

DEGRADAÇÃO DO AMIDO NO MEGAGAMETÓFITO DE ARAUCARIA ANGUSTI-  
FOLIA (Bert). O ktze: Durante a Germinação e desenvolvimen-  
to inicial.

DOAÇÃO  
do Prof. Alfredo  
Gui Ferreira  
DEP. BOTÂNICA - BIBLIOTECA  
em 1991

Rosa Maris Rosado

Dissertação apresentada como um  
dos requisitos para obtenção do  
Grau de Bacharel em Botânica.

Curso de Bacharelado em Ciências  
Biológicas - ênfase Botânica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRAN  
DE DO SUL.

Orientador: Prof. ALFREDO GUI FERREIRA

Porto Alegre

1991/1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS  
Departamento de Botânica  
BIBLIOTECA

## SUMÁRIO

I - RESUMO .....	03
II - INTRODUÇÃO .....	04
III - MATERIAL E MÉTODOS .....	10
1 - OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS .....	10
2 - ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO INICIAL .....	11
3 - FIXAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	11
4 - INCLUSÃO EM PARAFINA .....	12
5 - MONTAGEM PARA MICRÓTOMO .....	13
6 - CORTES E MONTAGEM DE LÂMINAS .....	13
7 - COLOCAÇÃO DOS CORTES .....	14
8 - CONTAGEM DOS GRÃOS DE AMIDO .....	15
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	16
V - APÊNDICE .....	18
VI - CONCLUSÕES .....	25
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27

## I - RESUMO

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze, conhecida como pinheiro brasileiro, possui um grande diásporo, o pinhão, rico em reservas amiláceas. O amido existente no megagametófito de araucária é degradado e mobilizado para o crescimento do embrião, na germinação. Os pinhões coletados foram cultivados em dois tratamentos: na luz e no escuro. Os dados obtidos a partir de cortes histológicos do megagametófito de araucária em 5 estágios do seu desenvolvimento inicial (com 3 repetições) foram analisados. A análise dos dados proporcionou uma maior compreensão de como se dá a degradação do amido nesta planta.

## II - INTRODUÇÃO

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze, conhecida como pinheiro brasileiro ou pinheiro do Paraná, é de grande importância no Sul do Brasil, onde encontra-se predominando na fisionomia do planalto (ROMARIZ, 1972). Pela excelente qualidade de sua madeira (TORTORELLI, 1967), apresenta-se hoje com poucos exemplares, fora os protegidos em parques e reservas nacionais, como as do Espigão Alto, Aracuri, Aparados da Serra e outros.

Existem trabalhos apontando os perigos da extinção desta espécie, devido a exploração sem controle dos pinheirais (MIRANDA & BASTOS, 1961; MAGNANINI, 1971) e pelo seu crescimento lento nos primeiros anos, o que a exclue das espécies usadas em reflorestamento, por necessitar de muita luz (BACKES, 1973) e solos profundos e férteis (PENTEADO & CASTRO, 1959). Aparentemente o maior crescimento da Araucaria angustifolia se dá em temperaturas mais baixas e insolação menor, embora, seja uma planta heliófila (FERREIRA & IRGANG, 1979), mas não pioneira (SOARES, 1980).

Alguns estudos básicos sobre araucária já foram realizados: quanto a cariologia (DAINTY, 1983. CARDEMIL & VARNER, 1984), anatomia da semente e da plântula (MONTEIRO et al., 1977; FERREIRA, 1979), germinação e desenvolvimento inicial (FERREIRA & HANDRO, 1979. AQUILA, 1981; FERREIRA & FRANCO, 1987). Alguns aspectos bioquímicos já foram estudados (RIOS & VOSS, 1973; FERREIRA, 1979; ROSA, 1986), porém há muito ainda a ser feito.

O pinheiro do Paraná apresenta um diásporo de grande tamanho, o pinhão, rico em reservas amiláceas que constitui em alimento para fauna (REITZ & KLEIN, 1966) e inclusive para o próprio homem (MOTA & CRAMER, 1953). A semente da araucária é envolta por uma bráctea e uma escama ovulífera soldadas, que formam um envoltório de cor castanha, a testa. Este envoltório é constituído por três camadas: a primeira de fibras longitudinais, a mediana de fibras transversais e a mais interna também de fibras longitudinais (MATTOS, 1972).

A testa da semente restringe o crescimento do embrião tanto usando papel como substrato, quanto usando solo (AQUILA & FERREIRA, 1984).

O embrião de A. angustifolia é embebido na parte central do megagametófilo, não havendo conexão anatômica entre os dois tecidos (FERREIRA, 1981). O megagametófito

desta espécie de gimnosperma tem dupla função: a de carregar os gametas e a de alimentar o embrião (SINGH & JOHRI, 1972).

A semente geralmente encontra-se com baixo metabolismo, o qual é ativado por influência de fatores ambientais (KOLLER, 19872; MAYER & SHAW, 1974) e consiste numa ativação físico-química do metabolismo com uma expressão morfológica posterior (LEOPOLD & KRIEDMAN, 1975). A primeira etapa do processo germinativo é a embebição, a qual é seguida da ativação do sistema enzimático com início da mobilização das reservas (BIDWEL, 1974). Esta mobilização leva à síntese de matéria e crescimento do embrião ocorrendo, assim, a emergência da radícula e finalmente o desenvolvimento da plântula (KOSLOWSKI, 1971; STREET & COCKBURN, 1972). A ativação do metabolismo consiste essencialmente na mobilização de enzimas pré-existentes na semente e síntese de novas enzimas (LEOPOLD & KRIEDMANN, 1975).

Ocorre uma reversão nos processos metabólicos dos tecidos de reserva: células que inicialmente sintetizavam amido, proteínas e lipídios, durante o desenvolvimento da semente, repentinamente iniciam a hidrólise destas matérias (KRAMER & KOSLOWSKI, 1979). BEWLEY & BLACK, (1978) separam as mudanças metabólicas associadas à mobilização de reservas em 2 grupos: 1) mobilização das reservas do embrião e 2) utilização das reservas do megagametófito.

Entre os trabalhos sobre mobilização de reservas em

gimnospermas, podemos citar os de HATTORI & SHIROYA (1951), com Pinus thumbergii; CHING (1966) com Pseudotsuga menziesii; KAO (1973) com Pinus taiwanensis e Cunninghamia lanceolata; LAIZ & SANZ-MUNERO (1974) com Pinus pinea; CARDEMIL & REINERO (1982) e CARDEMIL & VARNER (1984) com Araucaria araucana; DODD et al. (1989) com Podocarpus henkelii.

O gênero Araucária é um dos poucos, dentro das gimnospermas, que possui amido como reserva na semente (SIMOLA, 1976).

Os grãos de amido são, exceto nos primeiros estágios de formação, esferocristais. Podem ser redondos, ovais ou em forma de sino, mediando em torno de 10-40 um. A birrefringência dos grãos de amido está indicada por sua estrutura cristalina. A observação dos grãos de amido ao microscópio, sob luz polarizada, revelou a presença de uma cruz de polarização, e sob luz normal a presença de um hilo central (BADENHUIZEN, 1958; SEIDEMANN, 1966; CZAJA, 1969).

O amido é formado por cadeias ramificadas de amilopectina e por cadeias não ramificadas de amilose. Amilopectina e amilose são as unidades estruturais <sup>molecular do</sup> ~~do~~ grão de amido, que podem ser agrupados de acordo com a espécie (ou táxon) a qual se deu a origem (WHISTER & COLBERT, 1957). CZAJA (1978) descreveu 14 tipos diferentes de grãos de amido que ocorrem em divisões, classes, ordens ou famílias diferentes.

Foi analisada a composição química do amido existente nas sementes de araucária. <sup>Foi constatado</sup> ~~Constatou-se~~ que a fração linear de amilase consiste em 41% no amido de A angustifolia isto é muito quanto comparado com amido de milho, trigo e outros cereais. <sup>(Bobbio, 1978). O mesmo autor (1978) observou</sup> ~~Observou-se também~~ que a redução do amido a açúcar por ação enzimática se dá muito lentamente, ou seja, o amido existente na araucária apresenta-se menos suscetível à degradação. ~~(BOBBIO, 1978)~~.

O modelo viscoamilógrafo do pinhão obtido em viscoamilógrafo de Brandender, não é comum aos de outras fontes como cereais ou tubérculos. O gel obtido é altamente resistente ao aquecimento e a desintegração mecânica (CEREDA & WOSIACKI, 1985).

CARDEMIL & VARNER (1982) apontaram a sacarose como principal açúcar no megagametófito de araucária produzido pela degradação do amido e movido para regiões de crescimento do embrião. Em outro trabalho dos mesmos autores (1984), verificaram a presença de uma enzima invertase na periferia dos cotilédones. Após ROSA (1986) verificou a presença de glicose, acompanhada de frutose no megagametófito de A angustifolia sugerindo que a sacarose existente, a partir da ação da invertase, seria hidrolisada a seus açúcares componentes que ao passarem para o interior dos cotilédones resintetizariam.

A atividade das amilases no início do desenvolvimen-



to é baixa (FERREIRA et al., 1979), sendo as fosforilases as principais enzimas de degradação inicial do amido (CARDEMIL & VARNER, 1984).

Na semente quiescente não há atividade enzimática detectável, tanto no megagametófito, quanto no embrião (CARDEMIL & SALAS, 1986). Verificou-se que, em A. araucana, após 40 horas de iniciada a embebição é degradado 84% do amido existente no megagametófito. Das 40 horas às 90 horas é degradado mais 25% e a partir daí não muda marcadamente (CARDEMIL & SALAS, 1986).

#### OBJETIVOS

Ao realizar este trabalho pretendeu-se atingir os seguintes objetivos:

- 1) Interpretar como se dá a degradação do material de reserva (amido) do pinhão; ao longo do desenvolvimento inicial da plântula;
- 2) Relacionar a localização da reserva no megagametófito com a velocidade de sua degradação.
- 3) Analisar a influência da luz no processo de degradação das reservas amiláceas existentes no megagametófito de A. angustifolia.
- 4) Contribuir para o conhecimento da biologia de uma espécie tão ameaçada de extinção.

### III - MATERIAL E MÉTODOS

#### 1 - OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS:

As sementes de A. angustifolia, coletadas na Região de São Francisco de Paula - RS, no laboratório, foram desinfectadas com hipoclorito de sódio a 20% do comercial (1% de cloro) e posteriormente lavadas com água destilada. Após feita a escarificação mecânica, removendo a porção proximal do tegumento das sementes (FERREIRA, 1977), foram postas a germinar em caixas plásticas (10 X 10 cm) sobre papel filtro umidecido com água destilada. As caixas plásticas foram mantidas na estufa em um fotoperíodo de 16 horas luz e temperatura de aproximadamente 25°C.

A medida que germinavam as sementes eram transferidas para potes contendo vermiculita, para que continuassem a se desenvolver. A partir do estágio de emergência da radícula dividiu-se em dois tratamentos: no claro, no mesmo fotoperíodo, e no escuro (FERREIRA, 1977). Alcançando as plântulas os estágios desejados, partiu-se, então, para

fixação das amostras.

## 2 - ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO INICIAL:

Os estágios de desenvolvimento inicial analisados neste trabalho foram, arbitrariamente, divididos em 5 classes (fig. 01):

- I - Estágio Quiescente; pinhão não embebido.
- II - Emergência da Radícula; radícula emergindo de 1 a 1,5 cm para fora do megagametófito.
- III - Estágio de Emergência da Parte Aérea; aparecimento da parte aérea entre os cotilédones, tendo a radícula cerca de 5 cm de comprimento.
- IV - Estágio da plântula com aproximadamente 25 folhas; folhas abertas, contadas a partir da base, excetuando-se o feixe de folhas do ápice.
- V - Estágio da plântula com aproximadamente 50 folhas; folhas abertas, contadas a partir da base, excetuando-se o feixe de folhas do ápice.

## 3 - FIXAÇÃO DAS AMOSTRAS

Procedeu-se o corte da porção mediana do pinhão para obtenção da peça 1 cm, observando a região proximal e distal da mesma (conforme fig. 2). O embrião foi mantido no interior da cavidade na região proximal da semente, a fim de

marcar a orientação da peça na montagem.

As peças (amostras) foram fixadas em F.A.A. 50% (JOHANSEN, 1940) e após 48 horas transferidas para álcool 50%. Foram tomadas 3 amostras de cada estágio do desenvolvimento inicial.

#### 4 - INCLUSÃO EM PARAFINA

Desta etapa em diante realizou-se o trabalho no Laboratório de Anatomia Vegetal (Deptº de Botânica - UFRGS). Para a inclusão foi utilizado o Processador Automático de Tecidos (HISTOTÉCNICO Nº 25). No aparelho a amostra percorreu os seguintes passos:

Série alcoólica (desidratação):

Álcool 70% por 2 horas;

Álcool 80% por 2 horas;

Álcool 90% por 2 horas;

Álcool 100%, por 2 horas;

Depois:

Álcool 100% + Xilol Prop. 2:1, por 2 horas;

Álcool 100% + Xilol Propano 1:1, por 2 horas;

Álcool 100% + Xilol Propano 1:2, por 2 horas;

Xilol, por 2 horas;

Xilol + Parafina, por 2 horas;

Parafina 1, por 3 horas;

Parafina 2, por 3 horas;

Parafina 3, por 3 horas.

Perfazendo um período aproximado de 25 horas no processador, as amostras estavam prontas para serem emblocadas.

#### 5 - MONTAGEM PARA MICRÓTOMO:

As amostras, retiradas do processador foram colocadas sobre placa aquecedora em placa de Petri, contendo parafina derretida. Em caixinha de papel previamente confeccionada e identificada com nome e número da amostra a ser emblocada, colocou-se um pouco de parafina. Aguardou-se um endurecimento parcial, colocou-se a peça orientando-a adequadamente, com agulha histológica aquecida. Completou-se o conteúdo da caixinha com parafina e aguardou-se a total solidificação do bloco. Os blocos foram guardados na geladeira até o corte (SASS, 1951).

#### 6 - CORTES E MONTAGEM DE LÂMINAS:

Executaram-se os cortes em micrótomo rotatório, ajustado para 15  $\mu$ m de espessura formando fitas de cortes. As fitas foram colocadas sobre lâminas bem limpas, ~~as lâminas~~ as quais previamente tinham sido untadas com gotas de adesivo Haupt. As fitas aderidas às lâminas foram destendidas com gotas de formalina a 4%, em placa aquecedora.

Depois destendidos, 4 cortes por lâmina (da mesma peça), foram levados a estufa a 36°C por 48 horas.

## 7- COLORAÇÃO DOS CORTES

Empregou-se, para coloração das lâminas, a técnica descrita por JOHANSEN (1940), que tem como corantes safranina hidroalcolica e "fastgreen" diluído em óleo de cravo. Esta técnica empregada produz cor verde no citoplasma e na membrana celular e cor amarronzada nos cloroplastos e células secretoras.

Passos da técnica utilizada:

- Xilol por 30 minutos
- Xilol + Álcool 100% \*
- Álcool 92% \*
- Álcool 80% \*
- Álcool 70% \*
- Álcool 60% \*
- Álcool 50% \*
- Álcool 30% \*
- Água corrente, algumas lavagens
- Água destilada, algumas lavagens
- Solução de Ácido Crômico, por 6 horas
- Água corrente, exaustivamente
- Água destilada, algumas lavagens
- Álcool 92% acidificado \*
- "Fastgreen" de 5 a 10 seg.
- Isopropanol 1 \*

- Isopropanol 2 \*

(\*) Indica passagens rápidas por estas soluções.

Após a coloração dos cortes, montou-se com lâminulas usando bálsamo do Canadá. Seguiu-se então para análise das lâminas feitas ao microscópio.

#### 8 - CONTAGEM DOS GRÃOS DE AMIDO:

Sob luz polarizada no microscópio JENA-ZEISS, no aumento 25X10, procedeu-se a contagem dos grãos de amido, que se situavam sobre uma transecta imaginária traçada, na direção 6 - 12 horas. Coincidente ao diâmetro do campo, a transecta era perpendicular ao eixo do embrião.

Foram realizadas 72 contagens (72 transectas) por tratamento, provenientes de 4 cortes em 3 lâminas de diferentes sementes. Os campos de contagem foram obtidos aleatoriamente, a partir da quarta célula interna e terceira célula externa. Foram feitas 4 contagens por corte, 2 transectas em 2 campos da porção interna do megagametófito e 2 transectas em 2 campos da porção externa do megagametófito.

A análise estatística dos dados foi feita usando teste ANOVA, seguido de Fisher's LSD, com nível de probabilidade de 50% ( $\alpha = 0,05$ ).

#### IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conteúdo do megagametófito de Araucaria angustifolia é totalmente preenchido por grãos de amido na semente quiescente. Na semente quiescente não há atividade enzimática detectável (CARDEMIL & VARNER, 1984). Observou-se que após a germinação ocorre um pico de atividade enzimática na semente, caracterizado por uma alta taxa de degradação de amido (FERREIRA et al. 1979; B. DAVIS & A. G. FERREIRA, em comunicação pessoal). Constatou-se uma brusca queda no número médio de grãos de amido contados entre o estágio da semente quiescente e o de emergência da radícula (ver na tabela). As reservas amiláceas são degradadas e direcionadas para o crescimento do embrião, na germinação (FERREIRA, 1979). Na plântula com aproximadamente 50 folhas, as células do megagametófito encontram-se praticamente sem amido (fig. 04).

As plântulas cultivadas no escuro mobilizam as reservas mais lentamente do que as cultivadas na luz, como é



mostrado na figura 3. A explicação para este fato é que no escuro a plântula fica estiolada, mais tenra, ou seja, com menos tecido de resistência. Enquanto nas plântulas cultivadas na luz, nas quais as células tem paredes espessadas, utilizam nas condições apontadas pelo menos parte do material de reserva do megagametófito.

Na maioria dos estágios não houve diferença significativa entre as médias obtidas para as regiões proximal e distal do megagametófito, como também não houve diferença entre as atividades enzimáticas destas regiões (B. DAVIS, em comunicação pessoal). Quanto as porções interna e externa do megagametófito, nas amostras do estágio de emergência da parte aérea na luz, houve separação dos dados. Por isto os dados de grãos de amido da porção interna (tanto da região distal quanto da região proximal) foram analisados contra os dados obtidos da porção externa. Obtendo-se, então, uma média de grãos de amido para a porção interna (19,37 + ou - 5,46) e uma para porção externa (21,49 + ou - 5,17). Verificou-se que há na porção interna um consumo mais rápido do que há na porção externa, talvez pela proximidade do embrião.

V - APÊNDICE

Universidade Federal do R. G. S.  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
Departamento de Botânica  
BIBLIOTECA

Universidade Federal do R. G. S.  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
Departamento de Botânica  
BIBLIOTECA

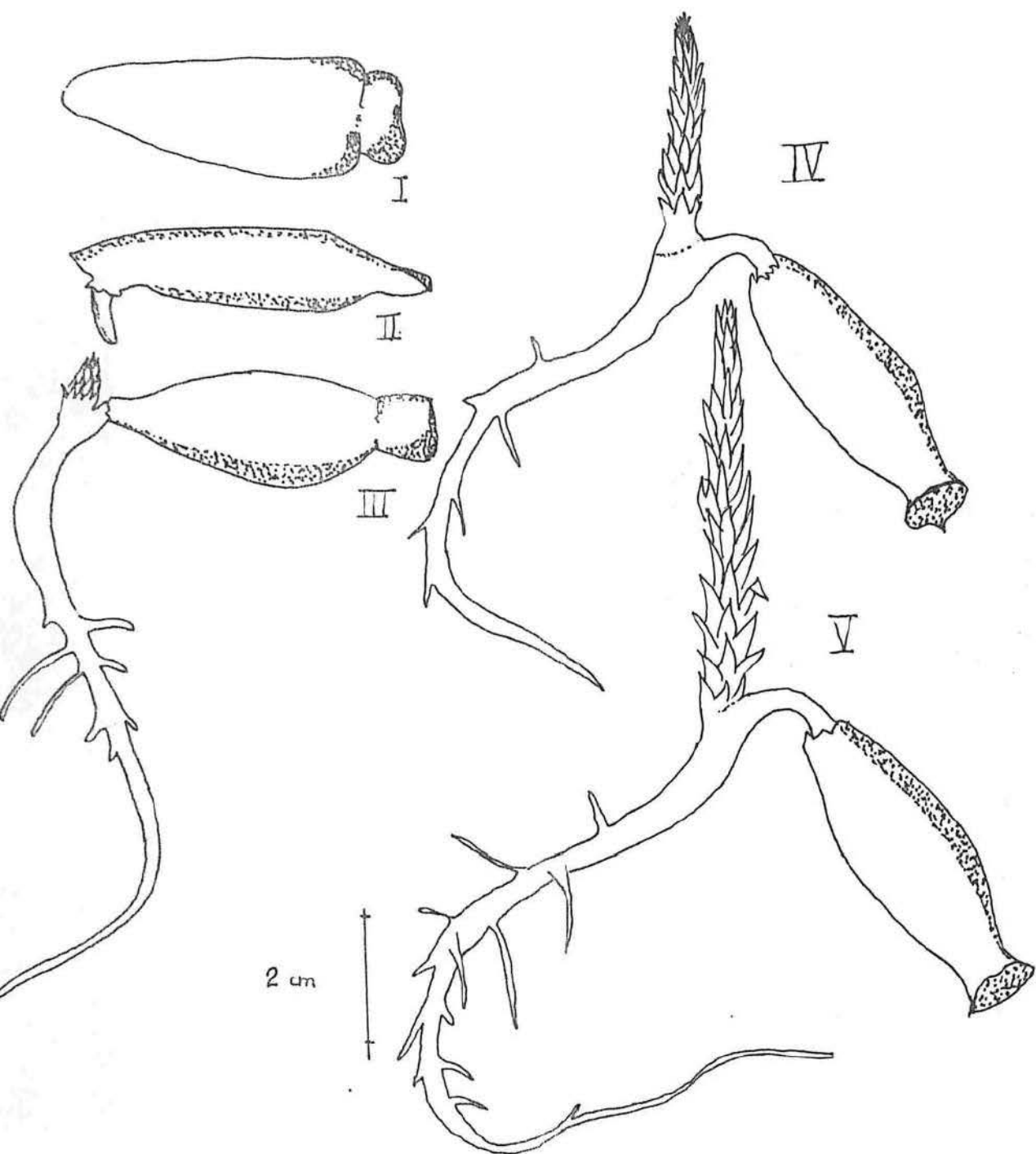


Fig. 1 - Estágios do desenvolvimento inicial de Araucaria angustifolia:

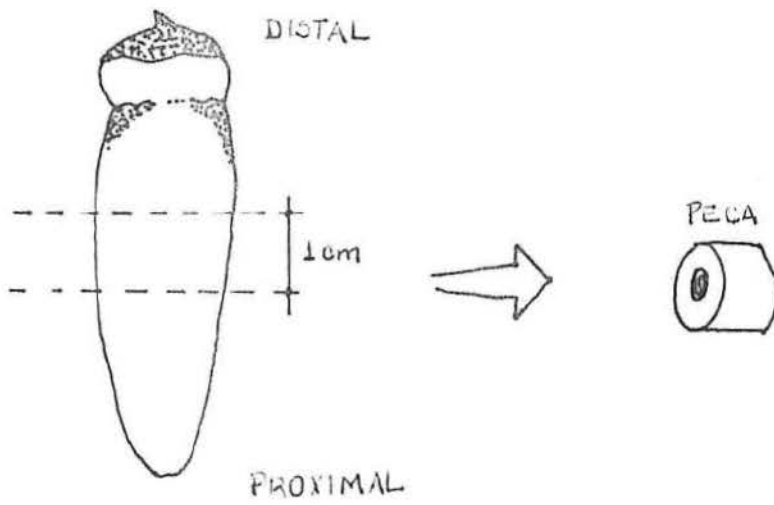
I - QUIESCENTE;

II - EMERGÊNCIA DA RADÍCULA;

III - EMERGÊNCIA DA PARTE AÉREA;

IV - PLÂNTULA COM APROX. 25 FOLHAS;

V - PLÂNTULA COM APROX. 50 FOLHAS.



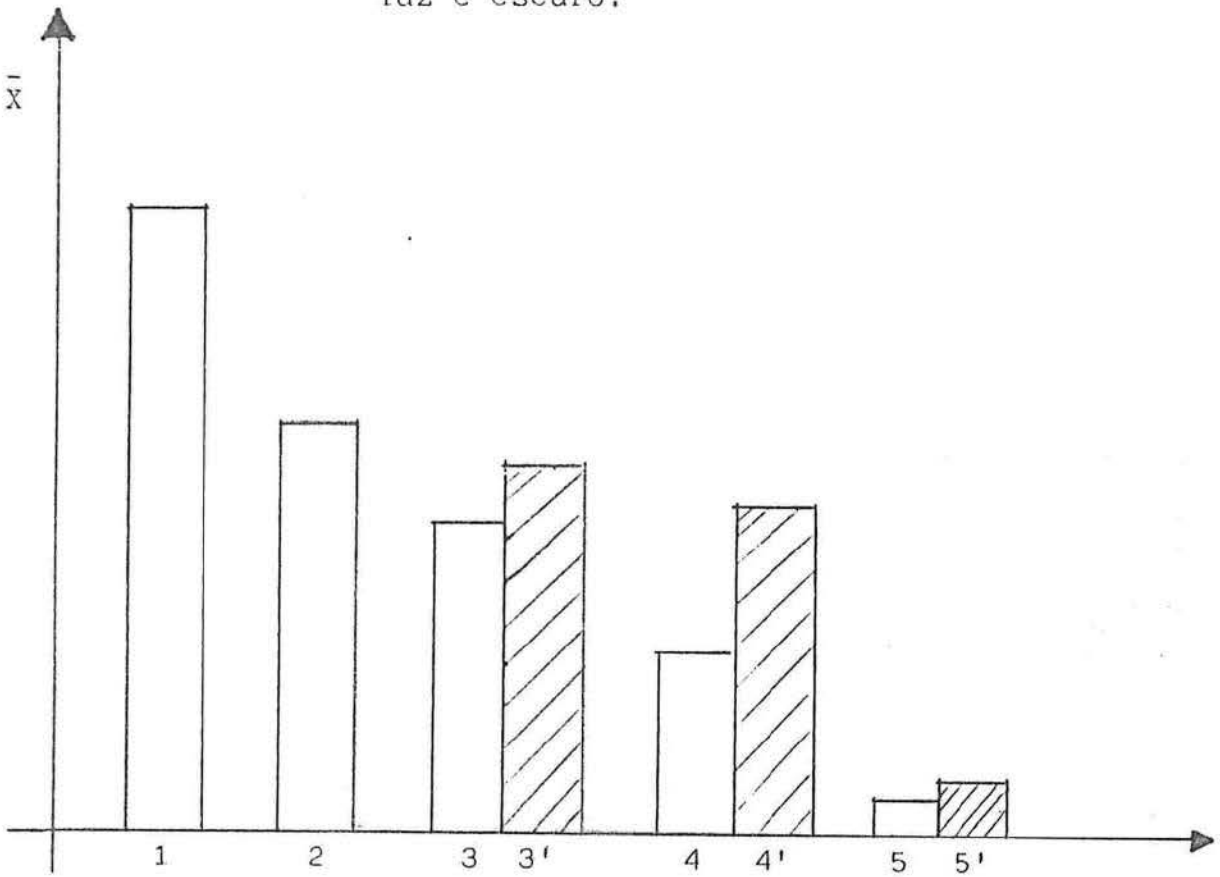
ig. 2 - ORIENTAÇÃO DA PEÇA NA AMOSTRA

TABELA 1 - Médias (e Desvios Padrão) do nº de grãos de amido por transecta em cada posição e estágio de desenvolvimento (n = 72):

POSIÇÃO	ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO INICIAL							
	QUIESCENTE	EM, RADÍCULA	PARTE AÉREA		≅ 25 FLS.		≅ 50 FLS.	
			LUZ	ESCURO	LUZ	ESCURO	LUZ	ESCURO
PROXIMAL INTERNO	41,54 (±6,46) * ab	26,46 (±5,35) * a	19,72 (±6,00) * ab	25,31 (±5,08) * b	11,83 (±4,38) * a	23,04 (±3,24) * b	3,04 (±2,88) * b	3,75 (±2,90) * b
PROXIMAL EXTERNO	40,74 (±5,53) * a	27,40 (±6,85) * a	21,93 (±4,62) * c	23,01 (±5,57) * a	12,33 (±4,47) * a	21,71 (±3,48) * a	1,93 (±2,20) * a	2,74 (±2,44) * a
DISTAL INTERNO	43,53 (±6,16) * b	27,38 (±3,91) * a	19,01 (±4,89) * a	23,32 (±4,70) * a	11,86 (±3,74) * a	22,07 (±4,13) * ab	2,63 (±2,88) * ab	3,29 (±2,71) * ab
DISTAL EXTERNO	41,13 (±7,07) * a	26,97 (±5,28) * a	21,04 (±5,66) * bc	21,83 (±6,06) * a	12,10 (±3,78) * a	22,11 (±4,37) * ab	2,19 (±2,52) * ab	2,88 (±2,67) * a
$\bar{X}$	41,74	27,05	20,43	23,37	12,03	22,23	2,45	3,17

\* - Análise de comparações múltiplas de Fischer's LSD no dados de cada coluna, usando um nível de probabilidade de 50% ( $\alpha = 0,05$ ).

Fig. 3 - Média de grãos de amido por estágios de desenvolvimento inicial e tratamento luz e escuro.



- 1 - Quiescente;
- 2 - Emergência da radícula;
- 3 - Emergência da parte aérea;
- 4 - Plântula com aproximadamente 25 folhas;
- 5 - Plântula com aproximadamente 50 folhas.

A área achuriada do gráfico representa o tratamento da amostra no escuro.

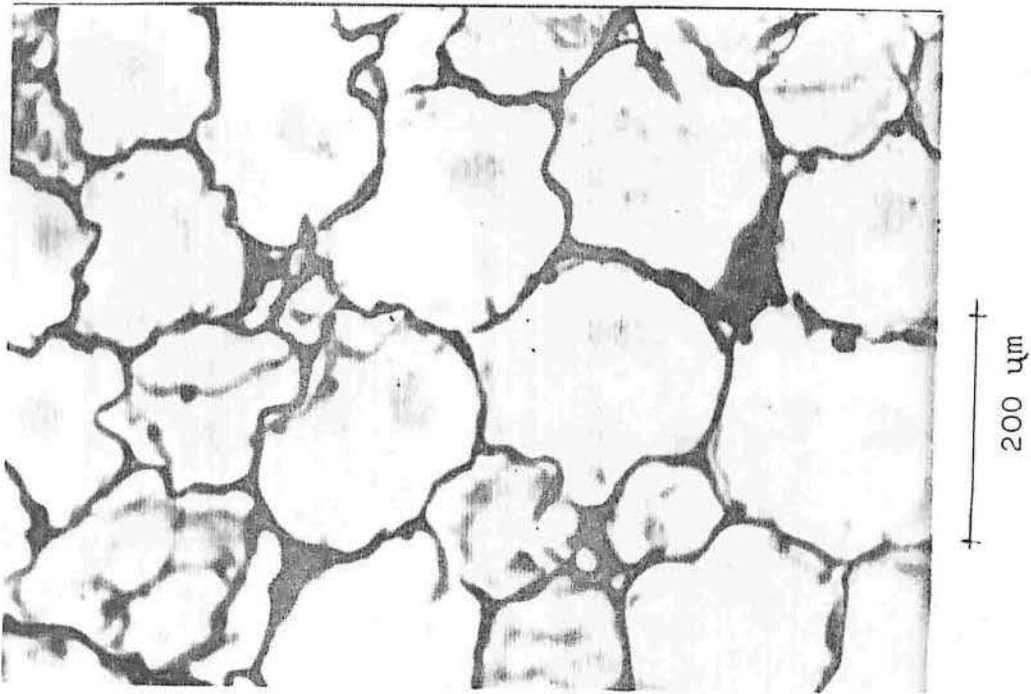


Fig. 4

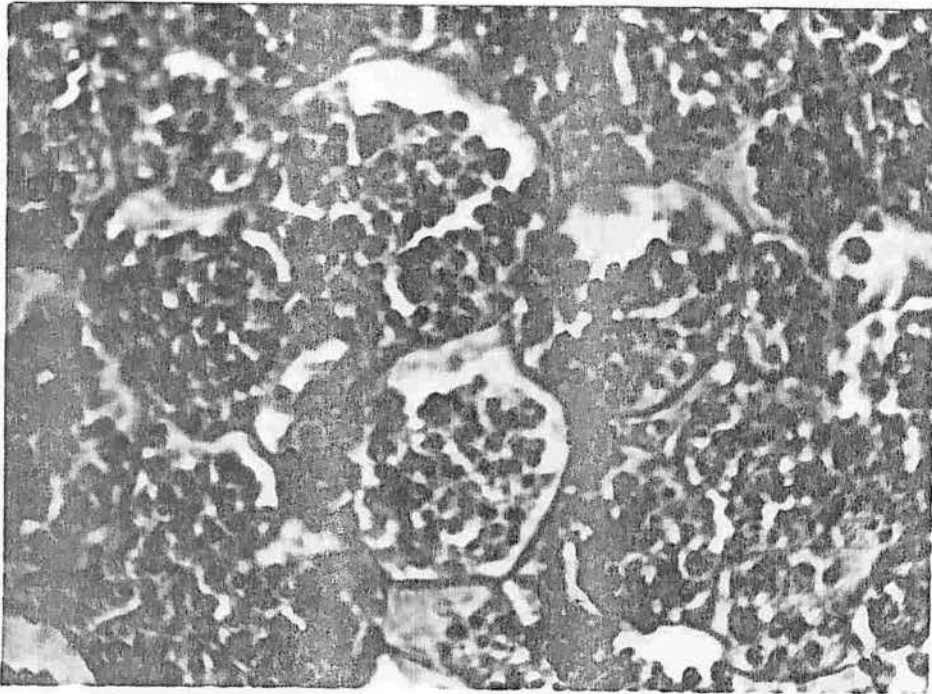


Fig. 5

Fig. 4 e 5 - Araucaria angustifolia; Corte transversal do megagametófito:

4 - Semente quiescente;

5 - Plântula com aproximadamente 50 folhas

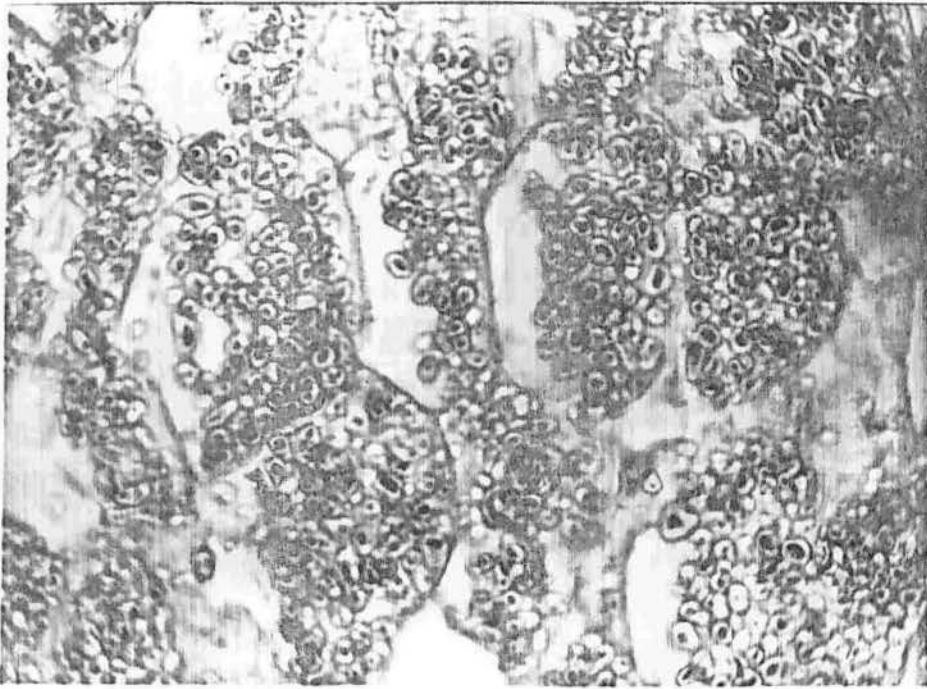


Fig. 6

100  $\mu\text{m}$

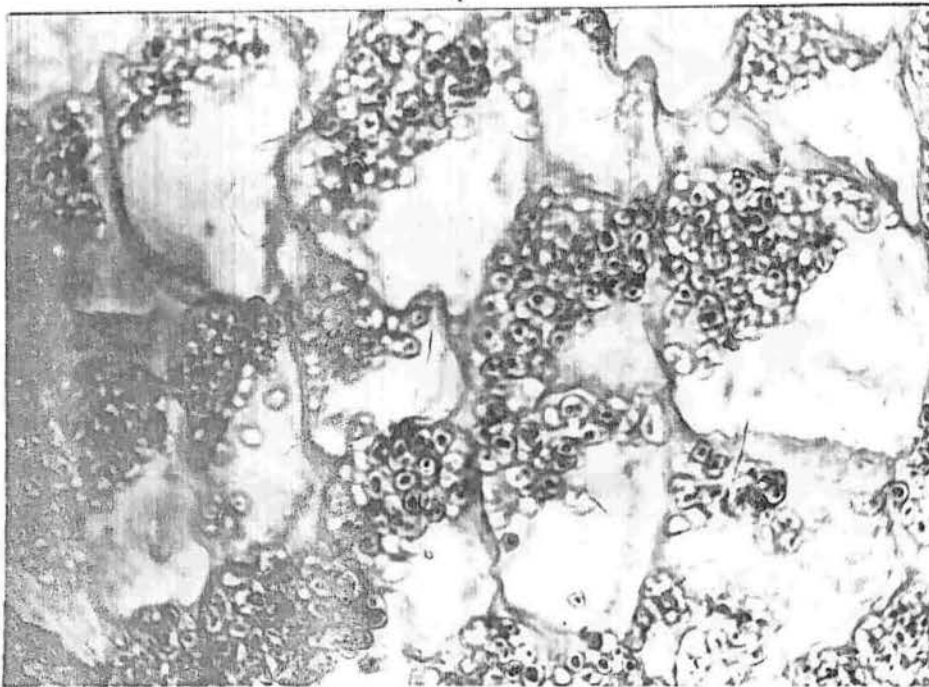


Fig. 7

200  $\mu\text{m}$

Fig. 6 e 7 - Araucária angustifolia; Corte transversal do megagametófito de amostras no estágio de emergência da parte aérea:

- 6 - Porção externa;
- 7 - Porção interna.



## VI - CONCLUSÕES

- Na semente quiescente as células do megagametófito de Araucaria angustifolia, encontra-se totalmente preenchidas por grãos de amido.

- No estágio de emergência da radícula ocorre uma queda brusca no nº médio de grãos de amido (contados por transecta) nas células do megagametófito.

- Na plântula com aproximadamente 50 folhas, as células do megagametófito encontra-se praticamente sem amido.

- Não há diferença significativa entre o número médio de grãos de amido contados na região proximal e na região distal do megagametófito de Araucaria angustifolia.

- Nas plântulas cultivadas no escuro há um retarda-

mento na degradação das reservas amiláceas do megagametófito, quando comparados as cultivadas na luz.

- Na porção interna do megagametófito a degradação do amido se dá mais rapidamente que na porção externa.

## VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ALAIZ, E.P. e SANZ, M. 1974. An investigation on freeoses and holosides in Pinus pinea seed. Main changes occurring in seeds during cold stratification and germination. Italian J. Biochem; 23(1): 1-11.
- 2 - AQUILA, M.E.A., 1981. Estudo do comportamento germinativo de A. angustifolia (Bert.) O. Ktze em 2 tipos de solos (Mestrado - Tese) Dept<sup>o</sup> Botânica UFRGS - POA.
- 3 - \_\_\_\_\_ e FERREIRA, A.G. 1984. Germinação de sementes escarificadas de Araucaria angustifolia em solo. Ciência e Cultura, 36(9): 1583-1590.
- 4 - BACKES, A. 1973. Contribuição ao conhecimento da mata de Araucária. Tese (Dout. Bot.) Dept<sup>o</sup> de Botânica - USP.
- 5 - BADENHUINZEN, N. P. 1958. Structure Properties and growth of starch granules in Ruhland Enciclopedia of Plant Physiology, 6:137-153, Springer-Verlag, Berlin.
- 6 - BEWLEY, Y. D e BLACK, M. 1978. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination, vol. 1, 306, Springer-Verlag Berlin.
- 7 - BIDWELL, R. G. 1974. Plant Physiology. Macmillan Pub.,

New York.

- 8 - BOBBIO, F. O. <sup>et al.</sup> 1978. Starch from seeds of A. angustifolia (Bert.) O. Ktze An. Acad. Brasil. Cienc, 50:249-253.
- 9 - CARDEMIL, L. e REINERO, A., 1982. Changes of A. araucana seed reserves during germination and early seedling growth Con. Jorn-Bot, 60(9) : 1629-1638.
- 10 - \_\_\_\_\_. e VARNER, J. E., 1982. Phosphorylase activity and sucrose translocation during germination and early seedling growth of the pinon seed of Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze Plant Physiology, 64 : 4.
- 11 - \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_, 1984. Starch degradation metabolism toward sucrose synthesis in germinating A. araucaria seeds. Plant Physiol, 76 : 1054-1067.
- 12 - CEREDA, M. P. e WOSIACKI, G., 1985. Characterization of Pinhão starch. Part II Rheological Properties of the Postes. Stärke, 37 : 404-407.
- 13 - CHING, T. M., 1966. Compositional changes of douglas fir seeds during germination Plant Physiol, 41 : 1313-1319.
- 14 - CZAJA, A. T., 1969. The of microscopy of starch granules. Botanisches Institut der Technischer Hochschule Aachen - Berlin.
- 15 - \_\_\_\_\_., 1978. Structure of Starch grains and the classification of vascular plant families. Botanical Institut RWTH Aachen Taxon, 27 : 463-470.
- 16 - DAINTY, A. L., 1983. Chromosome number and Karyotype

- variation in Araucária, Ken Bull., 37(4) : 511-514.
- 17 - DODD, M. C; VAN STADEM, J. e SMITH, M. T., 1989 Seed germination in Podocarpus henkellii and ultrastructural and Biochemical Study An. Compo, 64.
- 18 - FERREIRA, A. G., 1977. A. angustifolia (Bert.) O Ktze. : Germinação da semente e desenvolvimento da plântula, Tese Dout Cienc., Deptº de Botânica, USP - SP.
- 19 - \_\_\_\_\_. e IRGANG, B. E., 1979. Regeneração Natural de A. angustifolia nos Aparados da Serra, RS. An. Soc. Bot. Brasil. 30 : 225-230.
- 20 - \_\_\_\_\_.; DETRICH, S.M. e HANDRO, W., 1979. Changes in the metabolism of A. angustifolia during the early phases of germination and growth Rev. Bras. Bot. 2 : 67-71.
- 21 - \_\_\_\_\_ e HANDRO, W., 1979. Aspects of seed germination In A. angustifolia (But).
- 22 - \_\_\_\_\_ e FRANCO, E. T. H., 1987. Germination and early development of A. angustifolia. Acta for. Bras., 2 : 32-46.
- 23 - HATTOR, S. e SHIROYA, T., 1951. The sugars in the seeds and seedling of Pinus, Thumbergii; Arch Biochem Bioph, 34 : 121-134.
- 24 - JOHANSEN, D. A., 1940. Plant microtechnique. Iowa State University Press, Iowa, U.S.A.
- 25 - KOLLER, D., 1972. Enviromental control of seed germination In: T. T. Kozlowski. Seed Biology. vol II, Academic Press, New york.
- 26 - KOZLOWSKI, T. T., 1971. Growth and Development of trees

Vol I, Academic Press, New York.

- 27 - KRAMER, P. J. e KOZLOWSKI, T. T., 1975. Physiology of woody plants. New York, Academic Press, 881 p.
- 28 - LEOPOLD, A. C. e KRIEDMANN, P. E., 1975. Plant Growth and development. Mac-Graw Hill, New Dehli.
- 29 - MAGNANINI, M.. 1971. O Pinheiro brasileiro, Ecologia. Rev. Florestal, 3 : 1.
- 30 - MATTOS, Y. R., 1972. O Pinheiro brasileiro. Ed. São Paulo, 636 p.
- 31 - MAYER, K. H. e MENKI, R-1953. Reserches du grain d'amidon, Helv, Chien Acta. 36 : 702-708.
- 32 - MIRANDA, B. 1961. O drama da floresta de pinheiro brasileiro, An Brasil. Econ. Florestal, 13 : 69-80.
- 33 - MONTEIRO, S. M.; FERREIRA, A. G.; FLORES F.E., 1977. Anatomia da plântula de A. angustifolia (Bert.) O. Ktze In. Congresso Nacional de Botânica, Trabalhos, p. 393-399.
- 34 - MOTA, S. e CRAMER, E., 1953. O valor nutritivo do pinhão. Eng. e Quim., 5 : 19.
- 35 - PENTEADO DE CASTRO, G., 1959. Variação do tamanho das sementes de A. angustifolia (Bert.) O. Ktze, An. Brasil Econ. Florestal, 11 : 124-133.
- 36 - REITZ, R. e KLEIN, R. M., 1966. Araucariáceas In : R. Reitz Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí - SC.
- 37 - RIOS, J. W. e VOSS, D. O., 1973. Estudo dos citocromos e da oxidação fosforilativa das sementes de pinheiro, Arq. Bio. Tecnol., 16 : 112-127.
- 38 - ROMARIZ, D. A., 1972. A vegetação In : A. de Azevedo.

Brasil Terra e o homem. Vol. I, Cia Ed. Nac., SP.

- 39 - ROSA, L. M. G., 1986. Translocação de açúcares e aminoácido do megagametófito ao embrião em A. angustifolia: Durante a germinação e o desenvolvimento inicial. Tese de Mestrado. Deptº de Botânica - UFRGS-RS.
- 40 - SASS, J. E., 1951. Botanical microtechnique. Iowa State College, Press, Iowa, U.S.A.
- 41 - SEIDEMANN, J., 1966. Stärke : Atlas, Paul Parey Press, Berlin.
- 42 - SIMOLA, L. K., 1976. Changes in the subcelular organization of endosperm and radicle cells of Picea abies during germination, Pflanzen physiol., 78 : 41-45.
- 43 - SINGH, H e JOHRI, B. M., 1972. Development of gymnosperm seeds In: Kozlowski, T. Seed biology, Academic Press, New York 21-76.
- 44 - SOARES, R. V., 1980. Considerações sobre regeneração natural de A. angustifolia In. Forestry problems of genus Araucaria: 173 Infro Meeting, Curitiba - PR.
- 45 - STREET, H. E. e COCKBURN, W., 1972. Plant metabolism 2ª ed. Oxford, Pergamon Press, 321 p.
- 46 - TORTORELLI, L. A., 1967. O Brasil ante a um mundo deficitário de madeiras e produtos florestais, Silv. São Paulo, 6 : 63-106.
- 47 - WHISTLES, R. L. e CORBETT, W. M., 1957. In : W. Pigman. The Carbohydrates, Academic Press, New York.