 24, 48, 72 e 96 horas de umbebição no escuro. 90
- FIGURA 20 - Tratamentos luminosos de 1 minuto de duração, únicos e diários, aplicados após 24 horas de umbebição no escuro 92
- FIGURA 21 - Tratamentos luminosos de 1 minuto de duração, únicos, aplicados após 24 ou 48 horas de umbebição no escuro; diários aplicados após 48 horas de umbebição no escuro. 94
- FIGURA 22 - Tratamentos luminosos de 8 horas de duração, aplicados após 24 ou 48 horas de umbebição no escuro. 96
- FIGURA 23 - Germinação sob luz fluorescente branca Constante, a 25°C, para esporos de *Cyathea delgadii* pré-umbebi dos em solução osmótica de polietileno glicol 98
- FIGURA 24 - Conteúdo de lipídios livres em esporos secos (dia zero) de *Cyathea aelgaãii* 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 (*Gossypium hirsutum*) na faixa da luz visível (400 a 800 nm). 107
- FIGURA 27 - Cromatografia gasosa dos ácidos graxos componentes do Óleo de esporos secos de *Cyathea aelgaãii*. 108

FIGURA 28 - Espectros de absorçaõ de luz de extra- tos de esporos secos de <i>Cyathea delgadii</i> .	111
FIGURA 29 - Conteúdo de clorofila em esporos de <i>Cya- thea delgadii</i> e apõs 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante a 25° C.....	112
FIGURA 30 - Conteúdo de proteínas solúveis, em [^] espo ros secos de <i>Cyathea delgadii</i> e apõs 7 e 14 dias de germinação sob luz flúores cente branca constante, a 25° C.....	115
FIGURA 31 - Conteúdo de açúcares solúveis totais - (fração MCW e fração etanol 10%) em es- poros secos de <i>Cyathea delgadii</i> e apõs 7 e 14 dias de germinação sob luz fluo- rescente branca constante, a 25° C . . .	118
FIGURA 32 - Conteúdo de açúcares redutores (fração MCW e fração etanol 10%) em esporos se- cos de <i>Cyathea delgadii</i> e apõs 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 apõs 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante, a 250C	123
FIGURA 34 - Cortes de esporos secos de <i>Cyathea del- gadii</i> , corados pela hematoxilina-eosina.	126
FIGURA 35 - Cortes de gametõfitos de <i>Cyathea delga- dii</i> , com 7 dias de embebição, corados pelahematoxilina-eosina.....	126
FIGURA 36 - Cortes de esporos secos de <i>Cyathea del- gadii</i> , corados pelo azul de toluidina a pH 4,0.....	128
FIGURA 37 - Cortes de gametõfitos de <i>Cyathea delga- dii</i> , com 7 dias de embebição, corados pelo azul de toluidina a pH 4,0	128
FIGURA 38 - Cortes de gametõfitos de <i>Cyathea delga- dii</i> , com 7 dias de embebição, corados <u>pe</u> lo azul de toluidina a pH 4,0.....	129
FIGURA 39 - Gametõfito 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 del- gadii</i> corados pelo azul de toluidina a pH 4,0, observados em microscópio de pã larização 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

- ABREVIATURAS "

A - LUZ AZUL

CMU-3 - CLOROFENILDIMETILUREI A

DC(vÍU-3-z4-DI CLOROFENI LDI METI LUREI A

E - ESCURO

FV - FITOCROMO VERMELHO

FVe: - FITOCROMO VERMELHO EXTREMO

GA₃ " ÁCIDO GIBERÉLICO

h - HORA

L - LUZ

LC " LUZ CONSTANTE

min - MINUTO

PEG " POLIETILENOGLICOL

V - LUZ VERMELHA

VE " VERMELHO EXTREMO

- 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 literatura 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. Todas as substâncias orgânicas necessárias para a germinação provêm do metabolismo das reservas estocadas no próprio esporo.

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 a luz vermelha de baixa energia ($400 \text{ erg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{seg}$ durante 5 segundos) e que é revertida pelo vermelho extremo ($7,5 \text{ Kerg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{seg}$ 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_{B-NUV} (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 F_{ve} (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 de 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 protogenital 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 os níveis de porcentagem de Fve e a germinação de esporos de *Lygoëium 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* contém 56% de lipídios e destes 86% são triglicerídeos (GEMMICH, 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-sintetase. A enzima lipase também é bastante ativa após trata-

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

Experimentos com autoradiografia, onde foram utilizadas timidina ^3H , uridina ^3H e leucina ^3H 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 ^3H nos nucleolos, indicando síntese de RNA e incorporação de leucina ^3H 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 cccc-LHus 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 imbebição 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 fitoblásticos 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 vaddiana*, *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 sã germinaram em luz contínua. Períodos curtos de luz brai

ca, quando os esporos eram mantidos a 25° 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 covcovadensis*. A germinação máxima ocorreu a 25° 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 a,b) verificaram que esporos de *Polypodium latipes* são fotoblásticos positivos a 25° 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° C e 25-45° C. Temperatura de 25° C reverte o efeito inibitório de 35° C, nas três condições de alternância utilizadas.

FELIPPE *et al.* (1985) verificaram o efeito da luz na germinação de esporos de *Cyathea delgadii* e de *Trichipteris covcovadensis*. Ambas são fotoblásticas positivas a 25° C.

RANAL (1985, 1986) estudou o efeito de temperaturas e intensidades luminosas na germinação de 8 espécies de pteridófitas coletadas em mata seca semi decídua. As espécies estudadas foram *Adiantopsis vadiata*, *Polypodium hirsutum-issvurrij*, *Polypodium latipes*, *Polypodium lindbergii* PQ /

podium pleopeltifolium, *Polypodium polypodioides*, *Polypodium squamulosum* e *Pteris dentieulata*. 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. Exposição de 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 fotoblasticos 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 entre as temperaturas constantes a 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 extremo 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 coroo-vaënsis*. Estudou o efeito de ácido indolil-3-acético, ácido giberêlico, 6-benziladenina e ácido 2-etilfosfônico em concentrações de 0 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 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. A germinação ocorreu sob luzes vermelha, azul, verde e sob 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 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 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 lindbevgii*. As íiiélhores temperaturas para a germinação dessas espécies foram as compreendidas entre 21,7° C e 25,2° C. Em intensidades luminosas 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.

E 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 citológicos.

Cyathea delgadii Sternb e 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 h-irsutum* L. (al godão).

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° 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 filtragem através de folha simples de lenço de papel ou papel de 1 e_n

te. Foram então estocados em frascos de vidro fechados 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:

Mg S' O ₄ . 7 H ₂ O	510 mg. Z ⁻¹
K NO ₃	120 mg. Z ⁻¹
ça (NO ₃) 2. 4 H ₂ O	1 440 mg. Z ⁻¹
K H ₂ PO ₄	250 mg. Z ⁻¹
Solução de FeSO ₄ .7H ₂ O 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 Fe SO₄.7H₂O 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 Nystatin 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 da temperatura.

Em geral, os experimentos tiveram como controle, a germinação de esporos sob luz fluorescente branca constante. Nesse caso foram utilizadas duas lâmpadas fluorescentes brancas de 15 W e intensidade de $320 \text{ } \mu\text{W.cm}^{-2}$ (MARCONDES-FERREIRA e FELIPPE, 1984). O espectro é mostrado por VALIO e JOLY (1979) onde se observa alta transmissão de luz vermelha e pouca de vermelho extremo.

Os ensaios de escuro foram realizados envolvendo-se os erlenmeyers em 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 contidas 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 H&P. 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 feitas curvas de germinação, cujas contagens foram feitas

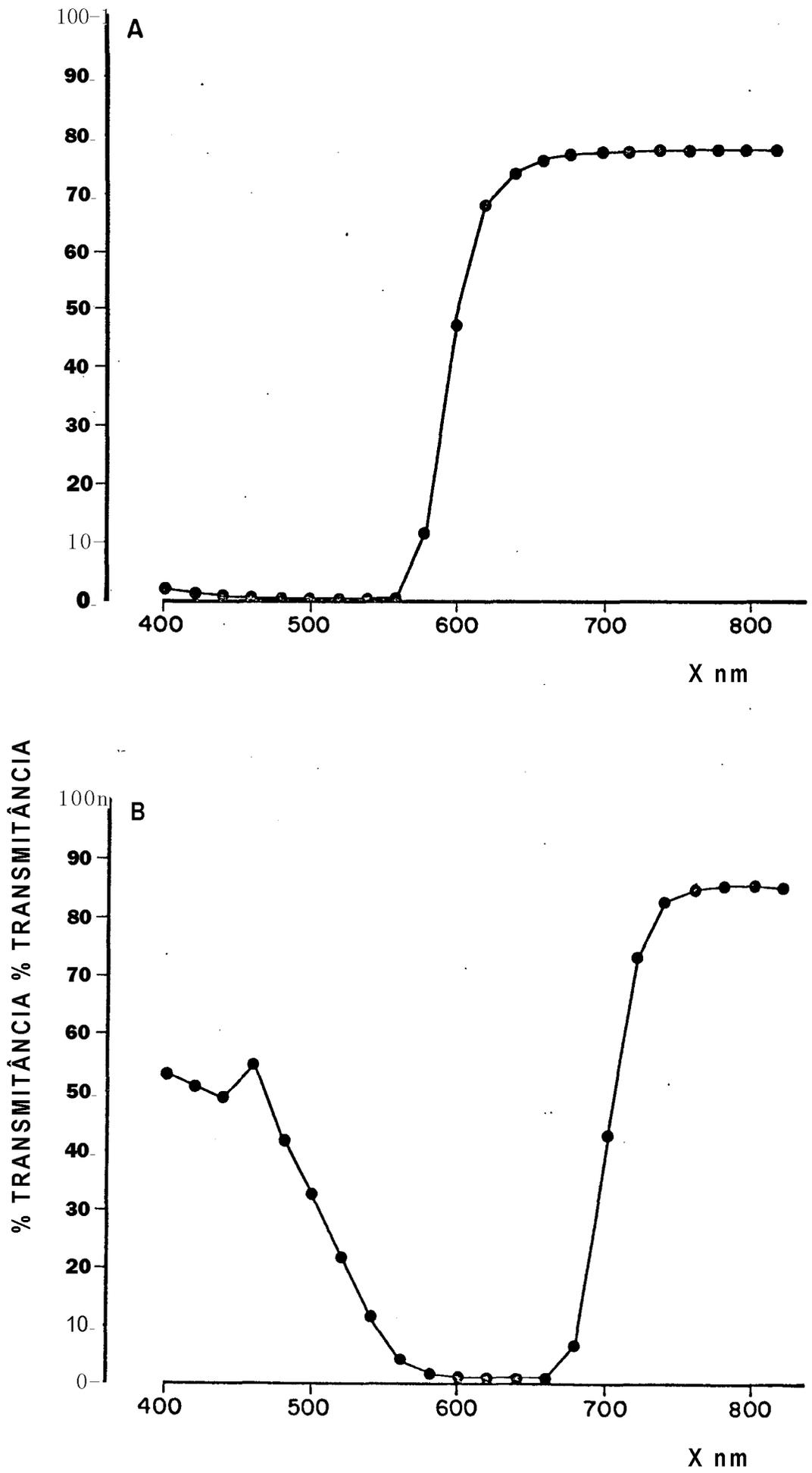


FIGURA 1 - Espectro de transmissão dos papéis celofane vermelho e azul na faixa compreendida entre 400 a 800 nm.
 A - Papel vermelho
 B - Papel azul

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 (NORONHA *et al.*, 1978; RANDI e FELIPPE, 1981);
- 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 (NORONHA *et al.*, 1978) 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 pico a 730nm (NORONHA *et al.*, 1978; RANDI e FELIPPE, 1981).

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

A figura IA 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 ⁶gro-lux apresenta picos de pequena intensidade a 440 nm e 550 nm e um pico de grande intensidade ($3,0 \text{ jiiW.cm}^{-2}$) 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 IA).

2.1 - Luz Vermelha na Determinação do Período de

Pré-indução e Tratamentos Múltiplos; Reve_r
são Vermelho-Vermelho-Extremo

Tratamento de luz vermelha (descrita em b) de 1 minuto de duração foi aplicado 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 de duração, após o período de pré-indução. 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:

48h E-V-5 dias E;

48h E-V-24h E-V-4 dias E; ,

48h E-V-24h E-V-24h E-V-33 dias E;

48h E-V-24h E-V-24h E-V-24h E-V-2 dias E;

48h E-V-24h E-V-24h E-V-24h E-V-24h E-V-1 dia 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 escurecimento 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 - 3h 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 cm³ 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 for a amplitude do sinal, maior foi a absorção e menor a transmissão da luz que incidiu sobre a amostra.

O sinal fotoacústico medido S (X) é descrito pela equação:

$$S = A \frac{\beta(x)}{(K, Cí)^{1/2}}$$

onde μ (λ) é o coeficiente de absorção óptica num dado comprimento de onda λ ; K é a condutividade térmica do material, ρ 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 (ROSENCWALD, 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

FIGURA 2

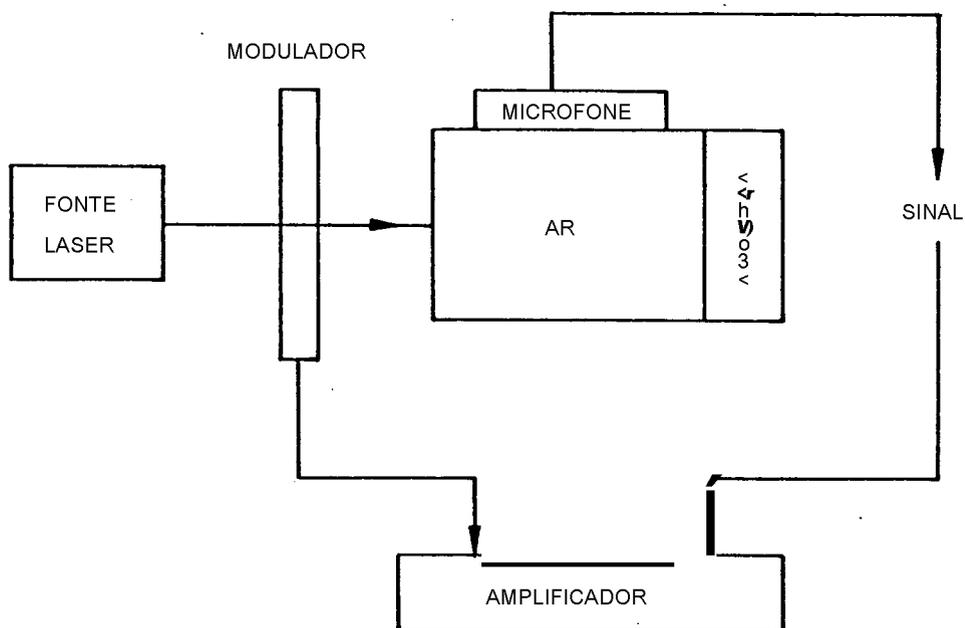


FIGURA 2 - Diagrama do espectrômetro fotoacústico.

minuto de luz vermelha (fonte de luz vermelha b). Retornaram ao escuro a 25° 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° C. Retornaram ao escuro, nas temperaturas de pré-indução.

Foi estudado também o efeito 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 8-16h, sendo 8 horas a 25° C e 16 horas na alternante; ciclos de 12-12 h, sendo 12 horas a 25° C e 12 na alternante e ciclos de 16-8 horas, sendo 16 horas a 25° C e 8 horas na alternante. O ciclo foi sempre iniciado com a temperatura de 25° 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° 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 - Pré-embebição em Vapor ÍJ e 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 quantidade 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 filtração 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 minuto de luz vermelha (fonte c), após 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas de embebição 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 £), com início após 24 ou 48 horas de embebição em solução nutritiva.

va, no escuro a 25° C. Os tratamentos luminosos foram intej[^]calados por perT^odos 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 OSMÓTICA DE POLIETILENOGLICOL

Esporos foram pré-embebi dos em solução osmótica de poli etil enogl i col (PÇG) 6.000 durante 1,2,3 e 4 semanas. O tratamento osmótico foi realizado a 15° C, sob luz fluorescente branca constante. Foi utilizada solução de poli etil[^]noglicol na concentração de 288g de PEG 6.000 por quilograma de água destilada (HEYDECKER & WAINWRIGHT, 1976), que a 15° C apresenta um potencial osmótico (^ s) de -11,0 bars .

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 para remover resíduos de polietilenoglicol. 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 cubas de germinação sob luz branca constante, a 25° C, para ej[^]poros pré-embebi dos 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-diclorofenil dimetil ureia (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 APOS

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 equação:

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

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 sucessivas lavagens com água destilada e filtração a vácuo em funil de Bllchner. 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 filtração, 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 moedor.

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 quantidade de areia lavada, para facilitar o rompimento das paredes celulares. Os lipídios livres foram extraídos e dados como descrito para esporos secos, apenas substituindo-se o homogeneizador de vidro pelo *graal*.

6.1.1 - Espectro de Transmissão de Luz do Oleo 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. 0

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, separando-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 resuspendida 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 di etil enog l i col s ucci nato 14% (DEGS) em cromosorb W reguiar 60-80 MESH, a 187° C. Foram injetados 0,8 μ l de extrato para se obter 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 mortal com areia, utilizando-se 10 ml de éter die-

diélico como solvente, sob lâmpada de segurança verde, com irradiância máxima de 0,0 lpW.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 diélico 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 mortalho, 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:

$$C = \left(20,2 \times D_{645} + 8,02 \times D_{663} \right) \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{g}} \times \frac{\text{volume do extrato}}{\text{peso de clorofila}} / 9 \text{ te}$$

eido g -

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 hidróxido 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 absorvância foi lida a 595 nm, após 2 minutos. Os cálculos de proteína foram feitos a parti r dos valores de absorvância obtidos na reta padrão. Nesta foram usadas concentrações de 20 a 100 μ g de proteí-na (soroalbumina bovina - BSA), 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 (peso inicial) para as extrações.

A sequência 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 garrafa, 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 resTduos guardados para a próxima extração. O extra to obtido continha polissacarfdeos solúveis em água. Esse método foi adaptado de SHANNON (1968).

O amido foi extraído dos resTduos 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 Antro na (McCREADY *et al.* 3 1950). Foram dissolvidos 200 mg de antrona (Sigma) em 100 ml de ácido sulfúrico (H^2SO^4) 95%. AlTquotas de 1 ml dos extratos foram acrescidas de 2 ml do reagente de antrona. Os tubos de ensaio foram agitados e aque idos 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 μ 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 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 100 ml de água destilada e adicionaram-se 1 ou 2 gotas de H_2SO_4 concentrado. O reagente de arsenomolibdato foi preparado dissolvendo-se 25g de $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ em 450 ml de água destilada e adicionando-se 21 ml de H_2SO_4 concentrado. A seguir, foram dissolvidos 3 g, de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 25 ml de água destilada e adicionados a 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°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 cáculos de açúcares redutores foram feitos a partir de valores obtidos para a reta padrão onde se utilizaram concentrações de 10 a 50 μg 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~~0~~g por mililitro de ácido perclórico 30%. Todas as diluições necessárias foram feitas utilizando-se também ácido perclórico 30%. A leitura da absorvância 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 turva. 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_2HPO_4 e 35,25 ml de solução 0,2M de NaH_2PO_4);

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

Materiais com 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 micrôtomos (R. Jung, Hildelberg) em cortes de 8 μ 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% (MAI A, 1979).

- xylidine ponceau a pH 2,5 (XP)

Foi usada para a detecção de radicais NHg 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 0,1% de xylidine ponceau em ácido acético a 2%.

- 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 0,025% de 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).

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⁻¹ 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⁻¹ 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⁺ HPO⁻ 0,05M e adicionando-se solução de Na⁺ PO⁻ 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{T}). Os resultados foram apresentados em tabelas ou figuras e as análises estatísticas foram realizadas após a transformação dos dados.

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 DMS² 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 É S U L T A D O S -

1. PADRONIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM PARA A CONTAGEM 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 contaidas 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	G e r m i n a ç ã o (valor angular) nd 79 dia		C. V. %
	\bar{X}	$\pm i.i.C.$	
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 25⁰ C para esporos de *Cyathea delgadii*. 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 e intervalos de confiança.

retardada para os quinto e sexto dias nas coletas realizadas em janeiro e fevereiro (A e 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. Apenas no experimento 2, os valores não são estatisticamente diferentes do controle de escuro (Fg não foi significativo). Os efeitos do tratamento luminoso foram mais nítidos quando estes foram aplicados após 36 e 48 horas de embebição no escuro. Possivelmente, houve um aumento da fotosensibilidade após esse período. 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 lúminosos de curta duração, na germinação de esporos de *Cyathea delgadoi* 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;
V - Luz vermelha, fonte b: lâmpada fluorescente vermelha.

T r a t a m e n t o	G e r m i n a ç ã o v a l o r a n g u l a r	
	E x p e r i m e n t o s	
	1	2
C o l e t a armazenamento (dias)	junho 107	junho 112
Controle LC	53,35	57,41
Controle EC	0,0 a	0,0 a
V 1 m i n u t o	15,18c	13,47b
V 5 m i n u t o s	7,54b	
V 10 m i n u t o s	7,65b	
DMS 5% (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;

V - Luz vermelha.

Tratamento	Germinação valor angular				
	Experimentos				
	1	2	3	4	5
Coleta	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 miç.	-	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 _{5%} (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 começa a diminuir ao redor de 176 dias de armazenamento.

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.

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 brânca 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: lâmpada fluorescente vermelha.

Coleta mês	armazenamento (di as)	germinação - valor angular	
		LC	48hE - V 1 min.
janeiro/1985	64	52,37a	8,95a
março/1985	54	53,01b	16,28c
II	76	53,07b	9,63a
II	81	50,58a	14,01c
II	95	51,88a	12,08a
II	105	49,62a	12,35a
II	131	51,36a	12,46a
II	132	48,33a	10,13a
II	141	49,81a	11,24a
II	145	47,87a	10,41a
lt	159	49,18a	10,6 a
II	161	46,15a	10,6 a
II	167	46,62a	10,6 a
abril/1985	170	53,04b	10,29a
II	171	53,38b	9,22a
II	176	48,76a	12,38a
II	177	50,47a	13,03a
II	186	48,73a	10,23a
junho/1985	77	41,06c	9,40a
II	79	41,43c	8,6 a
II	84	42,30c	6,59b
II	87	43,62c	6,84b
junho/1984	107	53,35b	15,81c
II	112	57,41b	13,47a
II	275	47,95a	8,51a
$\bar{x} \pm \frac{s}{\sqrt{n}}$		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 de 1 minuto de duração. Esses tratamentos foram realizados após o período de pré-indução. Observa-se

FIGURA 4

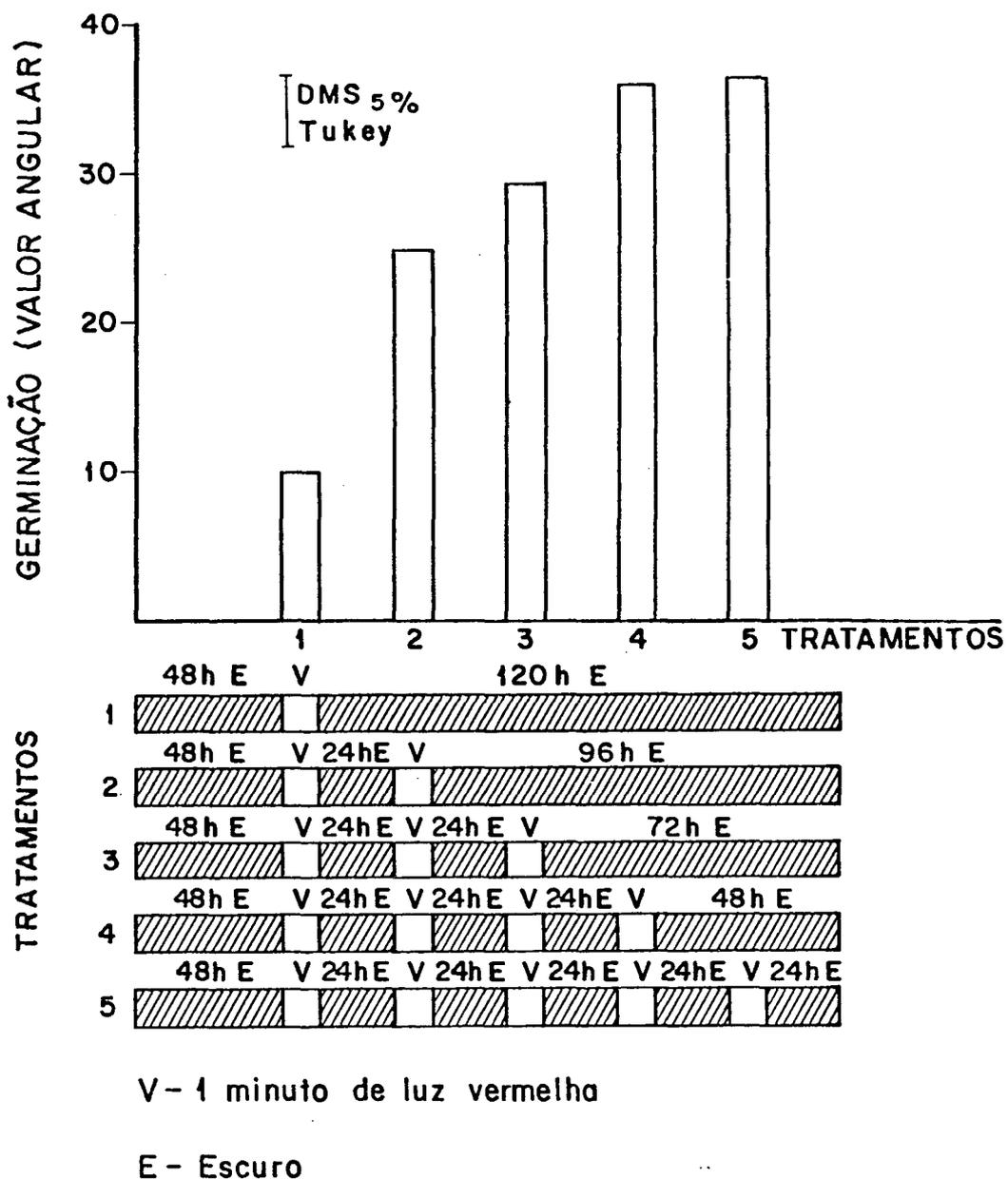
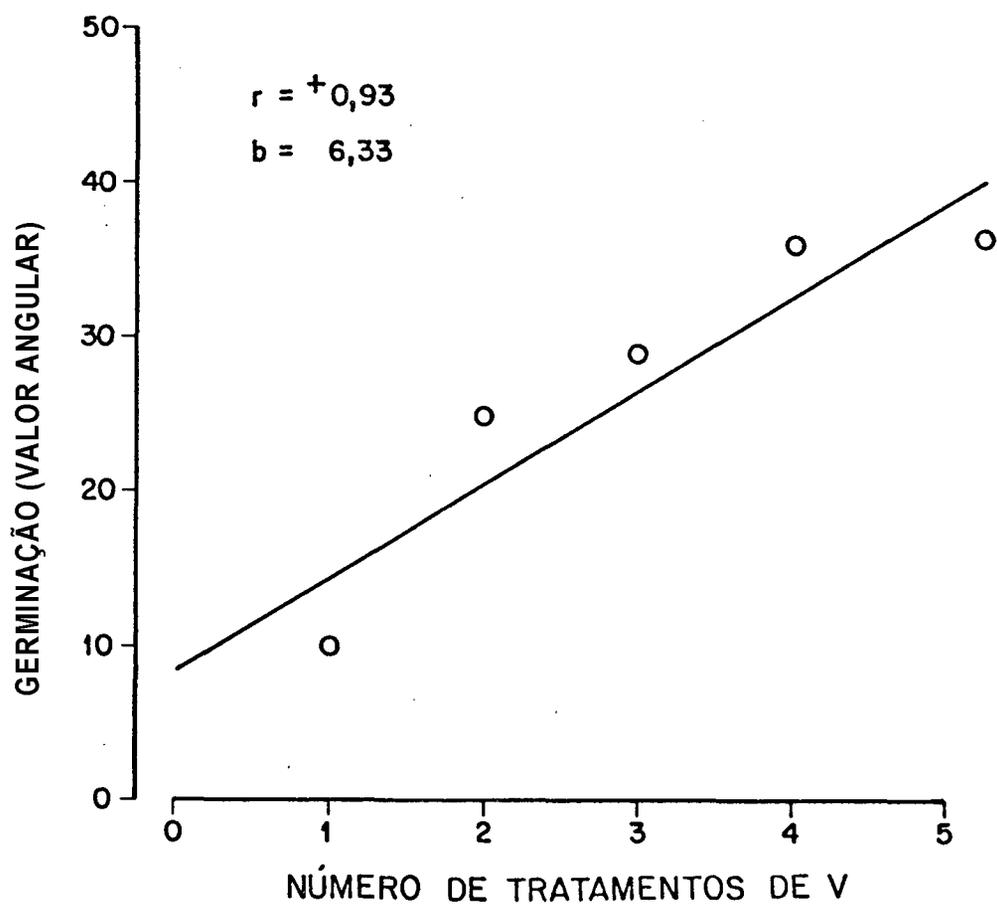


FIGURA 4 - Efeito de tratamentos múltiplos de luz vermelha, de 1 minuto de duração, na germinação de esporos de *Cyathea delgadii*. Os tratamentos tiveram início após o período de pré-indução (48 horas de embebição no escuro) e foram intercalados por períodos de 24 horas de escuro. O experimento foi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

FIGURA 5



V - 1 minuto de luz vermelha

FIGURA 5 - Correlação entre tratamentos múltiplos de luz vermelha e a germinabilidade de esporos de *Cyathea delgadii*. Os tratamentos tiveram início após o período de pré-indução e foram intercalados por períodos de 24 horas de escuro. O experimento foi realizado a 25° C.
Fonte b - lâmpada fluorescente vermelha

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 4 horas de escuro intercalado entre os tratamentos Ijj_ minosos houve pequena promoção de germinação, menor do que a do controle V. A resposta de germinação foi crescente, quanto maior o período de escuro entre os tratamentos l umj_ nosos. Quando foram intercaladas 8 horas de escuro entre os tratamentos luminosos, não ocorreu reversão do efeito da luz vermelha pelo vermelho extremo.

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

x - Tratamentos Luminosos de Longa Duração

Os experimentos dessa série tiveram por objetivo ve rificar 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 tres~ 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 escu-

TABELA 5 - Reversão do efeito da luz vermelha de 1 minuto de duração, pelo vermelho extremo, na germinação de esporos de *Cyathea delgaãii*. Os experimentos foram realizados a 25° C. Não foram considerados os controles em luz contínua para cálculo de F.

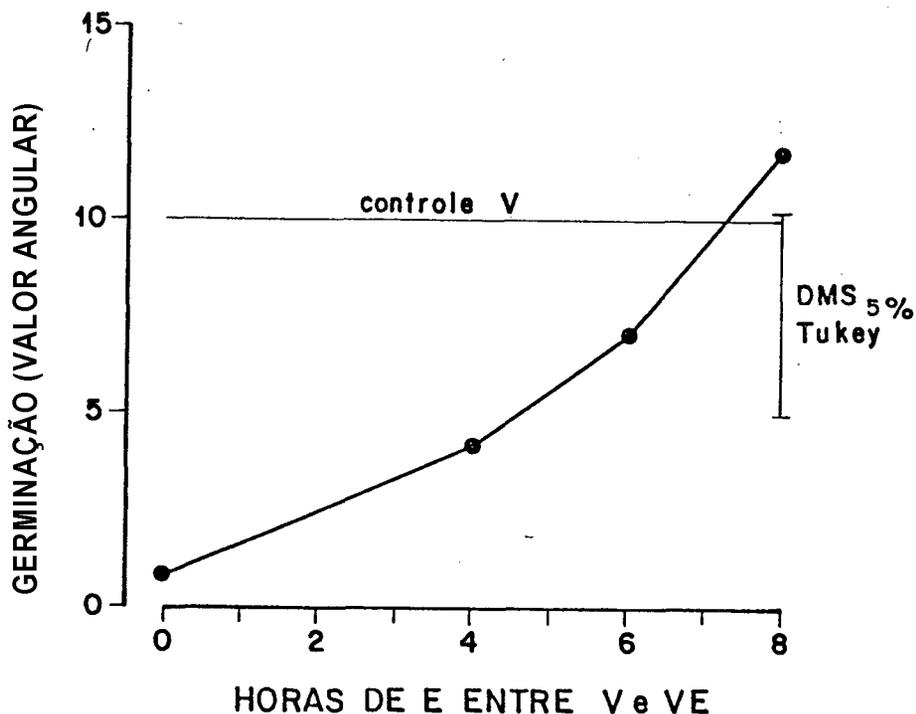
LC - Luz branca constante; EC - Escuro constante;

V - Luz vermelha, fonte b: lâmpada fluorescente vermelha

VE - Vermelho extremo, fonte e: lâmpada incandescente 40 W e filtro (3 folhas de papel celofane azul e 2 folhas de papel celofane vermelho).

T r a t a m e n t o	Germinação valor angular	
	Experi mentos	
C o l e t a armazenamento (dias)	1	2
	março	março
	79	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 _{5%} (Tukey)	3,55	6,66

FIGURA 6



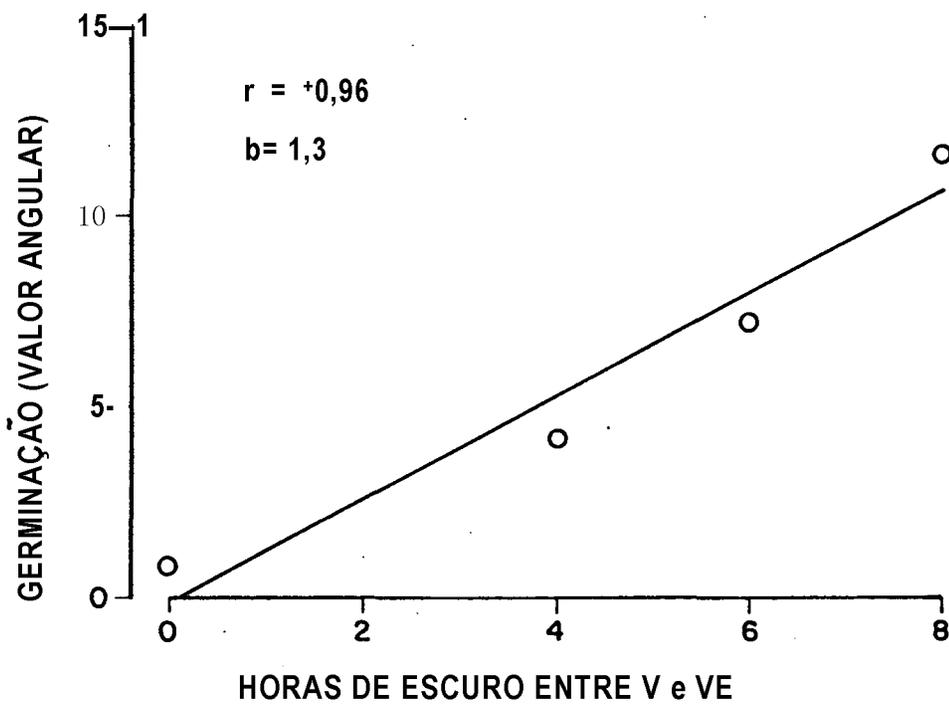
E - escuro

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 - lâmpada fluorescente vermelha
Fonte e - lâmpada incandescente (40W) e filtro (3 folhas de papel celofane azul e 2 folhas de papel celofane vermelho)

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 germinabilidade de esporos de *Cyathea delgadii*. Esses tratamentos foram realizados após a pré-indução. Os experimentos foram feitos a 25° C.

Fonte b - lâmpada fluorescente vermelha

Fonte e - lâmpada incandescente (40W) e filtro (3 folhas de papel celofane azul e 2 folhas de papel celofane vermelho)

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 promoções crescentes de germinação. O tratamento de 8 horas promoveu a maior resposta de germinação, mas esta foi menor do que a do controle em luz contínua.

FIGURA 8

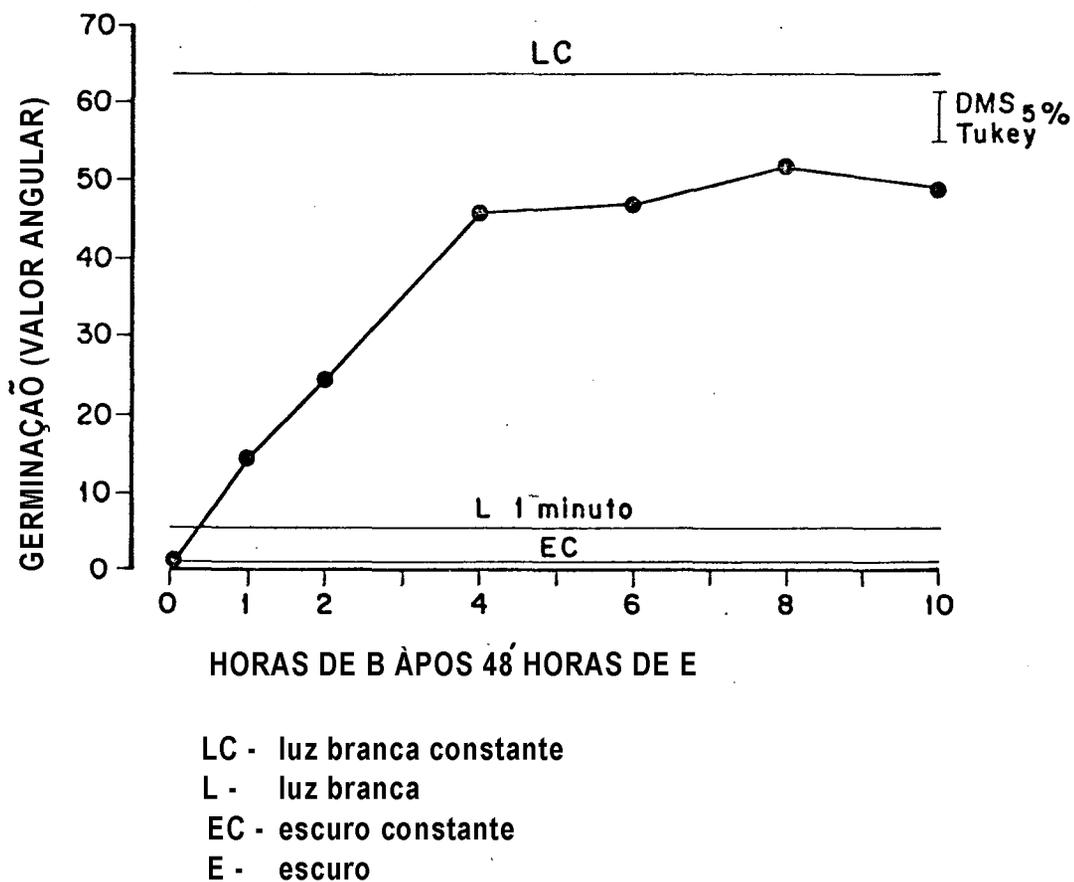
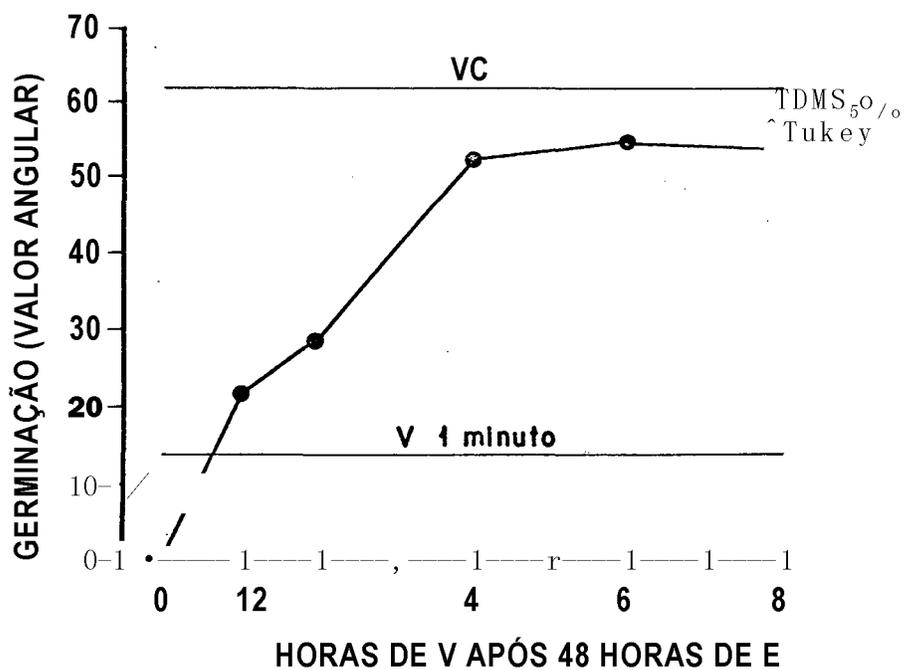


FIGURA 8 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração, na germinação de esporos de *Cyathea áelgaã-ii*, a 25° C. Os tratamentos foram realizados após a prê-indução. Fonte a - lâmpada fluorescente branca

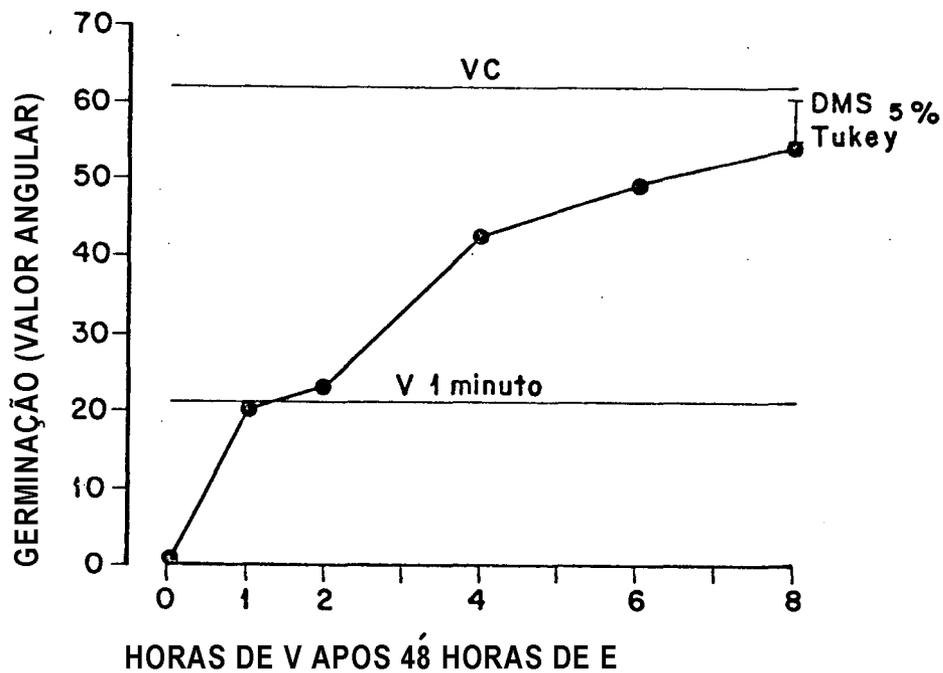
FIGURA 9



VC - luz vermelha constante
V - luz vermelha
E - escuro

FIGURA 9 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração, na germinação de esporos de *Cyathea delgadí-L*, a 25° C. Os tratamentos foram realizados após a pre-índução. Fonte b: lâmpada fluorescente vermelha

FIGURA 10



VC - luz vermelha constante
V - luz vermelha
E - escuro

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: lâmpada fluorescente gro-lux associada a filtro de papel celofane vermelho

A figura 11 apresenta uma sobreposição dos resultados apresentados nas figuras 8, 9 e 10. Observa-se que tratamentos de 1, 2, 4 e 6 horas 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 maior do que o de 1 hora de luz branca. Os tratamentos de 2, 4 e 6 horas de luz vermelha foram estatisticamente maiores do que os de luz branca e luz vermelha cuja fonte foi a lâmpada gro-lux associada ao filtro de papel celofane vermelho. 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 obter 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 tratamento 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 ou vermelha cons-

FIGURA 11

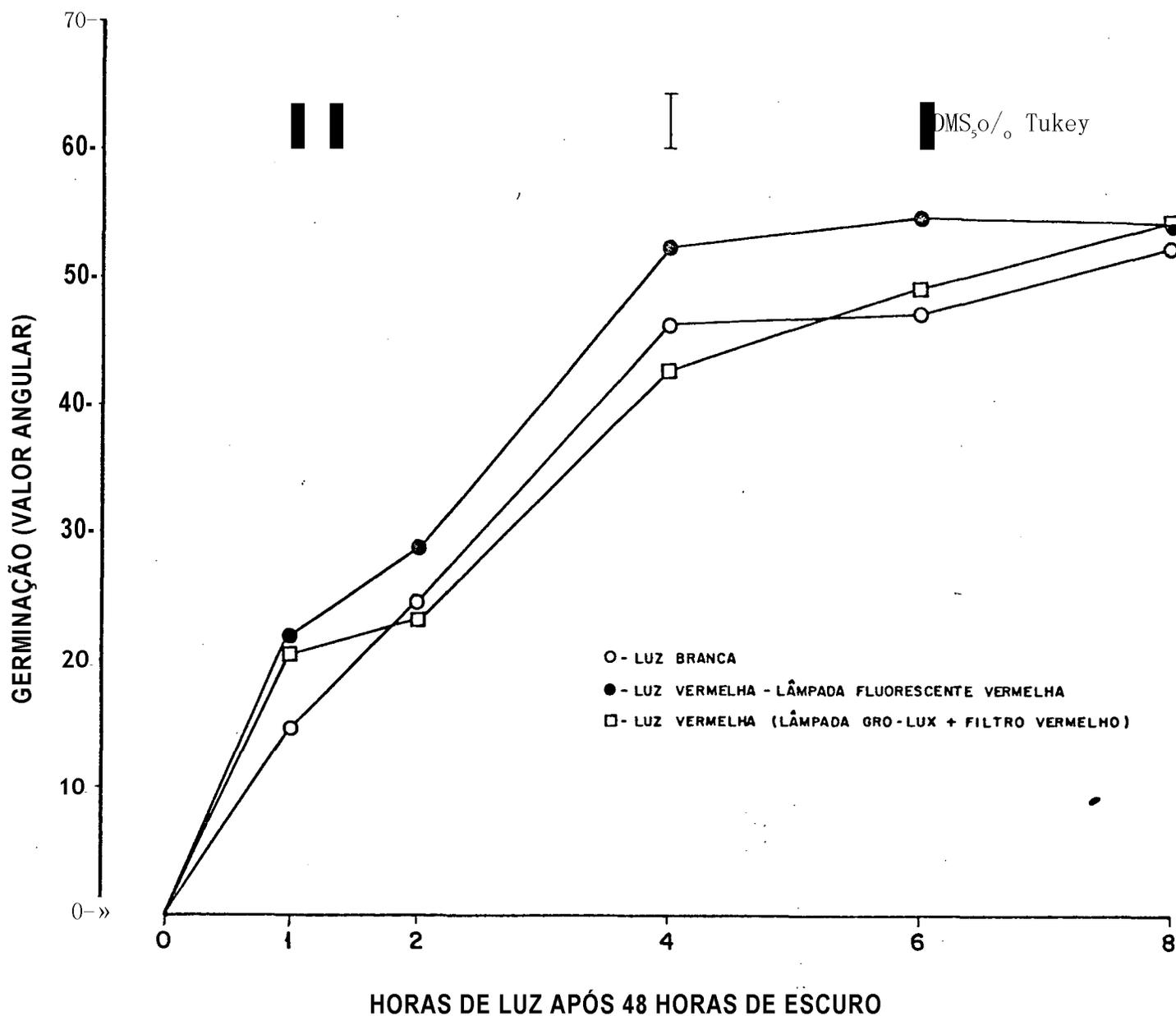


FIGURA 11 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração, na germinação de esporos de *Cyathea detgadi-L₃* a 25° C. Os tratamentos foram realizados após o período de pré-indução. Fontes a, b, c: lâmpada fluorescente branca; lâmpada fluorescente vermelha; lâmpada fluorescente gro-lux associada a filtro de papel celofane vermelho

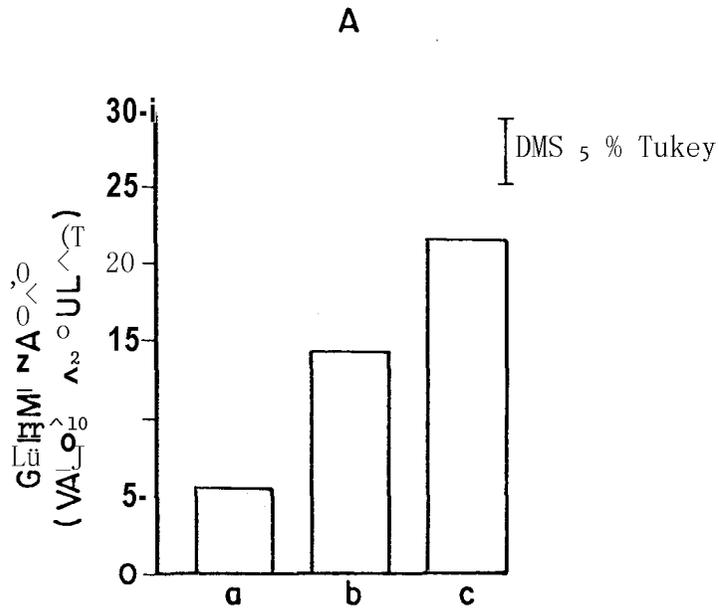
FIGURA 12 - Efeito de tratamentos luminosos de 1 minuto de duração e de luz contínua na germinação de esporos de *Cyathea delgaadii* a 25° C. Os tratamentos de 1 minuto foram realizados após a pre-indução.

A - Tratamento de 1 minuto

B - Luz contínua

Fontes a, b, c: lâmpada fluorescente branca; lâmpada fluorescente gro-lux associada a filtro de papel celofane vermelho

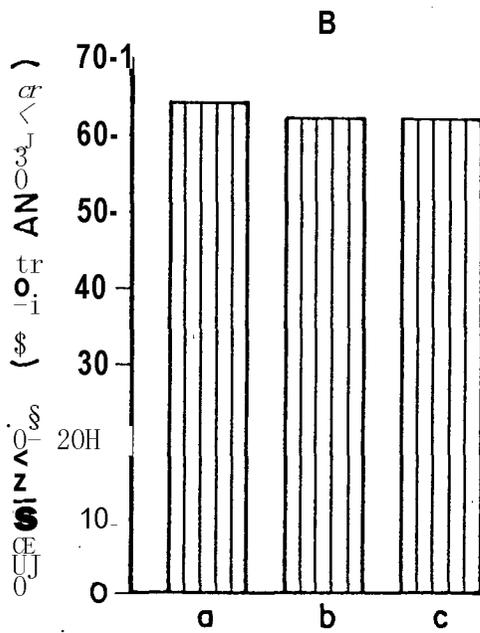
FIGURA 12



a-48h E - 1 min. luz branca

b-48h E-1min. luz vermelha (lâmpada fluorescente vermelha)

c- 48h E-1min. luz vermelha(lâmpada gro-lux + filtro vermelho)



a-luz branca constante

b- luz vermelha (lâmpada fluorescente vermelha) constante

c-luz vermelha (lâmpada gro- luxt filtro vermelho) constante

FIGURA 13

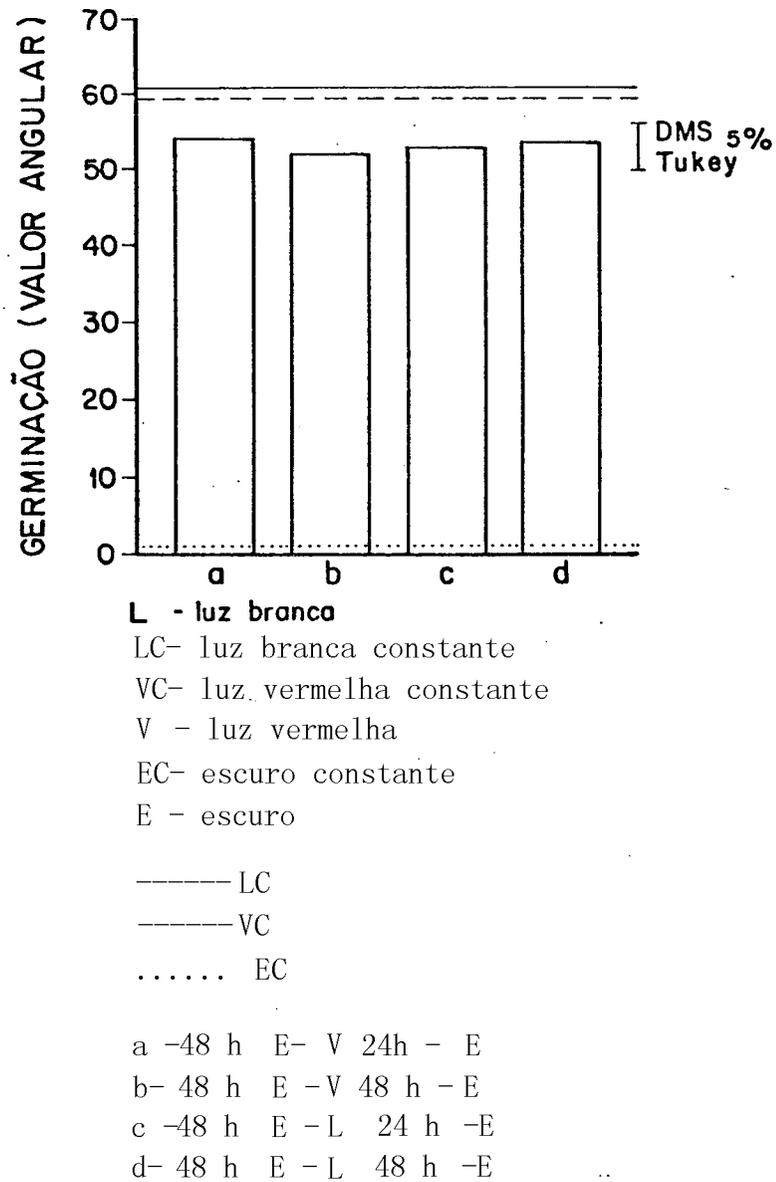


FIGURA 13 - Efeito de tratamentos luminosos de longa duração (24 e 48 horas) na germinação de esporos de *Cyathea ãelgadii*, a 25° C. Os tratamentos foram realizados após a pré-indução. Fontes a, b: lâmpada fluorescente branca; lâmpada fluorescente vermelha

tan tes.

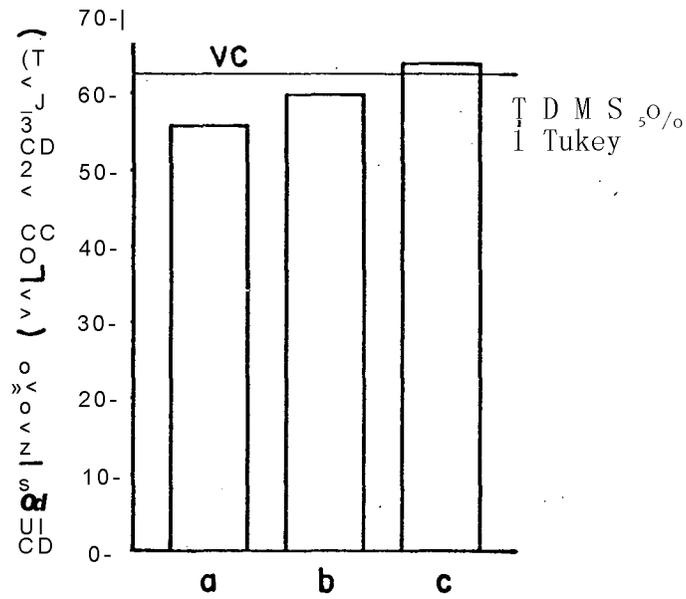
No experimento da figura 14 foi utilizada lâmpada gro-lux e filtro formado por papel celofane vermelho. Após o período de pré-indução, esporos receberam tratamentos de 24, 48 ou 120 horas (5 dias) de luz vermelha. O tratamento de 24 horas não atingiu o valor obtido para luz constante. Os tratamentos de 48 horas e 120 horas causaram efeito estatisticamente igual ao do controle sob luz contínua. Tratamento de 120 horas de luz branca (não mos trado), J :iriduziu resposta de 57,23 (valor angular) estatisticamente igual \bar{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 promoção que se assemelhou \bar{a} da 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 pre-indução.

Fonte c: Tâmpada fluorescente gro-lux associada a filtro de papel celofane vermelho

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 aelgadii*, a 25° C. Os tratamentos foram realizados após a pré-indução. Não foram considerados os valores de luz branca constante no cálculo de F foi calculado para os dois experimentos juntos.
 LC - Luz branca constante, fonte a: lâmpada fluorescente branca;
 EC - Escuro constante
 Azul - Luz azul, fonte d: lâmpada fluorescente azul e filtro de papel celofane azul.

T r a t a m e n t o	Germi nação vaio r angular	
	Expe ri mentos 1 2	
C o l e t a armazenamento (dias)	setembro	setembro
	156	170
Controle LC	59,43	63,57
Controle EC	0,0 a	0,0 a
Azul constante	7,08b	4,22a
Azul 1 mi nu to úni co	0,0 a	-
Azul 1 minuto diário	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 ₅ [^] (Tukey)	5,57	5,57

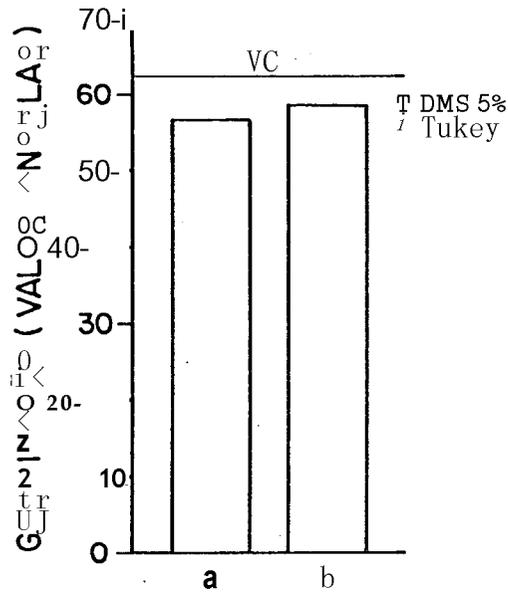
mentos onde se testou o efeito de tratamento único ou diário de luz azul, de 1 minuto de duração. Os tratamentos foram realizados após a pré-indução. Foi também verificado o efeito de tratamentos longos (24, 48 e 120 horas) de luz azul. Os experimentos tiveram como controle tratamentos de luz branca constante, escuro constante e luz azul constante. A luz azul causou uma pequena promoção da germinação, que nem sempre foi significativa estatisticamente, devido às baixas porcentagens de germinação. 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, que atingiram um valor angular máximo de 7,1, ao redor de 1,5%.

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 ao 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

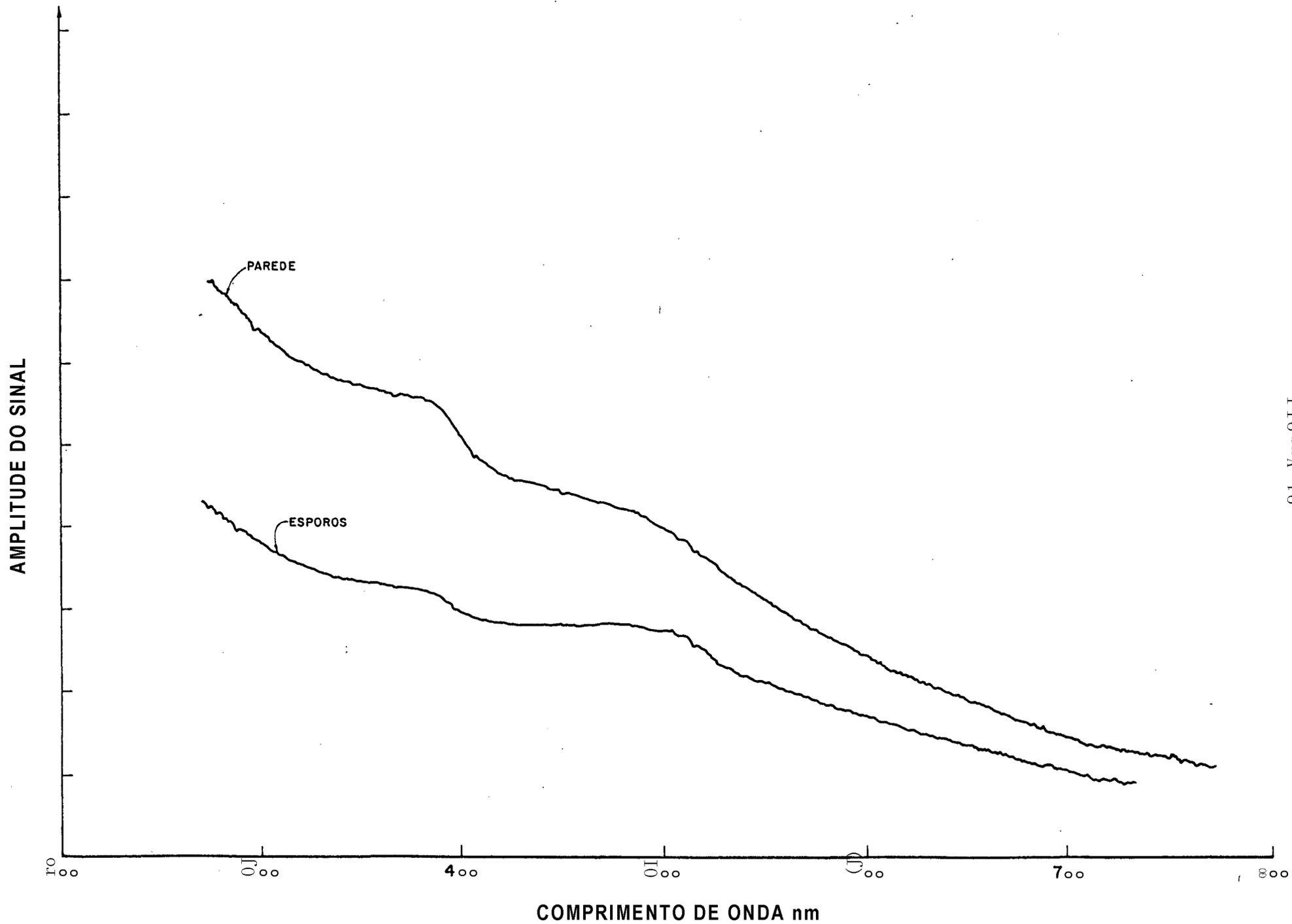
a - 48h E-V 8 h -A

b -48h E- 48 h 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 pre-indução.

Fontes c, d: lâmpada fluorescente gro-lux associada a filtro de papel celofane vermelho; lâmpada fluorescente azul associada a filtro de papel celofane azul

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



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 gradativamente 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), para esporos que receberam tratamento único de 1 minuto de luz vermelha (a 25° C), após esse período. A Tabela 7 representa resultados de uma série de experimentos onde foi variada a temperatura durante o período de pré-indução. Após esse período, os esporos receberam tratamento único de luz vermelha e a seguir foram mantidos no escuro a 25° C, até o final do experimento. 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 temperaturas durante o período de pré-indução, na germinação de esporos de *Cyathea âel-gadiiy* 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 fluorescente branca constante

EC - escuro constante

fonte b: lâmpada fluorescente vermelha

T r a t a m e n t o	G e r m i n a ç ã o 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 _{5%} (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, iniciando após o período de pré-indução. Nota-se que houve um aumento gradual da germinabilidade, 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 determinadas temperaturas 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 germinabili-

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 fluorescente branca constante

EC - Escuro constante

fonte b: lâmpada fluorescente vermelha

Tratamento	Germinação valor angular		
	Experimento		
	1	2	3
Coleta	junho	março	abril
armazenamento (dias)	85	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	30,29 a	31,78b
30	25,02c		
35	0,95a		-
40			0,0 a
45			0,0 a
DMS 5% (Tukey)	4,46	5,46	2,3

dade semelhante à observada para os controles, a 25° C que receberam apenas um tratamento luminoso (experimento 1, da Tabela 7). Temperaturas altas (35, 40 e 45° 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° 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° 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° C fornecidas durante os períodos de pré e pós-indução inibem totalmente o efeito promotor dos tratamentos luminosos diários. Isto sugere a anulação da fotossensibilidade ou inibições também a nível metabólico, impedindo a germinação. A temperatura de 20° C aplicada durante esses períodos causa uma redução da germinação, quando se compara a germinabilidade a 25° 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 de temperaturas durante os períodos de pré-indução e pós-indução, sobre a germinação de esporos de *Cyathea aelgadii* que receberam 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 fluorescente branca constante

EC - Escuro constante

fonte b: lâmpada fluorescente vermelha

T r a t a m e n t o	Germi nação valor angular		
	E x p e r i m e n t o		
	1	2	3
C o l e t a	junho	ab r i l	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-i ndução			
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_{5%} (Tukey)	'1 , 45	1, 44	3, 0

TABELA 10 - Efeito de temperaturas durante os períodos⁷ de pré-indução e pós-indução, na germinação de esporos de *Cyathea delgadi-i* 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

fonte b: lâmpada fluorescente vermelha

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 pri-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 _{5%} (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 delgad-ii* 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 fluorescente branca constante

EC - Escuro constante

fonte b: lâmpada fluorescente vermelha

8 horas sempre a 25° C.

T r a t a m e n t o	Germi nação 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	ab ri 1	ab ri 1	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	0,95	0,0 a
Pares de temperatu- ras 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 _{5%} (Tu key)	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 aelgadii* 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 fluorescente branca constante

EC - Escuro constante

fonte b: lâmpada fluorescente vermelha

12 horas sempre a 25° C.

T r a t a m e n t o	G e r m i n a ç ã o valor angular			
	E x p e r i m e n t o			
	1	2	3	4
C o l e t a armazenamento (dias)	março	março	março	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 _{5A} (Tu key)	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. Não foram considerados os valores de luz constante nos cálculos de F.

LC - Luz fluorescente branca constante

EC - Escuro constante

fonte b: lâmpada fluorescente vermelha
16 horas sempre a 25° C.

T r a t a m e n t o	Germi nação valor angular				
	E x o 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)	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
Parês de temperatu- ras 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_{5X} (Tukey) 2,71 5,08 3,30 4,70 1,84

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

Em resumo, 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.

Na série de experimentos representados nas Tabelas 14, 15 e 16, analisou-se o efeito, nos períodos de pré e pós-indução, dos 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. Estes pares foram em ciclos de 8-16 horas, sendo 8 horas a 25° C e 16 horas na temperatura alternada (Tabela 14); 12-12 horas, sendo 12 horas a 25° C e 12 horas na temperatura alternada (Tabela 15) e 16-8 horas, sendo 16 horas a 25° C e 8 horas na temperatura alternada (Tabela 16). A alternância sempre iniciou a 25° C.

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

Os efeitos de temperaturas alternadas em ciclos de 12-12 horas durante os períodos de pré e pós-indução estão indicados na Tabela 15. Os pares alternantes 25-5° C (Expe-

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. Não foram considerados os valores de luz constante nos cálculos de F.

LC - Luz fluorescente branca constante

EC - Escuro constante

fonte b: lâmpada fluorescente vermelha

8 horas sempre a 25° C.

Tratamento	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 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
MS 5% (Tukey)	1,84	1,45	2,89	3,65	1,84

rimento 1), 25-10° C (Experimento 2), 25-35° C (Experimento 2), 25-40° C (Experimento 5) e 25-45° C (Experimento 5) inibiram o efeito do tratamento de luz vermelha, de 1 minuto de duração, fornecidos após o período de pré-indução. Houve pequena resposta de germinação, para esporos tratados com os pares 25-15° C e 25-30° C, embora não significativa estatisticamente.

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 anuíadas 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 a pré-embebição em vapor de água durante uma semana para se verificar se havia aee-

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 11 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 fluorescente branca constante

EC - Escuro constante

fonte b: lâmpada fluorescente vermelha

12 horas sempre a 25° C.

T r a t a m e n t o	G e r m i n a ç ã o V a l o r a n g u l a r				
	E x o e r i m e n t o s				
	1	2	3	4	5
C o l e t a	março	junho	ab r i l	ab r i l	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

DMS₀ / ₀ (Tukey) 1 , 84 2,55 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 delgad-ii*₃ 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 fluorescente branca constante

EC - Escuro constante

fonte b: lâmpada fluorescente vermelha
16 horas sempre a 25° C.

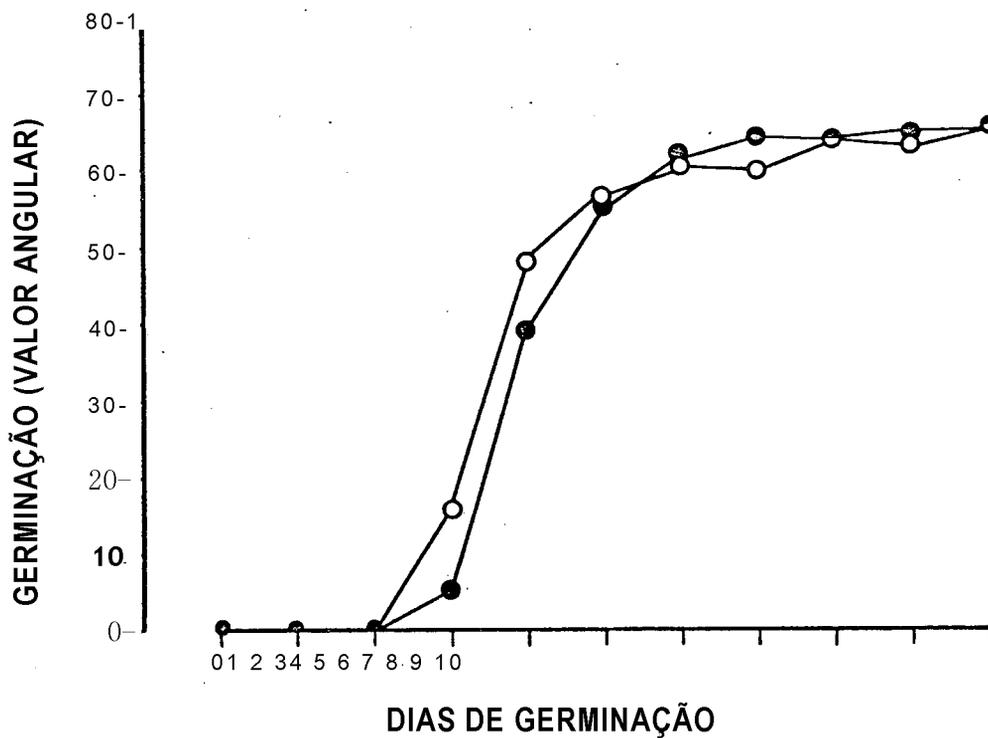
Tratamento	Germinação				
	Valor angular				
	Experimentos				
	1	2	3	4	5
Coleta	março	junho	abril	abril	março
armazenamento (dias)	154	68	170	190	162
Controle LC	46,15	41,43	53,04	46,25	49,18
Controle EC	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,95 a	0,0 a
Pares de temperaturas alternadas em ciclos de 16-8 horas					
25° 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 5% (Tu key)	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 oslofane 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



O-esporos embebidos em vapor de água

©- esporos secos

FIGURA 17 - Efeito da pre-embrição 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.

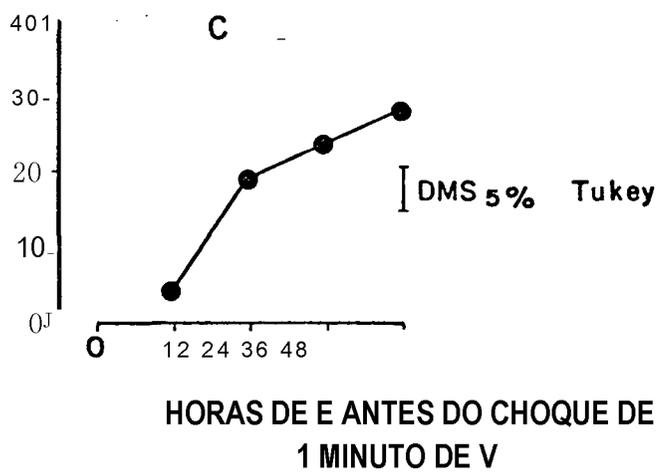
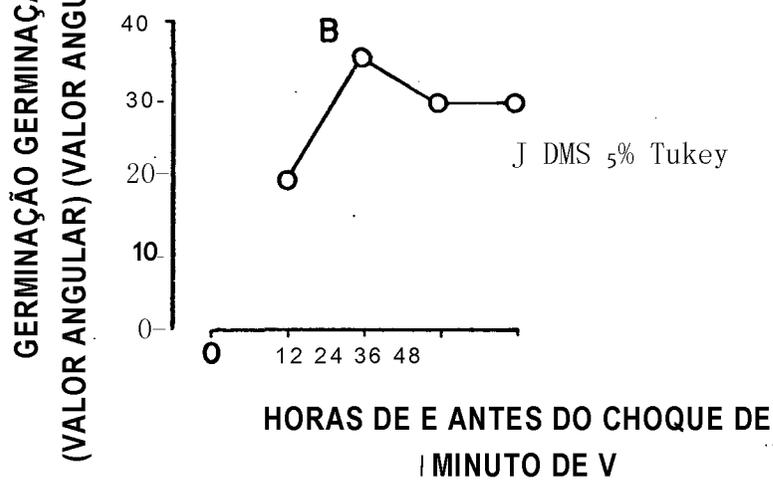
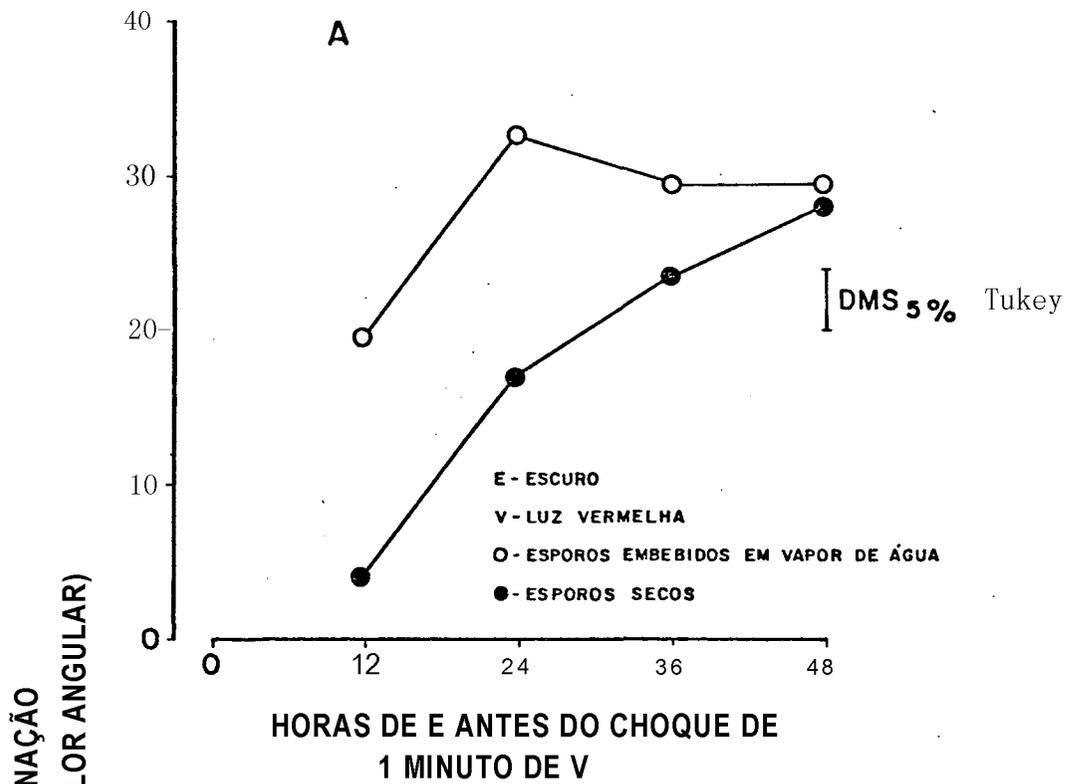
A - Comparação entre tratamentos luminosos aplicados a esporos pré-embebidos em vapor de água e esporos secos de *Cyathea delgadti*.

B - Tratamentos luminosos aplicados a esporos pré-embebidos.

C - Tratamentos luminosos aplicados a esporos secos.

Fonte c: lâmpada fluorescente gro-lux associada a filtro de papel celofane vermelho

FIGURA 18



pré-embebidos é a Figura 18C apenas para esporos secos. Para esporos pré-embebidos, a maior resposta de germinação foi obtida após 24 horas de embebição no escuro e para esporos secos após 48 horas.

Na Figura 19 estão representados resultados de um experimento onde esporos pré-embebidos em vapor de água neceberam tratamento luminoso de um minuto de duração após 24, 48, 72 e 96 horas de embebição no escuro. Os mesmos trjtamentos foram realizados para esporos secos. A Figura 19A compara respostas de esporos pré-embebidos com esporos secos. Confirmando os resultados obtidos na figura 18, observa-se que as maiores promoções de germinação foram obtidas para esporos pré-embebidos que receberam tratamento luminçso após 24 horas de embebição no escuro e para esporos secos que receberam tratamentos luminosos após 48 horas de embebição no escuro. Os valores de germinação foram estatisticamente iguais para esporos pré-embebidos e esporos secos, após 48 horas de embebição no escuro. Após 72 e 96 horas de embebição no escuro, houve redução da germinação, tanto para esporos pré-embebidos quanto para esporos secos. Entretanto, a diminuição na resposta de germinação, foi e_staticamente maior para esporos pré-embebidos. A Figura 19B mostra o efeito dos tratamentos luminosos em esporos pré-embebidos, mostrando que a resposta de germinação para esporos que receberam tratamento luminoso após 24 horas de embebição 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 pre-indu—

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

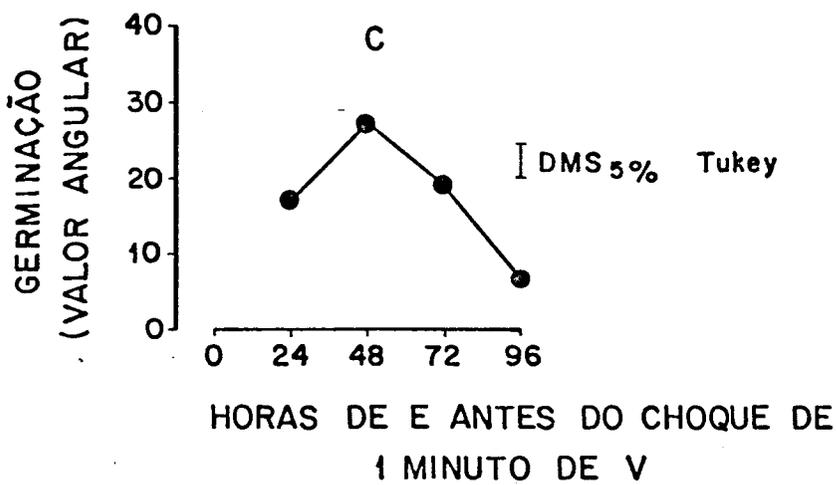
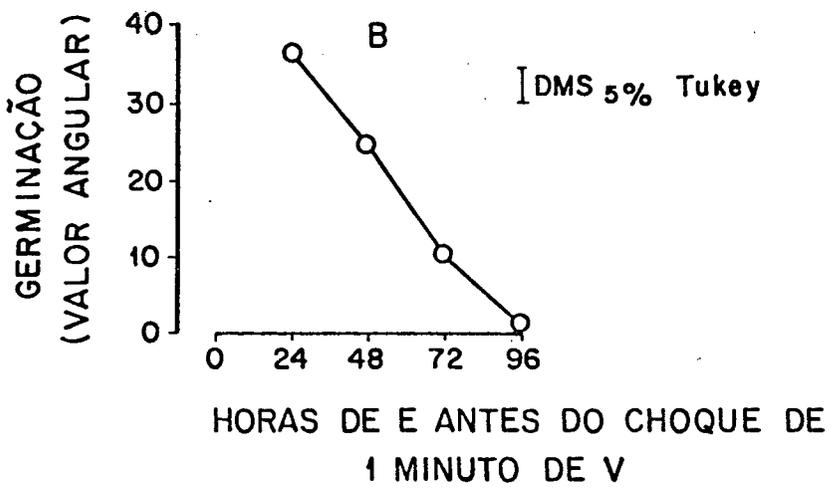
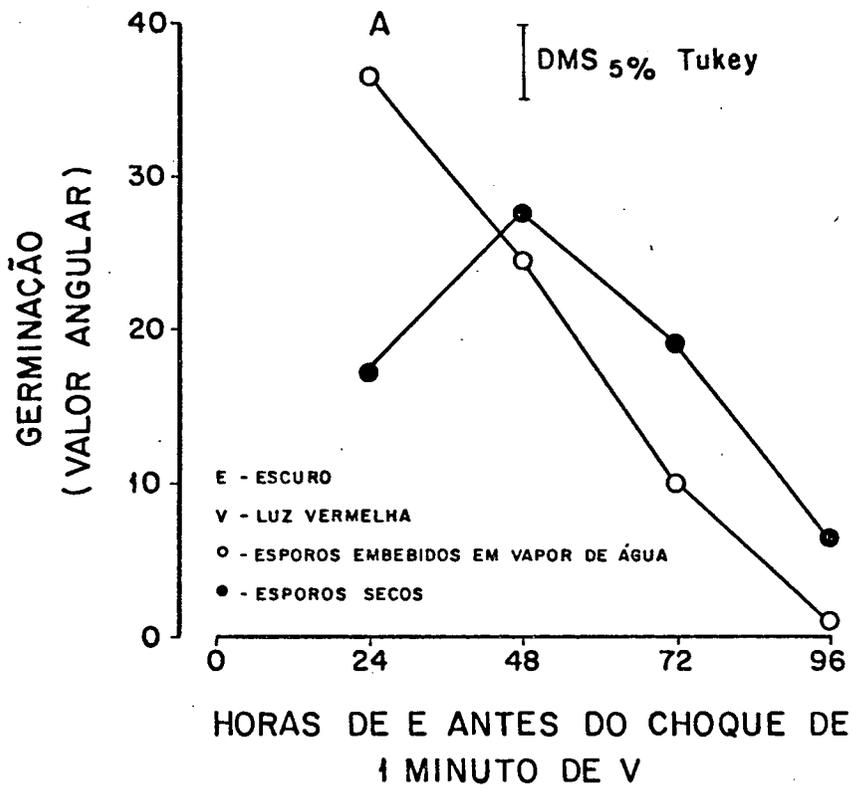
A - Comparação entre tratamentos luminosos aplicados a esporos pré-embebidos em vapor de água e esporos secos de *Cyathea delgadii*.

B - Tratamentos luminosos aplicados a esporos pré-embebidos.

C - Tratamentos luminosos aplicados a esporos secos.

Fonte c: lâmpada fluorescente gro-lux associada a filtro de papel celofane vermelho

FIGURA 19



ção, são as 48 horas de embebição no escuro.

A Figura 20 representa os resultados de um experimento onde se comparou o efeito de tratamentos únicos de luz vermelha, de 1 minuto de duração, com 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 e

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

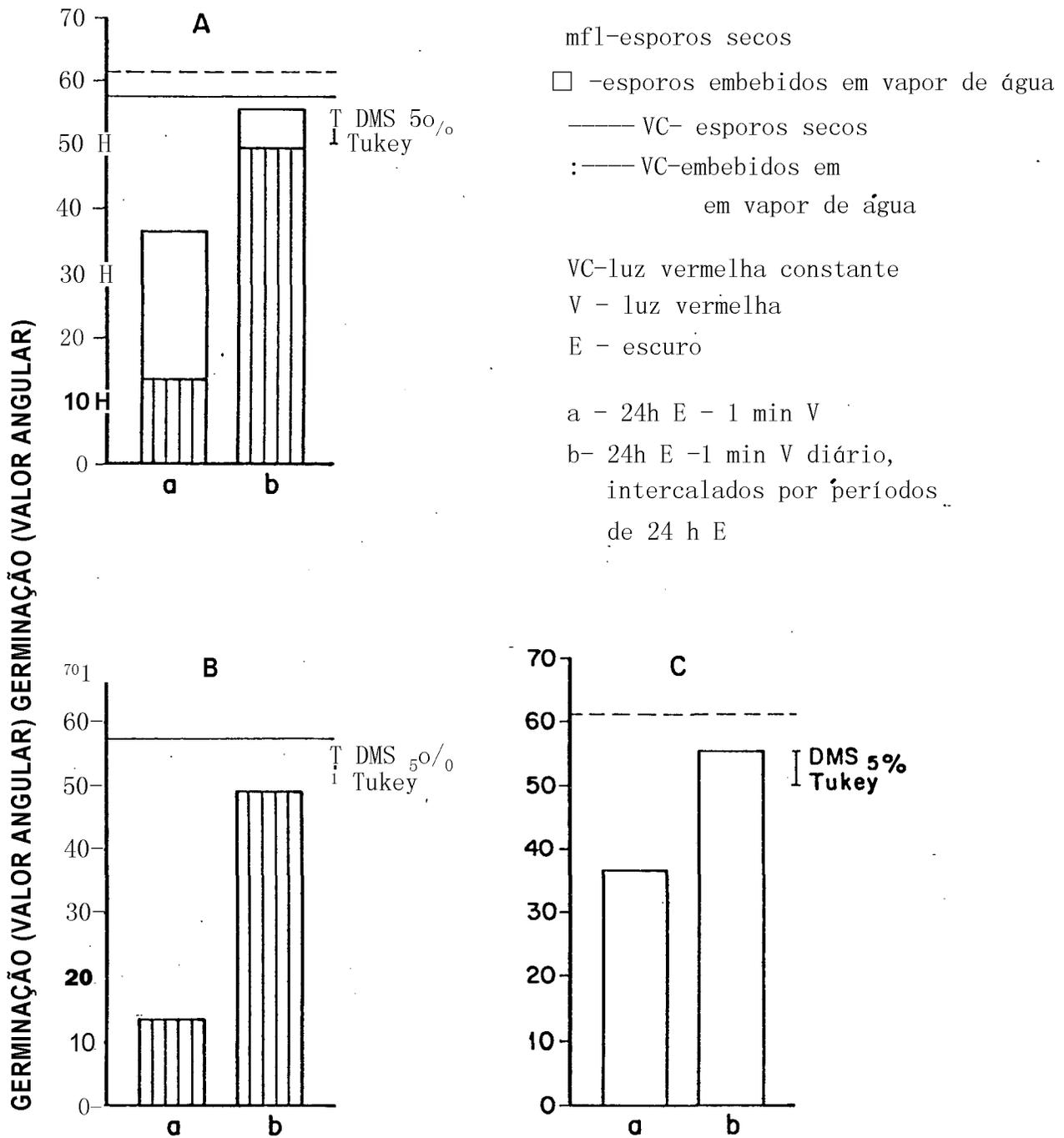
A - Comparação entre tratamentos luminosos para esporos pre-embebidos em vapor de água e esporos secos de *Cyathea delgaãii*.

B - Tratamentos luminosos aplicados a esporos secos.

C - Tratamentos luminosos aplicados a esporos pre-embebidos.

Fonte c: lâmpada fluorescente gro-lux associada a filtro de papel celofane vermelho

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, g), 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 j, 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.

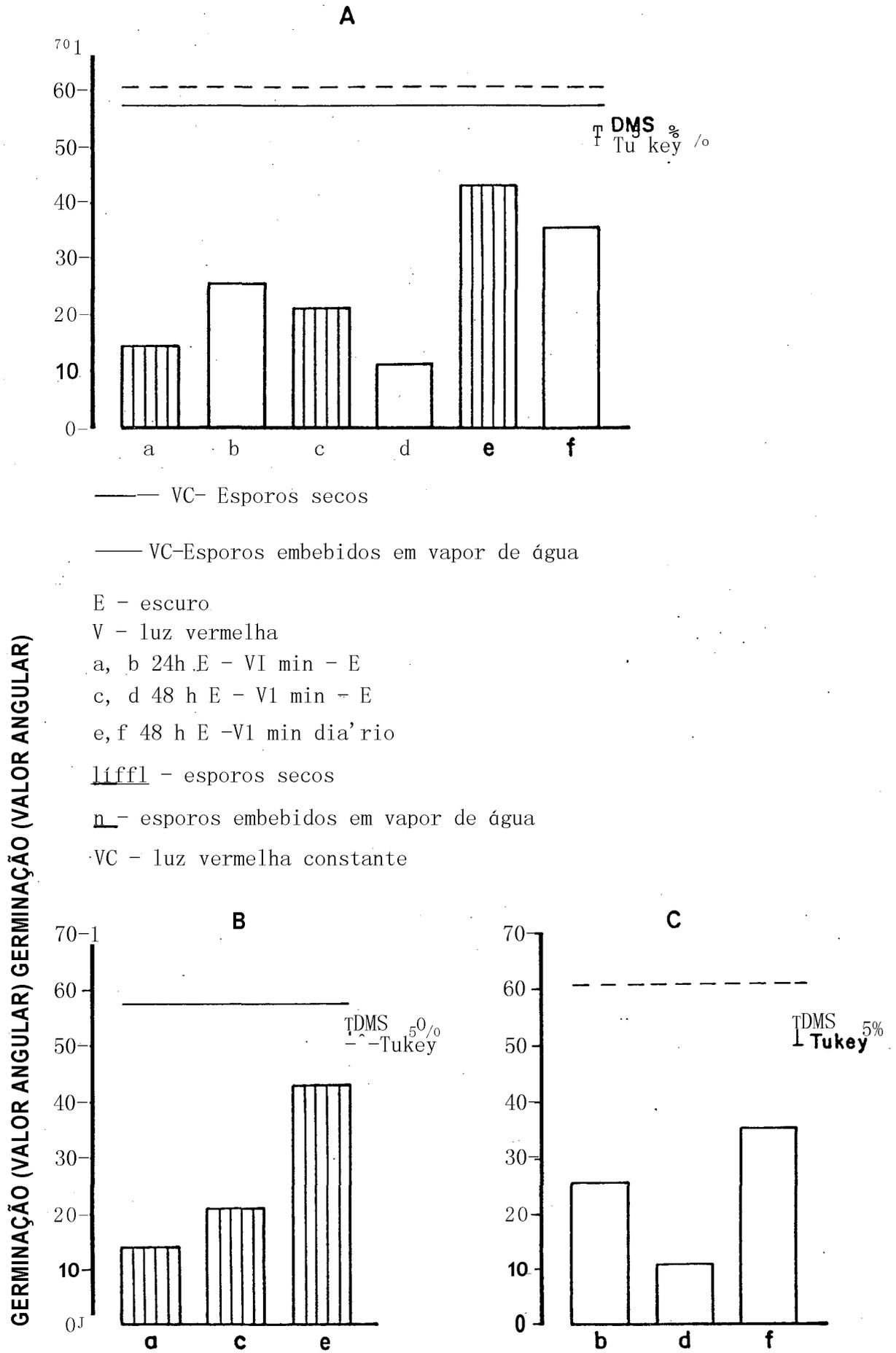
A - Comparação entre tratamentos luminosos para esporos pré-embebidos em vapor de água e esporos secos de *Cyathea ãelgadi-i*.

B - Tratamentos luminosos aplicados a esporos secos.

C - Tratamentos luminosos aplicados a esporos pré-embebidos.

Fonte c: lâmpada fluorescente gro-lux associada a filtro de celofane vermelho

FIGURA 21



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 acelerou o período de pré-indução, como também aumenta a fotossensibilidade dos esporos. Respostas de germinação semelhantes ^{JA/} _λ as 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.

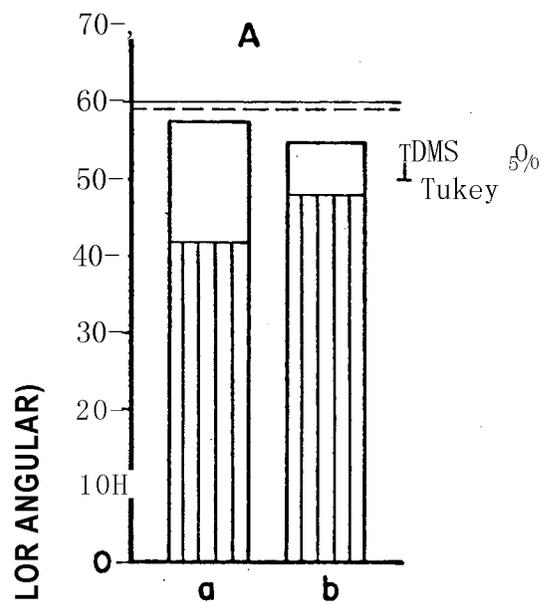
A - Comparação entre tratamentos luminosos para esporos pré-embebidos em vapor de água e esporos secos de *Cyathea delgadii*.

B - Tratamentos luminosos aplicados a esporos pré-embebidos.

C - Tratamentos luminosos aplicados a esporos secos.

Fonte c: lâmpada fluorescente gro-lux associada a filtro de papel celofane vermelho

FIGURA 22

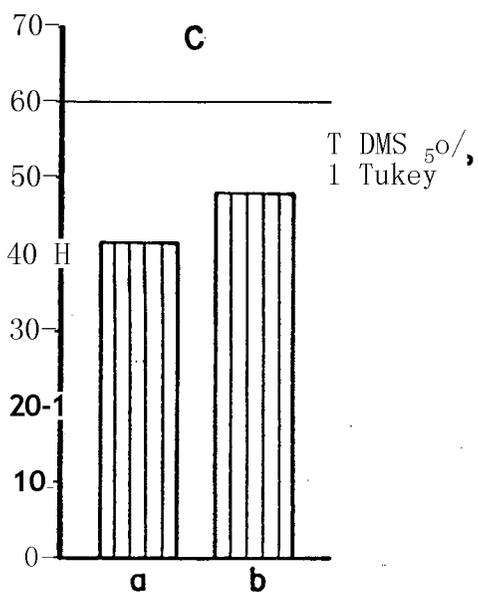
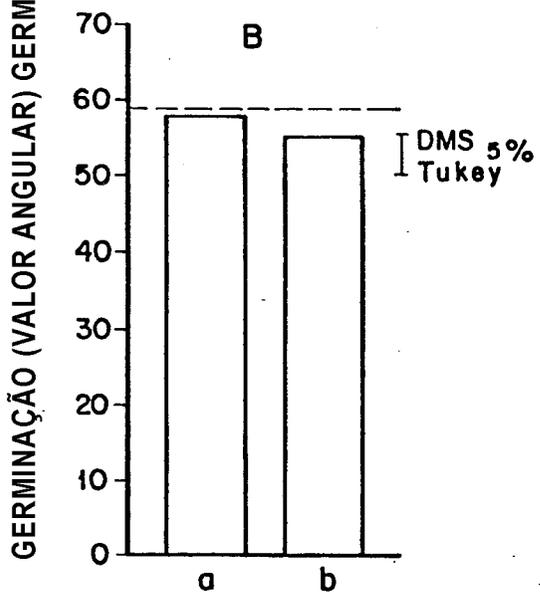


fím - esporos secos
 0 - esporos embebidos em vapor de água
 — VC-esporos secos
 — VC-esporos embebidos em vapor de água

VC * luz vermelha constante
 V - luz vermelha
 E - escuro

a - 24h E - V 8h

b - 48h E - V 8h



3. PRE-EMBEBIÇÃO EM SOLUÇÃO OSMOTICA DE POLIETILENOGLICOL

A pré-embebição em solução osmótica de polietilenoglicol (PEG) 6.000, na concentração de 288g/litro (o que fornece um potencial osmótico de -11 ,o bars, a 15° C) 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 79 dia, já que, em geral, a estabilização ocorre nesse período.

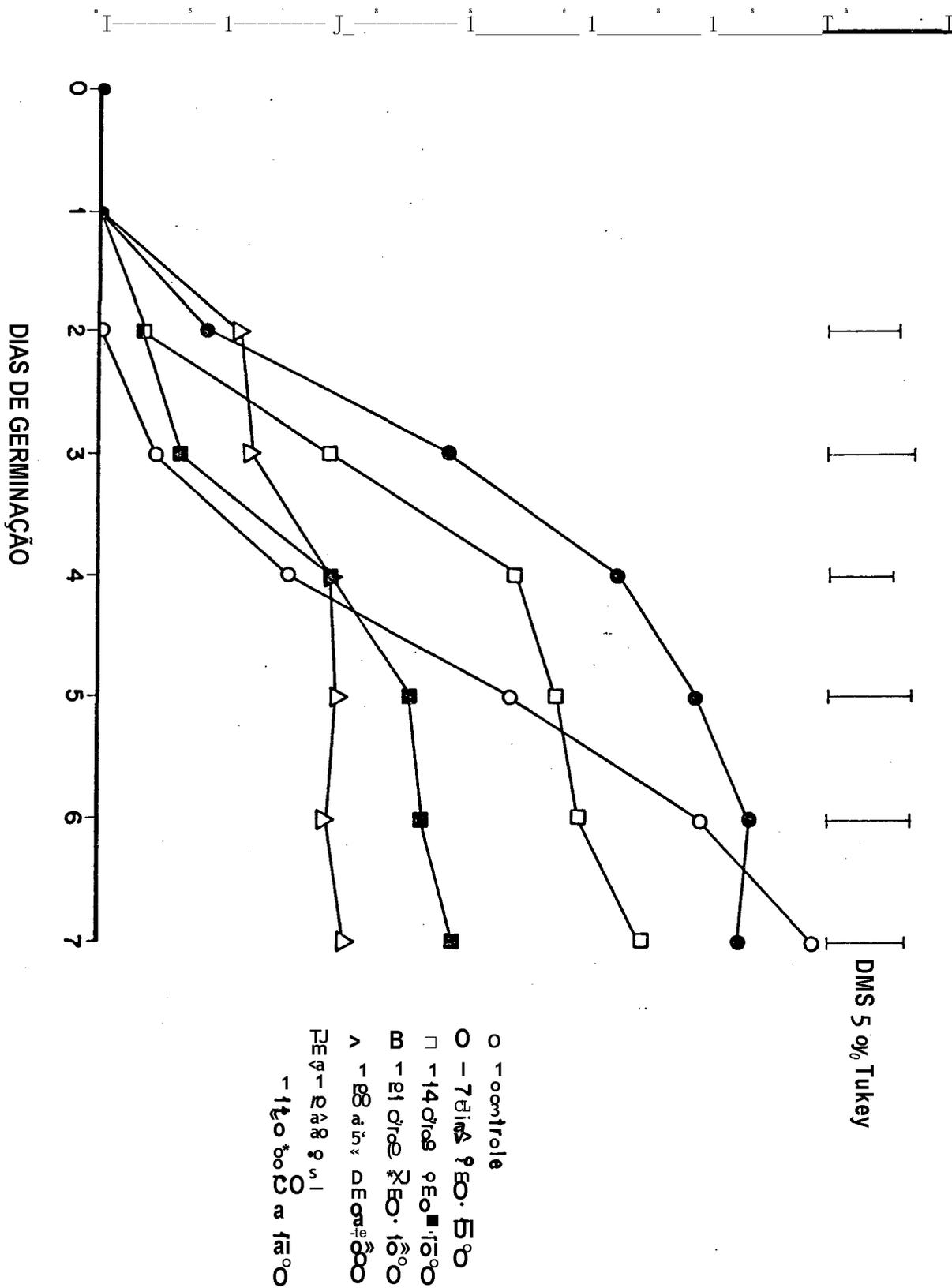
A Figura 23 representa as curvas de germinação para esporos pré-embebidos por 7, 14, 21 e 28 dias em solução de PEG e que a seguir foram transferidos para solução nutritiva sob luz fluorescente branca constante e temperatura de 25° C. Esporos pré-embebidos em solução de PEG, durante uma semana, apresentaram os maiores valores de germinação, do terceiro ao sexto 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, o processo tenha sido acelerado. Esporos pré-embebidos durante 28 dias em solução de PEG, apresentaram os maiores valores de germinação, no segundo dia de contagem, mas também os mais baixos, no quinto dia, quando a germinação já havia estabilizado, após esse tratamento.

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^o C, para esporos de *Cyathea delgadii*, pré-embecidos em solução osmótica de polietilenoglicol. PEG 6.000 foi usado na concentração de 288g/litro; "11,0 bars a 15° C, por 7, 14, 21 ou 28 dias.

FIGURA 23

GERMINAÇÃO (VALOR ANGULAR)



de esporos de *Cyathea delgadii*, mas causa uma inibição da porcentagem final de germinabilidade. Períodos mais prologados 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. DICLOROFENILDIMETILUREIA

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

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 os pesos frescos e secos de esporos secos (dia zero) de *Cyathea delgadi-L* 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 ⁻⁵ M	51,67 C
DCMU 10 ⁻⁴ M	18,63 b
DCMU 10 ⁻³ M	! 0,0 a
DMS ₅ cf (Tu key)	5,54

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

Di as de germi nação	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 _{5%} (Tukey)	5,06	4 ,03

ro e se te, 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

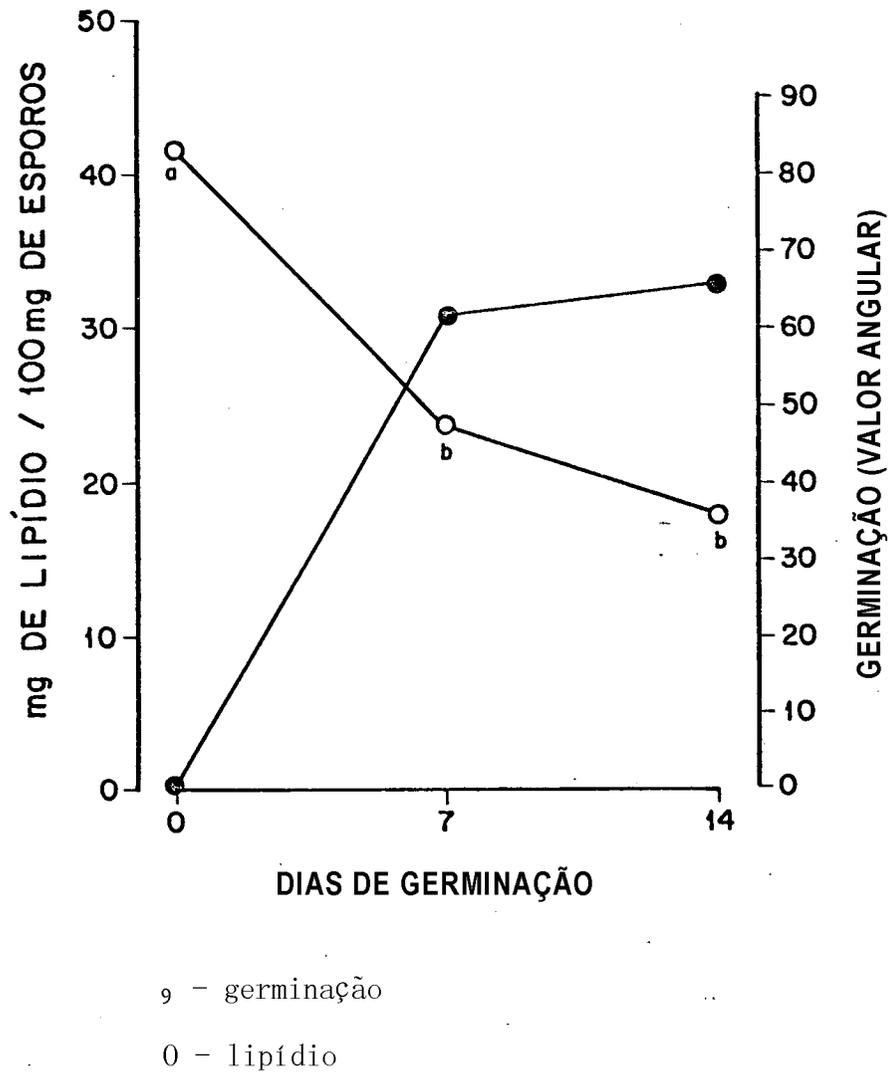


FIGURA 24 - Conteúdo de lipídios livres em esporos secos (dia zero) de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25° C.

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

PF - peso fresco

PS - peso seco

Di as de germi nação	mg lipídio/mg PF	mg lipTdió/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) filtrou totalmente a luz azul, sendo que ocorreu aumento de transmitância 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%). O óleo bruto de sementes de algodão (Figura 26) também filtrou completamente a luz azul e houve aumento gradativo da transmitância 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 delgad-ii*, 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 palmítico, esteárico, linolênico, ficosenônico e beênico ocorrem em pequenas quantidades, além de um ácido graxo não identificado pelo tempo

FIGURA 25

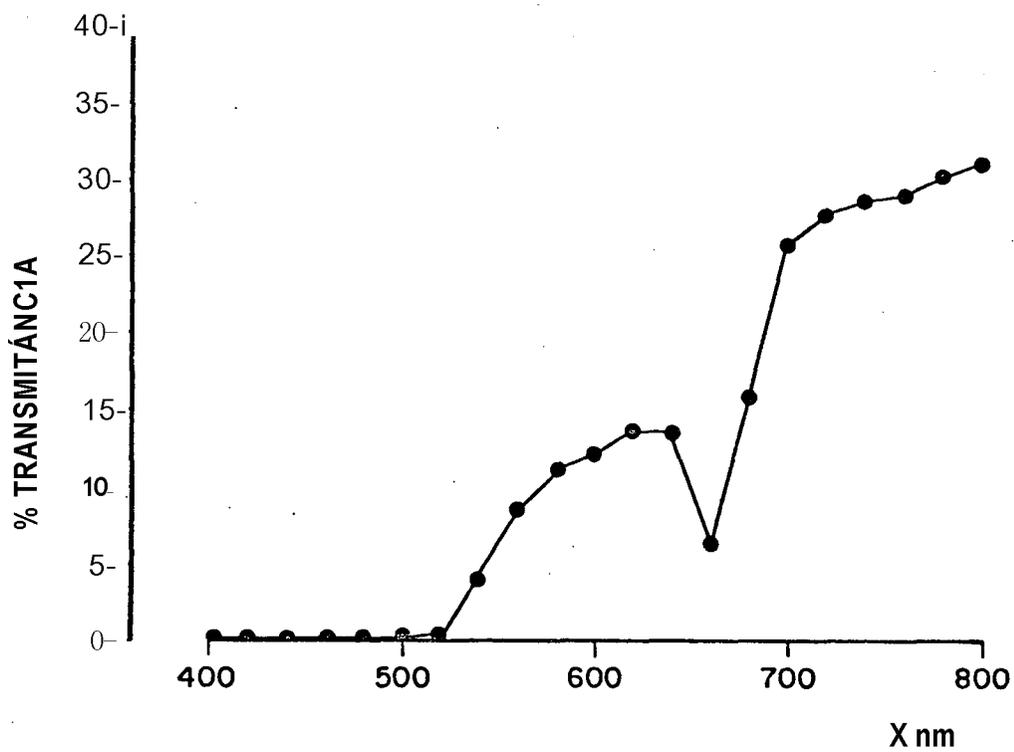


FIGURA 25 - Espectro de transmissão de luz do óleo de esporos secos na faixa da luz visível (400 a 800 nm).

FIGURA 26

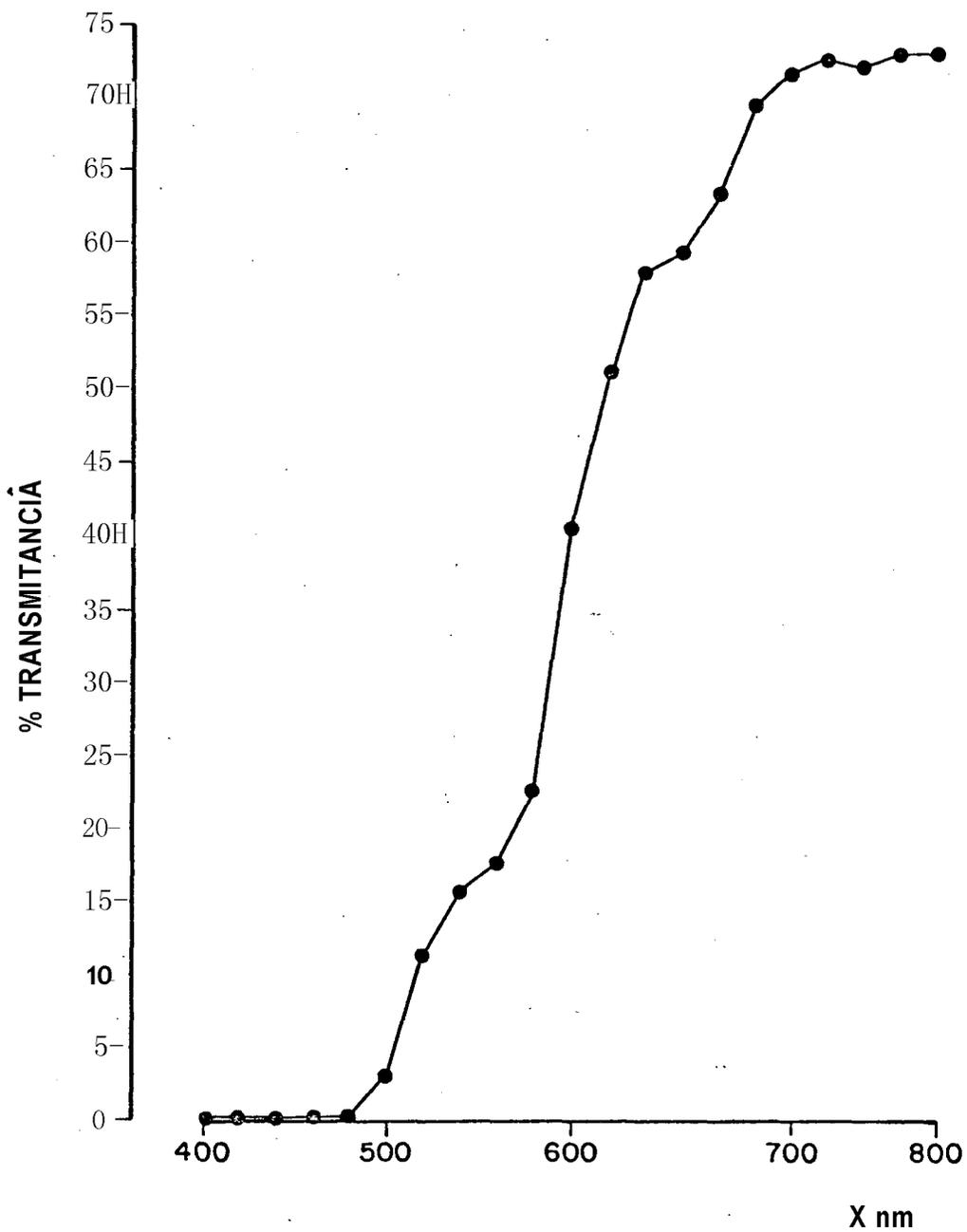


FIGURA 26 - Espectro de transmissão de luz do Óleo de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*) na faixa da luz visível (400 a 800 nm).

FIGURA 27 - Cromatografia gasosa dos ácidos graxos componentes do óleo de esporos secos de *Cyathea delgadii*. Padrão: tempo de retenção do ácido oléico.

FIGURA 27

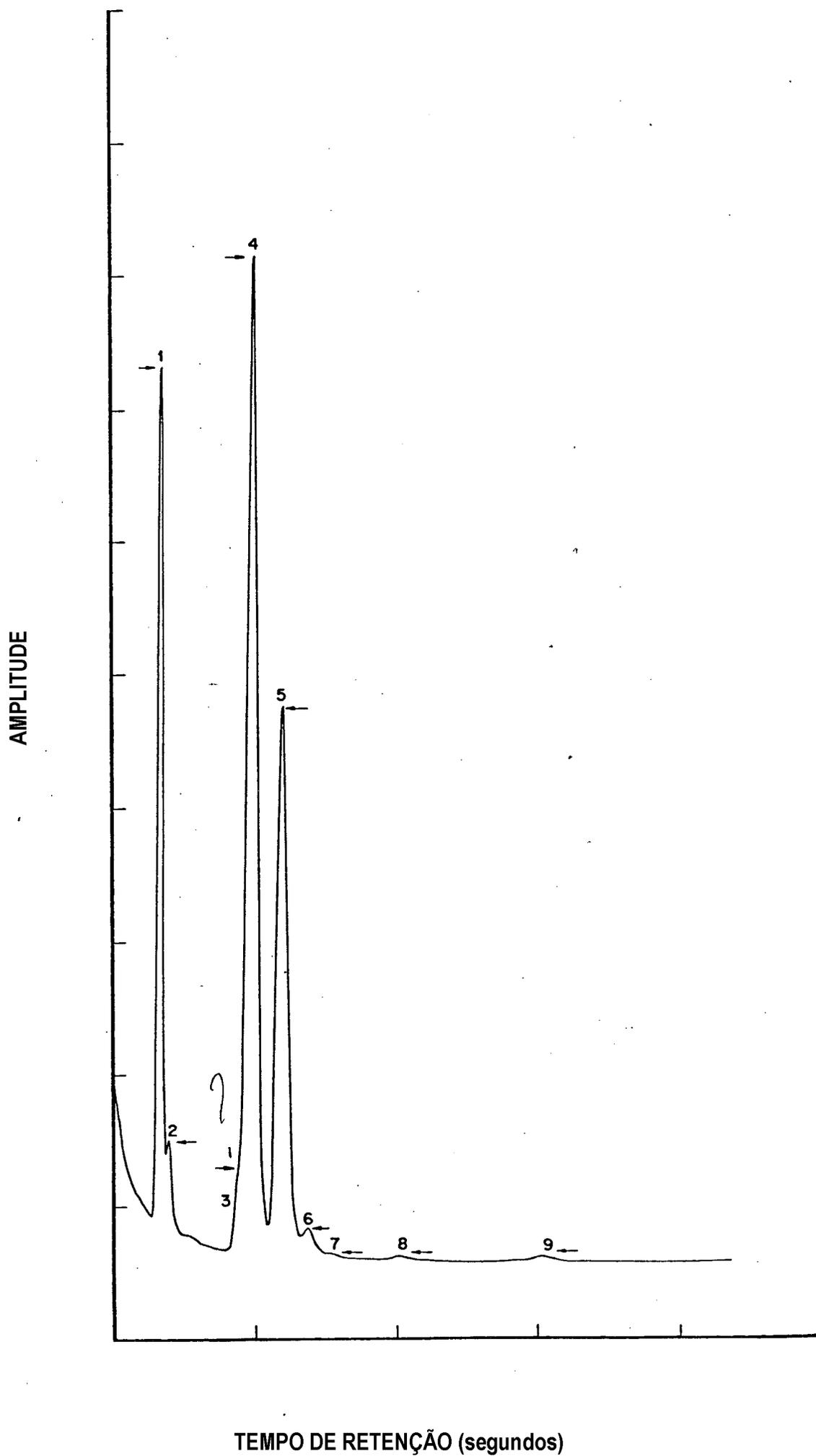


TABELA 20 - Composição de ácidos graxos de Óleo de esporos secos de *Cyathea delgadi-L.*

Padrão: tempo de retenção do ácido oléico.

Pi co	Aci do graxo	% do Total
1	Pa lmTti co 16:0	27,5
2	Palmi to. l eico 16:1	2,2
3	Esteãri co 18:0	1,3
4	Ol ei co 18:1	46 ,87
5	Linoléico 18:2	20,71
6	Não identificado	0,89
7	Linolênico 18:3	traços
8	Fi cosenõi co 20:1	0,22
9	Beinico 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 μ 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

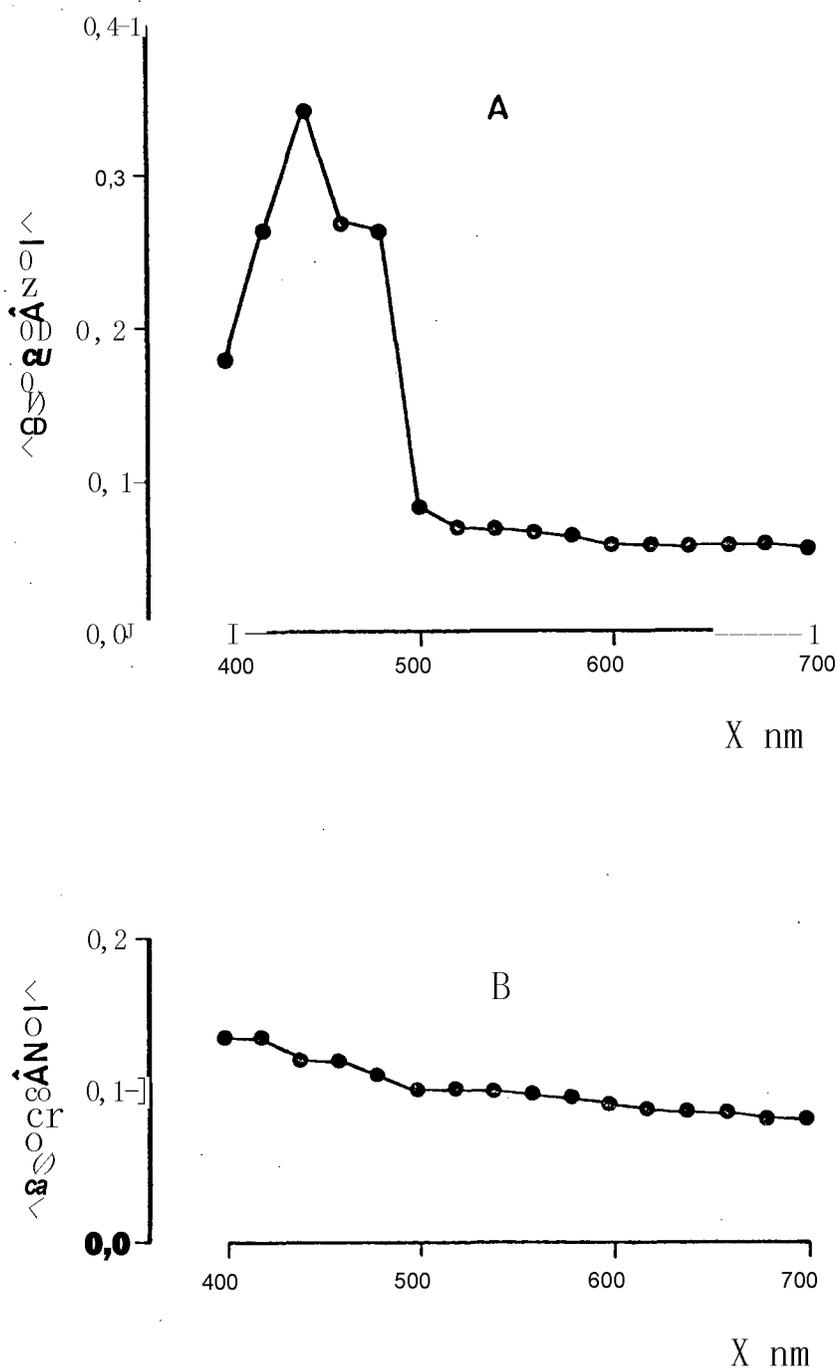


FIGURA 28 - Espectros de absorção de luz de extratos de esporos secos de *Cyathea delgadi-i*.
A - Fração éter dietílico
B - Fração acetona 80%

FIGURA 29

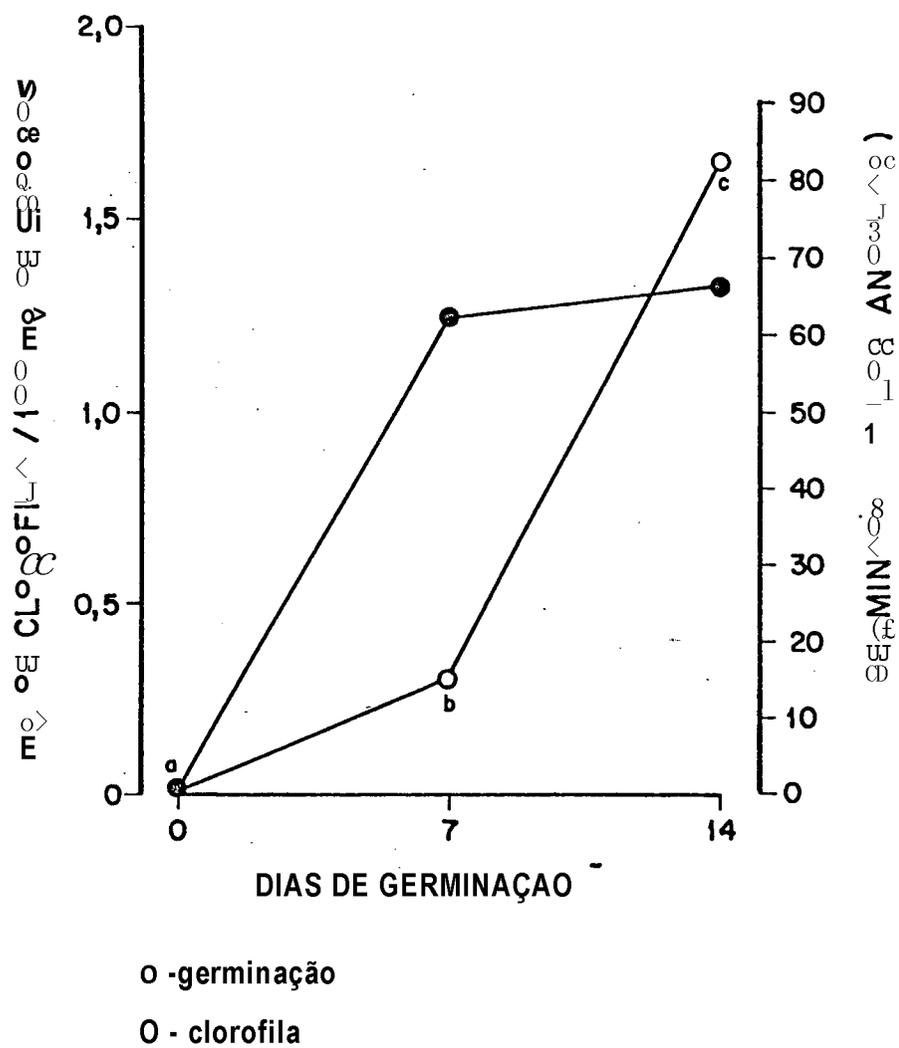


FIGURA 29 - Conteúdo de clorofila em esporos secos de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz flúorescente branca constante, a 25° C.

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

PF - peso fresco

PS - peso seco

Di de germVnaçio	Jug clorofila/mg PF	jug 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 delgaãii*.

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 Solúveis Totais

O conteúdo de açúcares solúveis totais 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

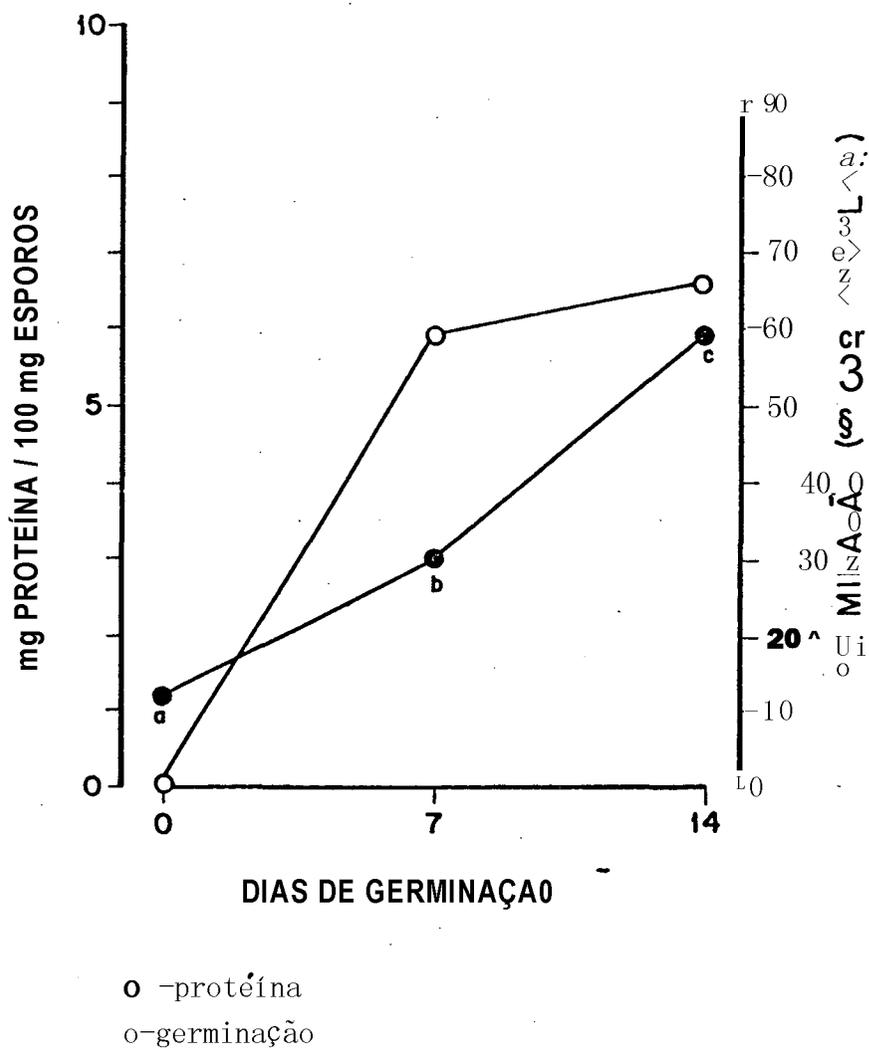


FIGURA 30 - Conteúdo de proteínas solúveis, em esporos secos de *Cyathea delgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25° C.

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

PF - peso fresco

PS - peso seco

Di as de germi nação	,ug proteína/ mg PF	,ug 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 delgaãí-L.* 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 79 e o 149 dia.

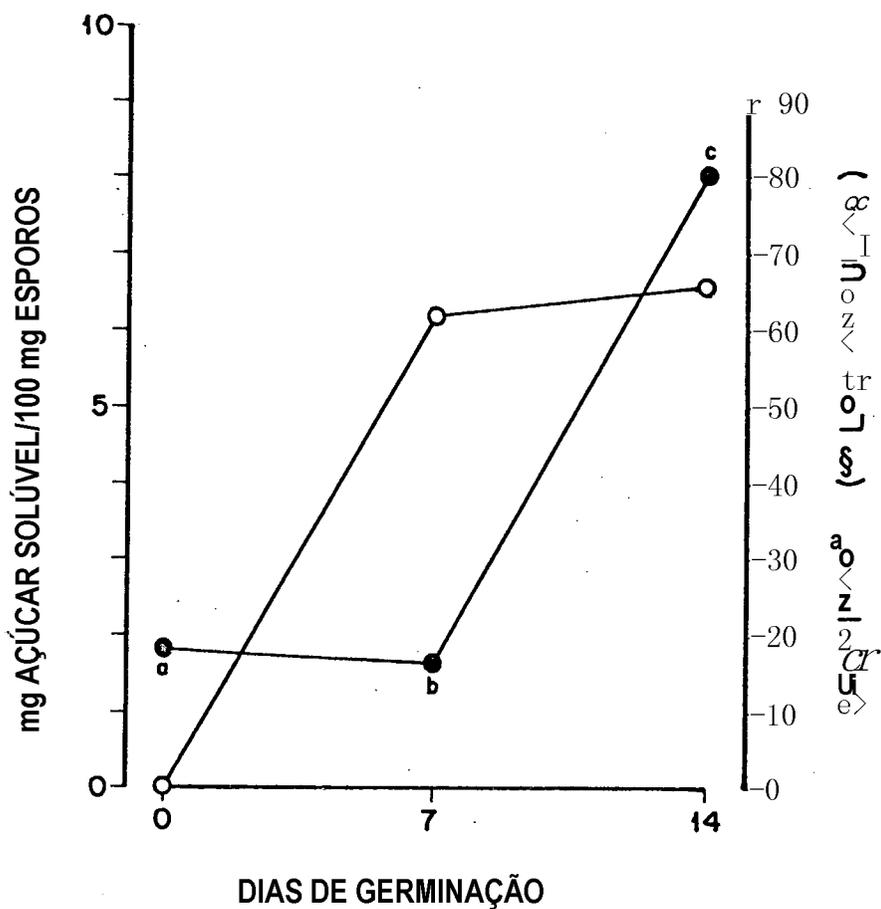
Na Tabela 23 está a relação entre conteúdo de açúcares solúveis totais e pesos fresco e seco (Tabela 18), em esporos secos e após 7 e 14 dias de germinação. O conteúdo de açúcares solúveis parece sofrer uma ligeira diminuição no dia 7, em relação ao peso fresco. Ocorre aumento gradual de açúcares solúveis 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 μg 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 solúveis
○ - germinação

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

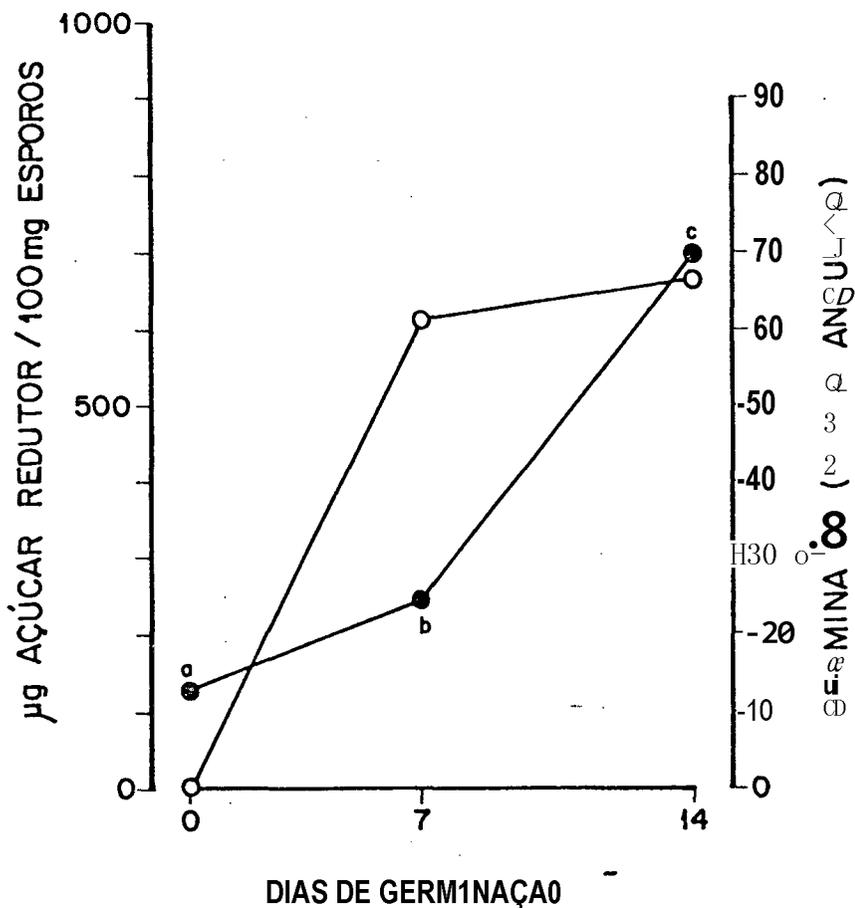
TABELA 23 - Relação entre conteúdo de açúcares solúveis totais e pesos fresco e seco (dados da tabela 18), em esporos secos de *Cyathea âelgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca contTnua, a 25° C.

PF - peso fresco

PS - peso seco

Dias de germinação	P9 açúcares solúveis/ mg PF	pg açúcares solúveis/ mg ps
0	18	19
7	16	28
14	64	130

FIGURA 32



○ - açúcares redutores

● - germinação

FIGURA 32 - Conteúdo de açúcares redutores (fração MCW e fração etanol 10%) em esporos secos de *Cyathea âelgadii* 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 delgaãii*, 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 açúcares redutores / mg PF	µg 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

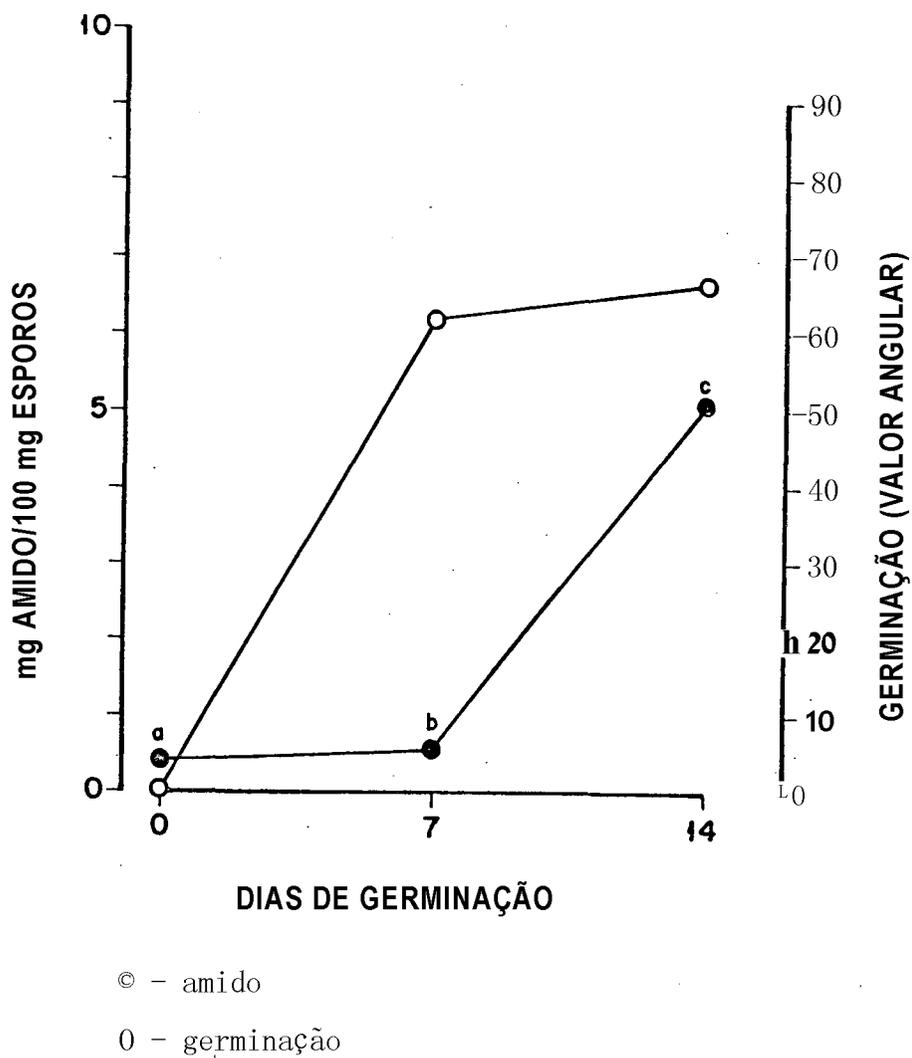


FIGURA 33 - Conteúdo de amido em esporos secos de *Cyathea aelgadii* e após 7 e 14 dias de germinação sob luz fluorescente branca constante, a 25° C.

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 germi nação	Aig amido / mg PF	jag 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 catiónicos 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 catiónicos. No material germinado (com 7 dias), as características observadas para a célula protonemal 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 evj

FIGURA 34 - Cortes de esporos secos de *Cyathea âelgaãii* corados pela hematoxilina-eosina. Podem ser notadas as eximas evidenciadas pela hematoxilina e citoplasma globular corado pela eosina.

Aumento: 2.680 X

FIGURA 35 - Cortes de gametófitos de *Cyathea âelgaãii*, com 7 dias de germinação, corados pela hematoxilina-eosina. Nota-se o citoplasma globular corado pela eosina e o núcleo da célula protonema (seta) e as paredes corados pela hematoxilina.

Aumento: 1.850 X

FIGURA 34

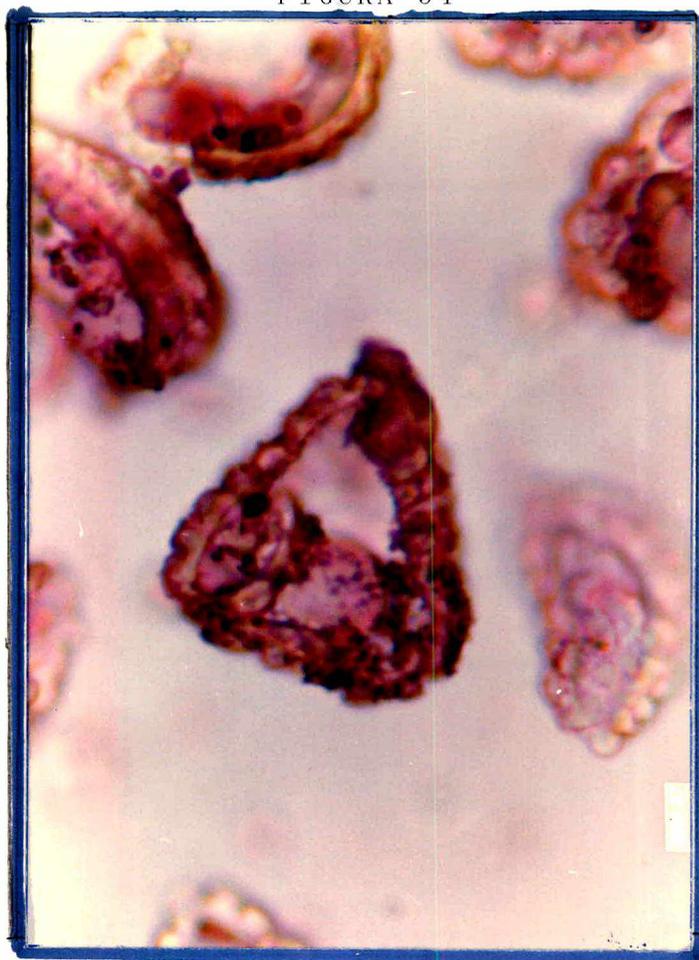


FIGURA 35



denciadosiem' 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 inetacromasia 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. Nota-se ainda a presença de alguns grânulos de amido no interior do esporo.

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 tújas moléculas

FIGURA 36 - Cortes de esporos secos de *Cyathea delgadLi* 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 delgadLi*, 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.

FIGURA 36

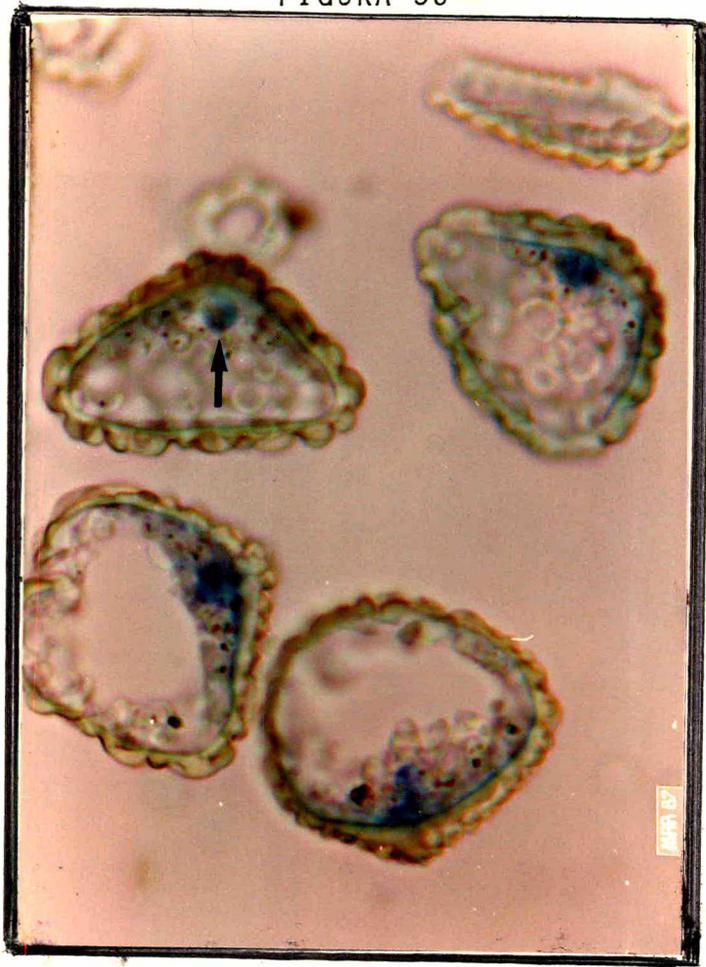


FIGURA 37

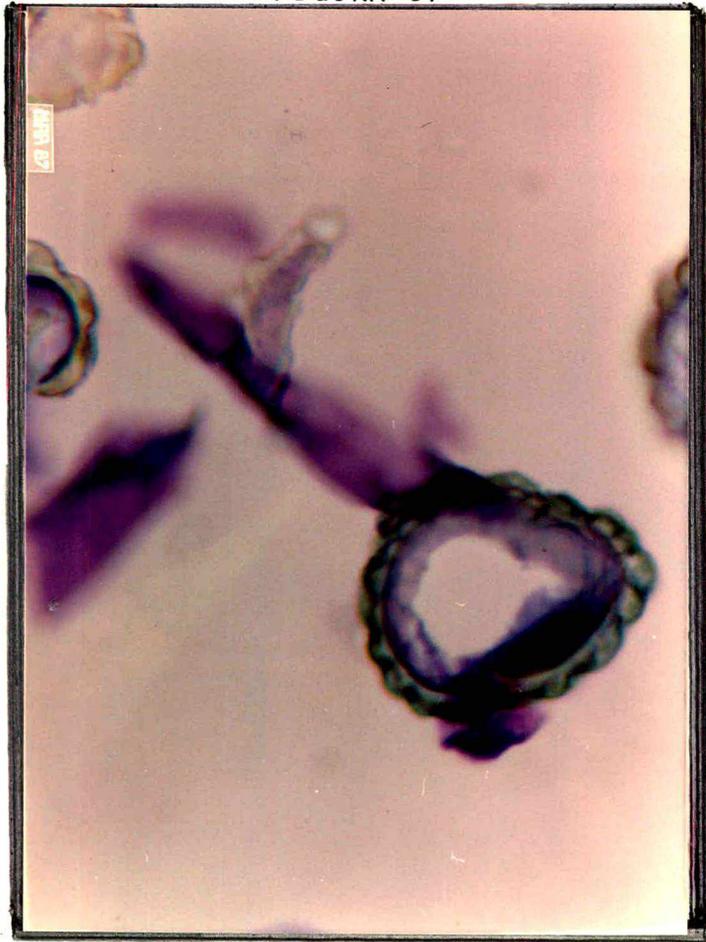


FIGURA 38 - Cortes de gametófitos de *Cyathea aelgadii*, com 7 dias de embebição, corados pelo azul de toluidina a pH 4,0. Observa-se a cicatriz em forma de trilete e metacromasia.
Aumento: 2.960 X

FIGURA 39 - Gametófito intacto de *Cyathea delgaãij* 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

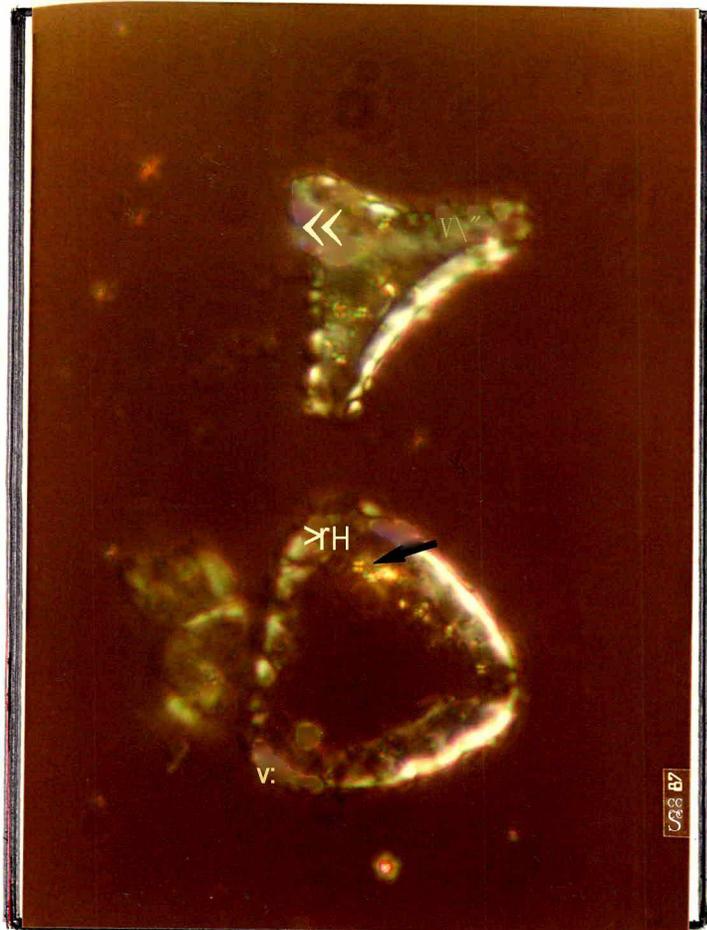


FIGURA 39



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. Pôde 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 agns
gação pode dificultar a ação das enzimas. Gametófitos jo-
vens apresentam as proteTnas desagregadas. Não se verifica
presença de corpos protéicos nesse material, o que deve fa^
cilitar a ação das enzimas proteoltti cas.

FIGURA 41 - Cortes de esporos secos de *Cyathea delgadii* corados pelo xylidine-ponceau à 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



- PRINCIPAIS CONCLUSÕES -

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, durante o período de pré-indução, maior o efeito indutor do tratamento luminoso, para as temperaturas alternantes: 10, 15, 20 e 30° C.

g) Tratamentos de 4 horas de luz vermelha ou branca, após o período de germinação, 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-umbebição 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-umbebição 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 umbebição e o peso seco diminui. Não há alteração do peso seco entre os dias 7 e 14.

n) Estudos citoquímicos confirmam a presença de amido em esporos quiescentes e o aumento de proteínas durante a germinação. Metacromasia aumenta nas paredes celulares durante a germinação.

- 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 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 79 dia, a curva de germinação atingiu a estabilidade. Já, MARCONDES-FERREIRA (1983), observou que a curva de germinação atingia a estabilização a partir do 129 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 germinabilidade 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 germinabilidade foi maior após 48 horas de embebição no escuro. Neste trabalho, foi sempre considerado como período de pré-indução, as 48 horas de embebição no escuro, visto que 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-

rTodo de pré-indução. Todas as amostras responderam com baixa germinabilidade e houve diferença de amplitude da resposta entre as coletas. Após 275 dias de armazenamento, houve uma diminuição da resposta, quando se trabalhou com a mesma coleta. Novamente, é confirmado o fato de que as respostas de esporos à luz são muito variadas e parecem se alterar dependendo do local, época de coleta e armazenamejito (FURUYA, 1983).

O efeito do tratamento luminoso de: 1 minuto de duração que foi aplicado após o período de pré-indução, foi revertido por aplicação subsequente de vermelho extremo de 5 minutos de duração. Há uma correlação direta e positiva entre a germinabilidade de esporos de *Cyathea delgadii* e o número crescente de horas de escuro (2 a 8 horas) intercaladas entre os tratamentos de luz vermelha e vermelho extremo. O "escape" da reversão do efeito da luz vermelha pelo vermelho extremo se completa após 8 horas de escuro intercalados entre os dois tratamentos de luz. Esse tipo de resposta indica que o fitocromo está envolvido no processo de germinação desses esporos. MARCONDES-FERREIRA (1983) trabalhando com tratamentos luminosos diários, de 1 hora de duração, observou a reversão do efeito da luz vermelha pelo vermelho extremo, em esporos de *Cyathea delgadii*. Os resultados dos atuais confirmam sua observação.

Quando foram realizados 1, 2, 3, 4 ou 5 tratamentos de 1 minuto de luz vermelha, com início após a pré-indução e intercalados por períodos de 24 horas de escuro, houve uma correlação positiva entre as porcentagens de germinação e o número de tratamentos luminosos fornecidos.

Foram também 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, com exceção do vermelho extremo e além. A lâmpada fluorescente vermelha exibe alguma contaminação com luz azul, o que foi verificado pelo uso de espectroscópio manual Cari 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 1 unrnosos: 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. O período de "escape" da reversão do efeito da luz vermelha (8 horas) pelo vermelho extremo (5 minutos) está compreendido entre os dois

tratamentos luminosos. 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 kunth-ii* 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 e se comportasse tristemente. 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.

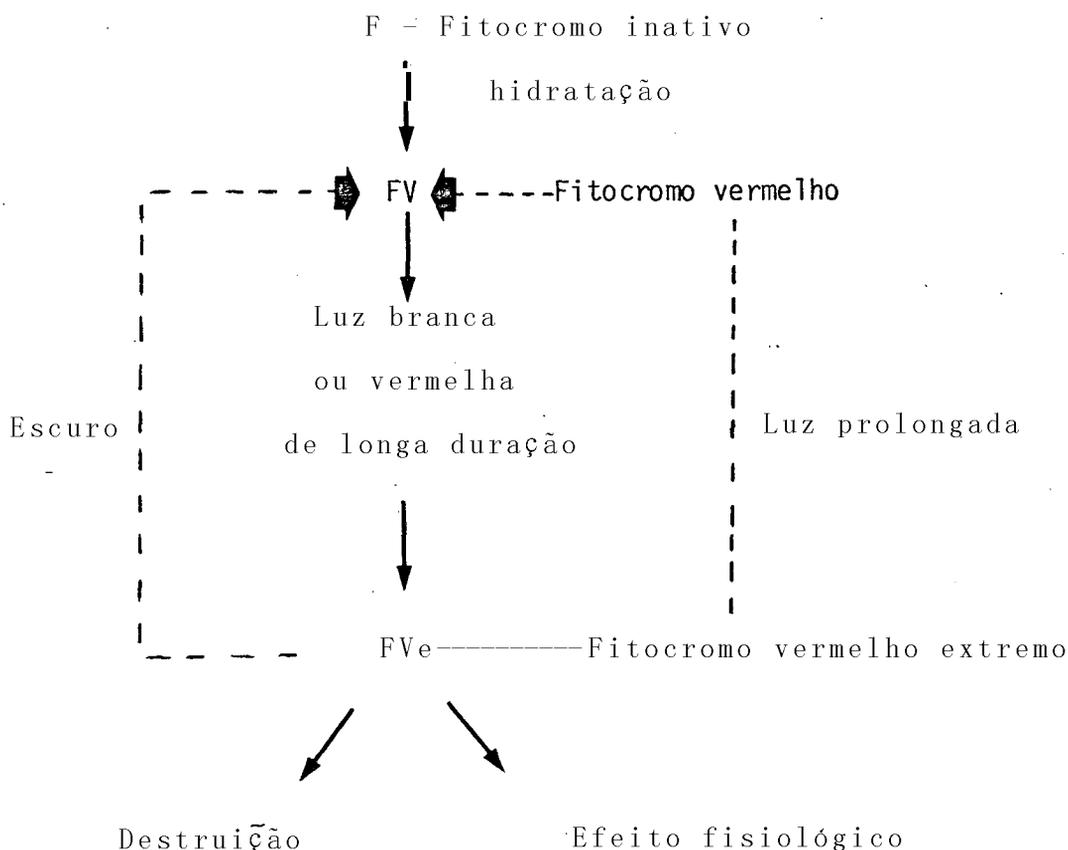
No caso da germinação de sementes induzida pela luz, ela parece ser determinada pela porcentagem de FVe sobre o nível do fitocromo total. A porcentagem parece ser muito variável, dependendo das espécies (MAYER e POLJAKOFF -MAYBER, 1982). No caso de esporos, poderia existir uma faixa de porcentagens de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

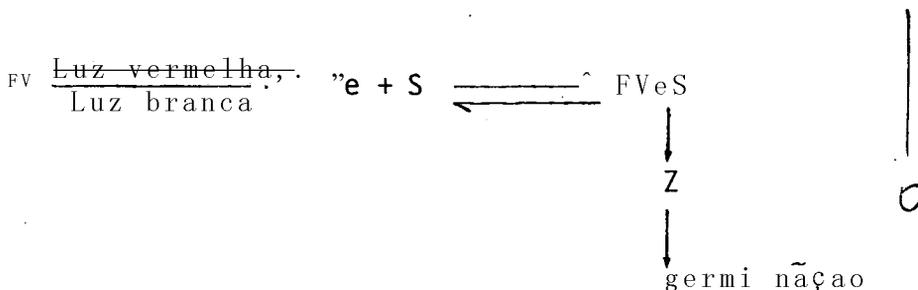
Um mecanismo semelhante poderia explicar o efeito

de tratamentos luminosos longos, na germinação de esporos de *Cyathia dQ. Igadi. l.* Esses tratamentos mostram uma saturação entre 4 a 8 horas de luz, dependendo da fonte luminosa utilizada.

Como a foto transformação 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 distribuída 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 subsequentes 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 a 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 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 *Matteucia 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-

bém para esporos de *Onoclea sensibilis* (IOWILL 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 nativa 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* 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 *Fteris vitata*, 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 flicocromo, mas parece causar uma promoção muito baixa da germinação. Isto poderia ocorrer devido ao fato de as paredes dos esporos absorverem grande parte da luz azul, diminuindo sua absorção pelo sistema de pigmentos em questão.

MARCONDES-FERREIRA e FELIPPE (1984), verificaram que esporos recém coletados de *Cyathea delgadii* germinaram a 15, 20, 25 e 30° C. A maior germinação ocorreu a 25° C. Os esporos armazenados por 7 meses somente germinaram a 20, 25 e 30° C. Esporos armazenados por 14 meses foram submetidos a temperaturas alternadas; nos pares testados (de 25-5° C a 25-45° C), 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.

Todas as temperaturas testadas durante a pré e pós-indução causaram inibição da germinação, para esporos que receberam tratamentos luminosos únicos. Quando se forneceu 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 *Onoelea 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 *Onoelea 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 termosensibilidade é diferente do de fotossensibilidade. Utilizando substâncias que atuam a nível de membranas celulares, sugeriu que o grau de hidratação e possíveis m

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 redijam 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. Esses autores sugerem que a cicloheximida aplicada durante a 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 *Sphaeroptervis 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 a fase respiratória sensível ; ao cianeto de potássio e inibe completamente a germinação, rt?

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 rapidamente. 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, 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 aelgadii* 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 conti-

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 luminoso 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 fotosensibilidade:

- 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-embebi-

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 alfaca c.v. *Granã Rapidsj* quando embebidas em água, no escuro, por vários dias (KHAN, 1980/81). Tratamento osmótico das sementes, na luz ou tratamento com ácido giberélico (GA³) 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 leucina¹⁴C. 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 fotodormência 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 convenientes.

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 concentrações, mostram um aumento linear do ψ_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 reduziu o tempo de germinação das sementes testadas. HEYDECKER e WAINWRIGHT (1976) trataram osmoticamente sementes de *Cyclamem 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 C¹⁴ em proteínas durante incubação

ção a 25° C. Foi observada também a ativação ou síntese de diversas enzimas, incluindo fosfatases ácidas e esterases. O-GA3 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 aelgadii* pré-embebidos em solução osmótica de PEG 6000 (-11,0 bars a 15° C), durante uma semana, sob luz contínua, apresentaram aceleração da germinação, do terceiro ao sexto 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). Sugeri ram 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 di clorofenil dimetil uréil) 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.* (1984, a), 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 pelo menos alguns esporos na amostra, talvez necessitem também de energia fornecida pela fosforilação fotossintética. 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 favorecer 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 encontrem em fase de metabolismo autotrófico.

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 filtragem 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* contém 56% de lipídios, dos quais 86% são triglicéridos. Os maiores componentes dos triglicéridos 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 encontradas 5,3 μ g de clorofila por mg de peso seco de esporos e após 14 dias, 27 μ g 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 detectadas 60 μ g 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 timidina³H e leucina³H, observou síntese de ácidos nucleicos e proteínas durante a germinação de esporos de *Anemia phyllitiâis*, induzida pelo ácido giberílico. 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 1 u.z. verde 1 ha, 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 leucina³H no núcleo e no citoplasma, durante as etapas iniciais da germinação. NAGATANI *et al.* (1983) observaram a incorporação de aminoácidos¹⁴C durante a germinação de esporos fotoinduzidos de *Adiantum capillus-veneris*. ZILBERSTEIN *et al.* (1984b) também observaram incorporação de metionina³⁵S 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 solúveis totais constituem 1,9% do peso seco do esporo seco de *Cyathea delgadii*. O conteúdo diminuiu após 7 dias de embebição para a germinação, indicando que houve consumo de parte desses açúcares durante essa fase. No 149 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 aumenta após 7 dias de embebição para a 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 fotoinduzida 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 capill-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 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 globular e corado pela eosinã. 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 NH_3^+ livres em sua molécula, ligando-se portanto a grupos aniônicos, destacando-se grupos fosfato ($-\text{PO}_4^{--}$), carboxila ($-\text{COO}^-$) e sulfato ($-\text{SO}_4^{--}$) (KIERNAN, 1981; VIDAL, 1977).

Soluções de azul de toluidina (AT) em água, na concentração de 10^{-7}M apresentam coloração azul claro com pico de absorção a 635 nm. O aumento da concentração para a 10^{-6}M provoca um abaixamento dos valores de absorbância, ocorrendo um hipocromismo. Um aumento subsequente da concentração de 10^{-5}M a 10^{-4}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 hipocrômico). 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. Isto possibilitou um maior empilhamento das moléculas do corante e conseqüente 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). O autor sugeriu que esse evento poderia estar associado à transferência de substâncias de célula a célula durante o processo de germinação.

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 *Ly copersicum 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 rizoides de gametófitos de *Cyathea delgadoides*, 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). Isto evidencia a ordem molecular dos polímeros formadores da estrutura.

Xylidine ponceau é um corante ácido cujas moléculas possuem o grupamento $-SO^{\ominus}$ 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 protoneimais, 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 integridade 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 delgad-Li.* 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 metilcelosolve 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 ef

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 μ m de espessura. Os corantes, hematoxi li na-eosina, azul de toluidina e xyloidine ponceau utilizados permitiram evidenciar núcleos; estruturas citoplasmáticas granulares globosas, corpos protéicos, grãos de amido e detecções de alterações do padrão de proteínas bem como a u mento 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 sintese de metabólitos durante a germinação. Paralelamente, foram feitos estudos citicosicos.

A germinação foi realizada em meio de cultura LTquida, 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-embecidos em vapor de água, utilizando-se diferentes fontes luminosas. Foi observada a resversão do efeito da luz vermelha pelo vermelho extremo. Efeito de luz azul foi estudado. Esporos foram pré-embecidos em solução osmótica de polietilenoglicol e seu efeito na germinação sob luz branca foi estudado. Efeito de DCMU tam -

bém 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 citológicos 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 39 dia de embebição e no 79 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-embebição em solução osmótica de polietilenglicol 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} Me 10^{-4} M, causou inibição da germinação.

O peso seco dos esporos diminui em quase 50% durante os 7 primeiros dias de-embebição. 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 delgaãit*. 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 xyloidine 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 pepsinó ou tripsina.

- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -

- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts .
Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*₃
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.*_s
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.*₃ *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 Physiology* **63**: 704-8, 1979.

CORTELAZZO, A.L. Proteínas cotilédones 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 Physiology* **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: Pte. ridofitas. In: Congresso Nacional de Botânica, 36., Curitiba, 1985. Curitiba, SBB, 1987. *Anais* (no prelo).

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

----- & ----- Germinação de esporos de *Trichipteris aorcovadensis*. *Cienc. Cult.*, São Paulo, 35 (7: supl.), 751, 19 83a.

----- & ----- Morfologia e germinação de esporos de *Trichipteris aorcovadensis*. 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* Längs e Fisch. In: Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, 4., Taubate, 1984. Taubaté, Universidade Municipal, 1 984 - *Programa e Resumos* p. 47.

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

----- & ----- Efeito da temperatura na germinação de esporos de *Polypodium latipes*. In: Congresso Anual da Sociedade Botânica de São Paulo, 5., Botucatu, 1985b. Botucatu, UNESP, 19 85 , p.106.

ESTEVEES, 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)..

-----₁ ----- & 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 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, H. Percent Pp⁺-dependent germination of spores in *Pteris vittata*. *Plant Cell Physiol.* 23 (7): 1213-7, 1982.

GEMMICH, 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* L.. *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 esters from lipids. *Lab. Prac.* **1**: 475-6, 1973.

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

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

-----, HIGGINS, J. & TIRNER, Y.J. Invigoration of seeds? *Seed Sci. Technol.* **5**: 881-8, 1975.

HUCKABY, C.S. & 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.* 3 47: 397-403, 1981b.

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

JARVIS, S.J. & WILKINS, M.B. Photo responses of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro. *J. Exp. Bot.* 3 24(83): 1149-57, 1973.

KHAN, A.A. Hormonal regulation of primary and secondary seed dormancy. *Isv. J. Bot.* 3 29: 207-24, 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*. Sao 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 mesurado.

----- & 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 SILVEIRA & OWENS, H.S. Determination of starch and amylose in vegetables. *Anal. Chem.* 22: 1156-8, 1950.

MICHEL, B.E. & KAUFMANN, M.R. The osmotic potential 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** (2): 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, 1 967.

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** (7): 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.

————— C_en 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. & FELIPPE, G.M. Efeito de temperatura, luz e reguladores de crescimento na germinação de *Stevia rebaudiana* Bert. *Cienc. Cult.* São Paulo, 33: 404-11, 1981.

----- & ----- 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 pre-
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. JFELIPPE, G.M. & VALIO, 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, salicylic acid, and temperature 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. Bui.*, 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 (5): 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.

-----s 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 (2): 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(7): 1 305-8, 1982.

TOMIZAWA, K., SUGAI, M. & MANABE, K. Relationship between germination and Pp⁺ level in spores of the fern *Lygodium japonicum*. *Plant Cell Physiol.* 24(6): 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(1): 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 cy cl ohexi mi de. *Plant Physiol.* 55: 803-8, 1975b.

- TRYON, R. The biogeography of species, with special reference to ferns. *Bot. Rev.* 52 (2): 117-156, 1986.
- VÂLIO, I.F.M. & JOLY, C.A. Light sensitivity of the seeds on the distribution of *Ceoropia glaziovi* Sneath (Moraceae). *Z. Pflanzenphysiol.* 91: 371-6, 1979.
- VIDAL, B.C. Dichroism in collagen bundles stained with xylidine ponceau 2R. *Ann. Ristochim.* 15: 289-96, 1970.
- Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macro-molecular 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 (8): 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.

ZI LB ERSTEIN, A., GRESSEL, J., ARZEE, T. & EDELMAN, M. Early morphogenetic changes during phytochrome-induced fern spore germination II. Transcriptional and translational events. *Z. Pflanzenphys-Lol.* **3** *114*: 109-22 , 1984b.