



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ECOFISIOLOGIA DA GERMINAÇÃO E DO METABOLISMO
RESPIRATÓRIO DE QUATRO ESPÉCIES DO GÊNERO
/INGA MILL.(MIMOSACEAE) SUBMETIDAS À HIPOXIA E
ANOXIA

Este exemplar é a cópia da recepção final
da tese do(a) candidato(a)
Janete mayumi Okamoto
e aprovada pela Comissão Julgadora
28/08/98

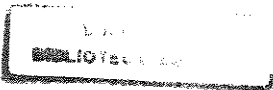
JANETE MAYUMI OKAMOTO

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO
DE BIOLOGIA - UNICAMP COMO PARTE
DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA
VEGETAL.

ORIENTADOR PROF. DR. CARLOS ALFREDO JOLY

CAMPINAS - SÃO PAULO
1998

Ok1e
35634/BC



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
V.	05.1e
Es.	
TOMBO BC/	35634
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	28/6/98
N.º CPD	

CM-00117922-3

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Ok1e Okamoto, Janete Mayumi
Ecofisiologia da germinação e do metabolismo respiratório de
quatro espécies do gênero *Inga* Mill. (MIMOSACEAE) submetidas
à hipoxia e anoxia/ Janete Mayumi Okamoto. -- Campinas, SP:
[s.n.], 1998.
77f.:ilus.

Orientador: Carlos Alfredo Joly
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

I. Germinação. 2. Anoxia. 3. Ecofisiologia. 4. Metabolismo. I.
Joly, Carlos Alfredo. II. Universidade Estadual de Campinas. Ins-
tituto de Biologia. III. Título.

**ECOFISIOLOGIA DA GERMINAÇÃO E DO METABOLISMO
RESPIRATÓRIO DE QUATRO ESPÉCIES DO GÊNERO
INGA MILL.(MIMOSACEAE) SUBMETIDAS À HIPOXIA E
ANOXIA**

JANETE MAYUMI OKAMOTO

ECOFISIOLOGIA DA GERMINAÇÃO E DO METABOLISMO RESPIRATÓRIO DE
QUATRO ESPÉCIES DO GÊNERO *INGA* MILL.(MIMOSACEAE) SUBMETIDAS À
HIPOXIA E ANOXIA

Campinas, 28 de agosto de 1998

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Prof. Dr. CARLOS ALFREDO JOLY
(Orientador)



(Assinatura)

Prof. Dr. LADASLAV SODEK



(Assinatura)

Prof. Dr. MASSANORI TAKAKI



(Assinatura)

SUPLENTE

Prof. Dr. JOÃO SEMIR

(Assinatura)

APROVADA

Dedico

*Ao meu pai, Mosasi Okamoto
(in memoriam), por ter me dado o seu
melhor, o seu amor, o seu exemplo, por ter
sempre acreditado em mim, até quando nem
mesmo eu acreditava....*

Pai, obrigada por tudo....

Agradecimentos

Com certeza, esta foi a melhor fase de minha vida, onde aprendi muito sobre respeito, amizade e profissionalismo.

O fruto deste trabalho foi colhido devido ao empenho de pessoas que colaboraram comigo durante as várias fases. A todas estas pessoas, obrigada.

Obrigada,

Prof. Dr. Carlos Alfredo Joly, pela orientação, pelo exemplo de profissionalismo e competência, pela oportunidade e acima de tudo, pela amizade, carinho e respeito que foram conquistados através e durante este trabalho.

Prof. Dr. João Semir por estar sempre ao meu lado me acompanhando e ensinando, com toda a sua paciência, carinho e broncas. E também por suas boas críticas e sugestões durante a pré-banca.

Profa. Dra. Eliana R. Forni-Martins, pela coorientação no último capítulo, por sua amizade, paciência e pelo respeito.

Prof. Dr. Fabio R. Scarano da Universidade Federal do Rio de Janeiro e Prof. Dr. Massanori Takaki da UNESP- Rio Claro, pelas críticas e sugestões durante a pré-banca, e pela rápida leitura da tese.

Prof. Dr. Ladaslav Sodek pelo seu pronto auxílio nas várias dúvidas surgidas durante este trabalho.

Prof. Dr. Ivany Valio pelas discussões sobre o trabalho, pelo seu carinho, amizade e respeito.

Prof. Dr. George Shepherd e Prof. Dr. Flávio A. M. dos Santos, por me auxiliarem nas discussões do trabalho.

Prof. Jorge Tamashiro pelas longas discussões relacionadas aos mais variados resultados obtidos neste e em vários outros trabalhos. Obrigada pelas boas idéias, pelos ensinamentos durante as coletas e acima de tudo, pelo carinho e pela amizade sincera.

Profa. Dr. Ana M. de Azevedo Tozzi pelas correções da tese por sua grande paciência e carinho.

Profa. Dra. Luisa Kinoshita, Prof. Dra. Angela B. Martins e Prof. Dr. Fernando Martins, Profa. Dra. Maria do Carmo Amaral e Volker pela força, pelas idéias, pelo carinho e respeito.

Prof. Flávia Garcia da Universidade Federal de Viçosa, pela troca de informações e identificação das espécies do gênero *Inga*.

Prof. Dr. João Vasconcelos do Departamento de Zoologia da UNICAMP, por facilitar minhas coletas na Serra do Japi.

Profa. Dra. Kikyo Yamamoto, por todo apoio recebido através da coordenação de pós-graduação de Biologia Vegetal.

Minha amiga, Ana Maria Monteiro, por estar presente em todos os momentos, pelos conselhos, sugestões e críticas tanto no trabalho como também na vida e pelo imenso carinho

Marcos Aidar, pelas broncas pela troca de idéias que me auxiliaram no laboratório, pelas boas palavras, pelo carinho, respeito e acima de tudo pela amizade.

Ana Lúcia Moreira e Isabel Tozzi, técnicas do laboratório de Ecofisiologia Vegetal, por me auxiliarem, pela amizade e carinho. Sem vocês, meu trabalho, certamente, não estaria completo.

Tania Maria Haddad Artioli, secretária da PRPG, pelas correções de português dos meus relatórios, pela amizade e a carinhosa atenção nas inúmeras vezes que fiquei esperando para conversar com meu orientador.

Meu querido Prof. de Inglês Alain François pela ajuda na hora de escrever o summary e pela "graaande" paciência e carinho.

Vidal e Kazue pela participação ativa durante o meu trabalho, seja discutindo, coletando material ou trocando idéias. Além de tudo isso, pela amizade, carinho e confiança.

Eduardo Borba pelas fotos do capítulo II, pela amizade e carinho nos momentos em que precisei e que foram muito importantes pra mim.

Márcio Lisboa que além de todo o seu carinho ainda me mostrou a lição de que os amigos sinceros serão ainda amigos mesmo depois de termos "pisado na bola" com eles.

Marta, Ana Kim, Elcida e Flavinha, pela amizade e carinho que fizeram com que os meus momentos ruins se tornassem alegres

Dionete Santim por me ajudar quando meu material de *Inga affinis* congelado foi perdido dando dicas sobre o *Inga fagifolia* e assim como também Andrea Spina me dando dicas de onde encontrar o *Inga luschnathiana*.

Rodrigo Pereira e Zeca, por me auxiliarem com as análises estatísticas e ainda Zeca por me ensinar a usar o programa Origin.

Lidiamar, aluna do Departamento de Zoologia, por me auxiliar nas coletas na Serra do Japi.

Patrícia Carneiro Lobo, pela indicação da espécie que me proporcionou resultados maravilhosos.

Amigos de pós-graduação Karin, Cibele, Andrea Barbosa, Cida, Rodrigo Singer, Ingrid, Angela Sartori, Simone, Luciana "Sertão", Fabio Vitta, Luciana, João Luis, Leila, Tereza Grombone, Tereza Sposito, Renato Goldenberg por um agradável convívio em todos os momentos.

Amigos do Departamento de Fisiologia Vegetal, Carlos, Milene, Andrea, Marluci, Cristininha, Emilinha, Jurandi, Katia, pela ajuda e amizade.

João Carlos Galvão por me ajudar nas coletas e pela amizade

Motorista Joaquim, por sua ajuda nas coletas, ao motorista Renato por ter me ajudado nas coletas iniciais e ao motorista José Carlos (Depto. de Zoologia) pelas coletas na Serra do Japi.

Maria Lúcia e Josênia por me auxiliarem quando precisei de informações burocráticas da secretaria e acima de tudo pelo carinho e amizade em todos os momentos.

Iara por me auxiliar no laboratório de Biossistemática, durante o trabalho de contagem cromossômica.

Minha "família" de Campinas D. Rosa, "Seu" Agenor, Ana, Heloísa, Carla, Denise, Sandra e Celeste por terem me aguentado quando chegava em casa cansada e de mau humor, pelo carinho e respeito.

Funcionários do Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Picinguaba, em especial ao Sr. Douglas e ao Sr. José, pelo apoio durante as coletas.

Polícia Florestal Parque dos Saltos do município de Brotas que me auxiliaram prontamente cedendo o barco e pessoal para as coletas de material no rio Jacaré-Pepira, em especial ao Cabo PM Luiz Carlos Traina e Soldado PM. Luiz Aparecido O. Reis.

FAPESP (Processo 97/01084-9), pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

Muito obrigada, minha mãe Tomiko Okamoto, meus irmãos Michel, Ester, Milton e Amalia, meu cunhado Kadú, meus queridos sobrinhos Vinícius e Gabriela e minha cunhada Suely. Vocês representaram para mim, um porto seguro e fizeram com que eu sentisse que sempre havia alguém pensando e torcendo muito por mim.

Obrigada Puffy por não ter me esquecido, por me receber tão feliz todas as vezes que voltei para casa, mesmo tendo sido abandonado por mim.

Carlos A. Joly, por tudo e sempre.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente participaram deste trabalho e que por ventura eu não tenha conseguido me lembrar, mas que foram de igual importância, obrigada.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	IV
RESUMO.....	VIII
SUMMARY.....	IX
INTRODUÇÃO GERAL.....	01

CAPÍTULO I

Fisiologia da germinação e do metabolismo respiratório durante a germinação de sementes de <i>Inga affinis</i> DC. (Mimosaceae) submetidas à hipoxia e anoxia.....	06
I.1 - Objetivos.....	06
I.2 - Material e Métodos.....	06
I.2.1 - Caracterização da espécie.....	06
I.2.2 - Metodologia.....	08
I.3 - Resultados e discussão.....	11
I.4 - Conclusão.....	18

CAPÍTULO II

Fisiologia da germinação e do metabolismo respiratório durante a germinação de sementes de <i>Inga fagifolia</i> (L.) Wild. ex Benth (Mimosaceae) submetidas à hipoxia e anoxia.....	19
II.1 - Objetivos.....	19
II.2 - Material e Métodos.....	19
II.2.1 - Caracterização da espécie.....	20
II.2.2 - Metodologia.....	21
II.3 - Resultados e discussão.....	21
II.4 - Conclusão.....	29

CAPÍTULO III

Fisiologia da germinação e do metabolismo respiratório durante a germinação de sementes de <i>Inga luschnathiana</i> Benth. (Mimosaceae) submetidas à hipoxia e anoxia.....	30
III.1 - Objetivo.....	30
III.2 - Material e Métodos.....	30
III.2.1 - Caracterização da espécie.....	30
III.2.2 - Metodologia.....	31
III.3 - Resultados e discussão.....	32
III.4 - Conclusão.....	37

CAPÍTULO IV

Fisiologia da germinação e do metabolismo respiratório durante a germinação de sementes de <i>Inga sessilis</i> (Vell.) Mart. (Mimosaceae) submetidas à hipoxia e anoxia.....	38
IV.1 - Objetivos.....	38
IV.2 - Material e Métodos.....	38
IV.2.1 - Caracterização da espécie.....	38
IV.2.2 - Metodologia.....	39
IV.3 - Resultados e discussão.....	40
IV.4 - Conclusão.....	45

CAPÍTULO V

Estudo comparativo dos aspectos ecofisiológicos do metabolismo respiratório durante a germinação em condições de anoxia e da viabilidade pós-anoxia de sementes de quatro espécies de <i>Inga</i> Mill. (Mimosaceae).....	47
V.1 - Introdução.....	47
V.2 - Materiais e Métodos.....	49
V.2.1 - Caracterização da área de ocorrência das espécies.....	49
V.2.2 - Metodologia	52
V.3 - Resultados.....	53
V.4 - Discussão.....	59

CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 65

PERSPECTIVAS..... 66

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 68

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO I

Figura I.1-	Detalhe do fruto de <i>Inga affinis</i> evidenciando a sarcotesta e a semente.....	7
Figura I.2-	Aspecto da mata ciliar do Rio Jacaré-Pepira, município de Brotas/SP evidenciando os ramos de <i>Inga affinis</i> voltados para o rio.....	8
Figura I.3-	Aspecto da jarra anaeróbica Oxoid utilizada nos tratamentos de anoxia evidenciando o indicador que demonstra ainda haver oxigênio na atmosfera da jarra recém selada.....	9
Figura I.4 -	Potencial germinativo de sementes de <i>I. affinis</i>	11
Figura I.5 -	Porcentagem da germinação das sementes de <i>I. affinis</i> armazenadas por 5, 10, 20 e 30 dias em condições de baixa temperatura e em água destilada.....	12
Figura I.6 -	Concentração de etanol durante a germinação de sementes de <i>I. affinis</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	13
Figura I.7 -	Concentração de lactato durante a germinação de sementes de <i>I. affinis</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	14
Figura I.8 -	Concentração de malato durante a germinação de sementes de <i>I. affinis</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	15

CAPÍTULO II

Figura II.1 -	Aspecto da inflorescência de <i>Inga fagifolia</i> Willd. no campus da UNICAMP.....	20
Figura II.2 -	Detalhe do fruto de <i>I. fagifolia</i> evidenciando a sarcotesta e a semente.....	21

Figura II.3 - Potencial germinativo de sementes de <i>I. fagifolia</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	22
Figura II.4 - Aspecto da semente de <i>I. fagifolia</i> germinando no interior da jarra anaeróbica. A seta indica a radícula protruída.....	22
Figura II.5 - Aspecto das sementes de <i>I. fagifolia</i> germinadas na jarra anaeróbica imediatamente após a abertura da mesma.....	23
Figura II.6 - Porcentagem de germinação de sementes de <i>I. fagifolia</i> armazenadas por 5, 10, 20 e 30 dias em baixa temperatura e em água destilada.....	24
Figura II.7 - Concentração de etanol durante a germinação de sementes de <i>I. fagifolia</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	26
Figura II.8 - Concentração de lactato durante a germinação de sementes de <i>I. fagifolia</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	26
Figura II.9 - Concentração de malato durante a germinação de sementes de <i>I. fagifolia</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	27

CAPÍTULO III

Figura III.1- Detalhe do fruto de <i>I. luschnathiana</i> evidenciando a sarcotesta e a semente.....	31
Figura III.2- Potencial germinativo de sementes de <i>I. luschnathiana</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	32
Figura III.3- Porcentagem de germinação de sementes de <i>I. luschnathiana</i> armazenadas por 5, 10, 20 e 30 dias em baixa temperatura e em água destilada.....	33
Figura III.4- Concentração de etanol durante a germinação de sementes de <i>I. luschnathiana</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	34

Figura III.5-	Concentração de lactato durante a germinação de sementes de <i>I. luschnathiana</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	35
---------------	--	----

Figura III.6-	Concentração de malato durante a germinação de sementes de <i>I. luschnathiana</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	35
---------------	---	----

CAPÍTULO IV

Figura IV.1-	Detalhe do fruto de <i>Inga sessilis</i> (Vel.) Mart. evidenciando a sua robustez, a sarcotesta e a semente.....	39
--------------	--	----

Figura IV.2-	Aspecto do ambiente de <i>I. sessilis</i> na Serra do Japi, município de Jundiaí/SP	40
--------------	---	----

Figura IV.3-	Potencial germinativo de sementes de <i>I. sessilis</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	41
--------------	--	----

Figura IV.4-	Porcentagem da germinação das sementes de <i>I. sessilis</i> armazenadas por 5, 10, 20 e 30 dias em condições de baixa temperatura e em água destilada.....	41
--------------	---	----

Figura IV.5-	Concentração de etanol durante a germinação de sementes de <i>I. sessilis</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	43
--------------	--	----

Figura IV.6-	Concentração de lactato durante a germinação de sementes de <i>I. sessilis</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	44
--------------	---	----

Figura IV.7-	Concentração de malato durante a germinação de sementes de <i>I. sessilis</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	44
--------------	--	----

CAPÍTULO V

Figura V.1-	Germinação pós-anoxia de sementes de <i>I. affinis</i> , <i>I. fagifolia</i> , <i>I. luschnathiana</i> e <i>I. sessilis</i> , onde (A) representa três dias em anoxia; (B) 4 dias; (C) 10 dias; (D) 20 dias e (E) 30 dias.....	55
-------------	--	----

Figura V.2-	Concentração de etanol durante a germinação de sementes de <i>I. affinis</i> , <i>I. fagifolia</i> , <i>I. luschnathiana</i> e <i>I. sessilis</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	56
-------------	--	----

Figura V.3-	Concentração de lactato durante a germinação de sementes de <i>I. affinis</i> , <i>I. fagifolia</i> , <i>I. luschnathiana</i> e <i>I. sessilis</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	57
Figura V.4-	Concentração de malato durante a germinação de sementes de <i>I. affinis</i> , <i>I. fagifolia</i> , <i>I. luschnathiana</i> e <i>I. sessilis</i> submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia.....	57
Figura V.5-	Cromossomos em metáfase mitótica de espécies de <i>Inga</i> , onde (A) representa <i>I. sessilis</i> com $2n=26$ e (B) <i>I. fagifolia</i> com $2n=52$	59
Tabela V.1	Contagem do número cromossômico de espécies do gênero <i>Inga</i> e seus respectivos ambientes.....	58

RESUMO

Foram estudados comparativamente os aspectos ecofisiológicos da germinação e do metabolismo respiratório de *Inga affinis* DC., *Inga luschnathiana* Benth., *Inga fagifolia* (L.) Willd ex Benth e *Inga sessilis* (Vell.) Mart.

Os locais onde foram coletadas as espécies constituem um gradiente de saturação hídrica do solo. As sementes de *Inga affinis* foram coletadas nas manchas de mata ciliar nas margens do rio Jacaré-Pepira no município de Brotas/SP, em locais sujeitos a inundações periódicas decorrentes da extravasão das águas do rio (água corrente). As sementes de *Inga luschnathiana* foram coletadas em um fragmento de mata de paludícola anexo à Reserva Municipal Mata de Santa Genebra, município de Campinas, SP, portanto em um local onde a saturação hídrica do solo é quase que permanente, altamente heterogênea e é decorrente do afloramento do lençol freático (água estagnada). *Inga fagifolia*, outra espécie, teve suas sementes coletadas no campus da Universidade Estadual de Campinas de árvores cujas sementes são provenientes de árvores das margens dos canais de Santos. As sementes de *Inga sessilis* foram coletadas na Serra do Japi, no município de Jundiaí/SP, em uma Floresta Mesófila Semidecídua de Altitude.

No estudo da ecofisiologia da germinação, as sementes foram submetidas aos diferentes tratamentos para a avaliação do efeito da luz, da hipoxia, da anoxia e do armazenamento na germinação. Os estudos sobre o metabolismo respiratório da germinação foram efetuados através da determinação do conteúdo de etanol, lactato e malato em sementes colocadas para germinar sob distintas condições de disponibilidade de oxigênio. Simultaneamente foi realizada uma análise citogenética com a contagem dos cromossomos das quatro espécies.

Este estudo demonstrou que as espécies *Inga affinis*, *Inga fagifolia* e *Inga luschnathiana* possuem diferentes estratégias adaptativas de tolerância à baixas concentrações de oxigênio, de acordo com a imposição de seu ambiente de ocorrência, assim como também que sementes de *Inga sessilis*, apesar de se encontrarem em um ambiente onde a saturação hídrica do solo não ocorre, conserva ou vem adquirindo características que poderiam provavelmente permitir seu estabelecimento em ambientes sazonal ou permanentemente encharcados, tipicamente ocupado pela maioria das espécies do gênero. O estudo citogenético evidenciou a presença de duas espécies tetraplóides, *I. fagifolia* e *I. luschnathiana*, dentre as quatro analisadas no presente estudo.

SUMMARY

The ecophysiological aspects of germination and of the respiratory metabolism of *Inga affinis* DC., *Inga luschnathiana* Benth., *Inga fagifolia* (L.) Willd ex Benth e *Inga sessilis* (Vell.) Mart. seeds were studied in a comparative way.

The sites where the species were collected represent a gradient of soil hydric saturation. *Inga affinis* seeds were collected in remnants of Gallery Forest on the banks of the Jacaré-Pepira river, nearby the city of Brotas/SP, in places prone to periodical flood due to the rising of the river level (running water). *Inga luschnathiana* seeds were collected in fragments of Swamp Forest, nearby the Reserva Municipal Mata de Santa Genebra, in the city of Campinas/SP., i.e. in highly heterogeneous area where the soil is waterlogged almost all year round as a consequence of the surfacing of the water table (stagnant water). *Inga fagifolia* seeds were collected on the campus of the Universidade Estadual de Campinas, from trees grown from seeds collected in trees planted along the water channels from Santos/SP. *Inga sessilis* seeds were collected in the Serra do Japi, in the city of Jundiaí/SP in an area of Semideciduous Forest

The seed germination ecophysiological study was carried by doing experiments to assess the effect of light, of storage and of distinct concentrations of oxygen, normoxia, hypoxia and anoxia. The respiratory metabolism was studied through the determination of ethanol, malate and lactate contents in seeds germinated under different conditions of oxygen availability.

This study showed that the different adaptative strategies developed by *Inga affinis*, *Inga fagifolia* and *Inga luschnathiana* to tolerate low oxygen concentrations are in accordance with the constraints of their environment. Although *Inga sessilis* seeds are not naturally subject to waterlogging 40% of them have characteristics that would probably allow their establishing in flood prone environments where the other species occur. The citogenetic study showed the occurrence of two tetraploid, *I. fagifolia* and *I. luschnathiana*, among the four species studied.

INTRODUÇÃO GERAL

No interior do estado de São Paulo e demais estados da região sudeste do Brasil, apenas duas formações florestais ocorrem no ecótono entre os corpos d'água e o terreno adjacente, as matas ciliares e as matas paludícolas, também denominadas matas de brejo (LEITÃO FILHO, 1982).

As matas ciliares são formações florestais sujeitas à inundações periódicas (REICHARDT, 1989). As espécies típicas desta formação constituem um importante habitat para uma fauna bastante diversificada, sendo também uma fonte de alimento para os peixes (KAGEYAMA, 1989; RODRIGUES, 1989).

A composição florística destas áreas se caracteriza por algumas espécies exclusivas, e outras que dependem da formação florestal adjacente. Já as matas paludícolas, ocorrem em áreas onde o solo é saturado hidricamente quase que permanentemente, caracterizando-se por apresentar uma baixa diversidade florística (LEITÃO FILHO, 1982).

Muitos estudos e modelos mostram que uma ação permanente como correntezas, duração do alagamento, exposição à luz, fertilidade do solo e também a intervenção humana explicam a composição das espécies de áreas alagadas (BLOM & VOESENEK, 1996).

A destruição deste ecótono acarreta prejuízos como a erosão das camadas superficiais do solo, assoreamento dos leitos de rios, contaminação das águas e a perda de um habitat para as espécies exclusivas ou adaptadas para estes locais (fauna e flora) (LIMA, 1989; JOLY, 1994a). Com a retirada da vegetação natural, a remoção da camada superficial do solo aumenta consideravelmente e a precipitação alcança o sistema dos rios mais diretamente, muitas vezes com uma grande carga de sedimentos. O assoreamento dos rios e o rápido escoamento da água precipitada ocasionam cheias e inundações cada vez mais frequentes (BLOM & VOESENEK, 1996).

Durante o alagamento há um rápido desaparecimento do oxigênio no solo e uma forte limitação à difusão de gases (ARMSTRONG *et al.*, 1994), além de uma compactação decorrente da quebra e do rearranjo de partículas agregadas (ENGELAAR *et al.*, 1993). Portanto, o alagamento altera os processos físico-químicos levando a um acúmulo de gases como CO₂ e CH₄, alterações no pH e um decréscimo no potencial redox (PONNAMPERUMA, 1984).

Os estudos realizados nestes últimos 20 anos mostram, de uma forma consensual, que as plantas, assim como a maioria de outros organismos, em condições de baixa tensão de oxigênio, como as encontradas em solos alagados ou em plantas em total submersão, substituem a respiração aeróbica pelo metabolismo fermentativo (McMANMON & CRAWFORD, 1971; DAVIES, 1980; MOCQUOT *et al.*, 1981; JOLY & CRAWFORD, 1982, 1983; RAYMOND *et al.*, 1985; JOLY 1991, 1994a; CRAWFORD, 1992; JOLY & BRÄNDLE, 1995; CRAWFORD & BRÄNDLE, 1996).

O estresse causado pela baixa disponibilidade de oxigênio conduz a uma redução na síntese de ATP, proteínas e ácidos nucleicos, e todas estas modificações causam impacto na indução e expressão genética de várias enzimas associadas ao metabolismo fermentativo de carboidratos (DAVIES, 1980; MOCQUOT *et al.*, 1981).

A controvérsia sobre a produção de malato por plantas tolerantes ao alagamento (CRAWFORD, 1978; Ap REES & SMITH, 1987) estimularam novas pesquisas como os estudos recentes de JOLY (1991; 1994b) que, com base em espécies neotropicais, propôs que a tolerância à inundação depende de uma interação entre respostas metabólicas (redução da demanda energética e um controle da produção de metabólitos tóxicos como o etanol e o lactato) e respostas morfo-anatômicas (desenvolvimento de raízes adventícias, de aerênquima e a hipertrofia de lenticelas).

As plantas de diferentes espécies variam muito com relação ao seu grau de tolerância às diferentes concentrações de oxigênio existentes em ambientes sujeitos a inundações. Muitos estudos, nestas duas últimas décadas, têm sido efetuados com o intuito de elucidar os mecanismos pelos quais plantas conseguem sobreviver nestes ambientes (BASKIN & BASKIN, 1976; CRAWFORD, 1977, 1978, 1987, 1992; DAVIES, 1980; JOLY & CRAWFORD, 1982; JOLY, 1991, 1994a,b; JOLY & BRÄNDLE, 1995).

A resposta de plantas à baixa disponibilidade de oxigênio vêm sendo examinadas, principalmente em espécies de interesse econômico como as Poaceae, arroz (*Oryza sativa*) (KENNEDY *et al.*, 1987; MUJER *et al.*, 1993; GUGLIELMINETTI *et al.*, 1995; MIYOSHI & SATO, 1997), milho (*Zea mays*) (ANDREWS *et al.*, 1993,1994; JOHNSON *et al.*, 1994; CHRISTOPHER & GOOD,

1996), trigo (*Triticum aestivum*) (AL-ANI *et al.*, 1985; ALBRECHT & WIEDENROTH, 1994; BIEHLER *et al.*, 1996; ANDREWS, 1997) e algumas espécies do gênero *Echinochloa*, plantas invasoras das plantações de arroz (RUMPHO & KENNEDY, 1981; KENNEDY *et al.*, 1983; AL-ANI *et al.*, 1985)

Estudos sobre a tolerância à inundação têm focado principalmente a capacidade de estabelecimento das plântulas porém, as sementes também sofrem influência da disponibilidade de oxigênio pois podem cair em solo encharcado ou serem dispersadas pela água (LOBO, 1993). Com o alagamento, a germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas podem ser comprometidos dependendo da espécie em questão e também da duração do período de inundação (KOZLOWSKI, 1984).

Para se conhecer as diversas etapas do processo de estruturação de comunidades como o estabelecimento, a sucessão e a regeneração natural, o conhecimento sobre a ecofisiologia das sementes é muito importante (VAZQUEZ-YANES & OROZCO-SEGOVIA, 1993), pois a primeira etapa da seleção ocorre durante a fase de germinação das sementes.

Os efeitos da inundação na sobrevivência da semente e na germinação são pouco investigados. O avanço e o progresso no entendimento sobre a resistência das sementes à inundação, depende não só de uma completa análise do ambiente e de parâmetros metabólicos, como também da consideração de várias fases da história de vida da planta (ERNST, 1990).

Individualmente, o conhecimento das respostas de uma dada espécie auxilia no entendimento dos mecanismos adaptativos que permitem às plantas terrestres enfrentarem e estarem adaptadas à condição de alagamento, auxiliando na compreensão da importância deste processo no âmbito de comunidade. Este conhecimento é importante tanto para a compreensão da dinâmica das áreas sujeitas à inundação, como para a recuperação da vegetação nas planícies de alagamento. Ambos os aspectos têm sido ativamente pesquisados (JOLY, 1986; BLOM & VOESENEK, 1996).

Segundo CRAWFORD (1977), as sementes durante a embebição, antes da ruptura da testa, são expostas a um período natural de anaerobiose, no qual a respiração aumenta dramaticamente. Este período difere daquelas plantas já

estabelecidas e que apresentam suas raízes em locais permanentemente ou periodicamente aladas, pois para as sementes não existe a possibilidade deste estresse ser aliviado pela difusão de oxigênio vindo da parte aérea (JOLY & CRAWFORD, 1983).

Alguns trabalhos sobre a germinação de sementes de espécies relacionadas com a hipoxia e anoxia foram realizados como no trabalho de WATERS (1991) com sementes de trigo (*Triticum aestivum*, Poaceae), SMALL *et al.* (1989) com sementes de *Erythrina caffra* (Fabaceae), KENNEDY *et al.* (1991) com sementes de arroz (*Oriza sativa*, Poaceae) e de *Echinochloa crus-galli* (Poaceae), BENVENUTTI & MACCHIA (1995) com sementes de *Datura stramonium* (Solanaceae). Estudos enfocando espécies neotropicais também se restringem a um pequeno grupo de espécies como *Chorisia speciosa* (Bombacaceae) (JOLY & CRAWFORD, 1983), *Inga affinis* (Mimosaceae) (LIEBERG & JOLY, 1993), *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) (MARQUES, 1994), *Sesbania virgata* (Fabaceae) (OKAMOTO, 1995) e *Talauma ovata* (Magnoliaceae) (LOBO & JOLY, 1996), *Parkia pendula* (Mimosaceae) (SCARANO & CRAWFORD, 1992), que demonstraram um amplo espectro de respostas, como a capacidade de germinar em hipoxia e até em anaerobiose, a dispersão das sementes em época seca, e a manutenção da viabilidade por longos períodos.

Estas observações foram corroboradas na recente revisão de CRAWFORD & BRÄNDLE (1996) que concluem que na ocupação de habitats com baixa disponibilidade de oxigênio, as plantas desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, uma ampla gama de estratégias. Invariavelmente a resposta observada depende não só da espécie mas também da intensidade e da duração do estresse.

As zonas de vegetação de uma planície de alagamento muitas vezes refletem diferentes níveis de estresse e de heterogeneidade com relação à disponibilidade de oxigênio e de nutrientes. Estes fatores determinam uma zonation vegetal particular, muitas vezes em uma pequena escala espacial (BLOM & VOESENEK, 1996). Isto sugere que as espécies coexistentes neste ambiente sejam particularmente interessantes para um estudo das respostas

adaptativas de plantas ao alagamento.

As respostas adaptativas à condição de baixa disponibilidade de oxigênio podem ser diferenciadas ao longo de duas linhas de pesquisa com relação ao habitat. A primeira diz respeito à diversidade de espécies em um habitat, isto é, muitas espécies vivendo juntas em um só lugar, enfrentando condições ambientais semelhantes, mas com estratégias adaptativas diferentes. Outra possibilidade é o estudo de espécies de um mesmo gênero que ocorrem ao longo do gradiente de estresse, isto é espécies que pertencem, filogeneticamente, a um mesmo grupo e que ocorrem naturalmente em distintas zonas da planície de alagamento. Apesar de filogeneticamente estarem muito próximas estas espécies apresentam estratégias muito diversificadas, possivelmente refletindo as condições específicas do ambiente que ocupam (BLOM & VOESENEK, 1996).

O gênero *Inga* se presta aos dois tipos de estudo, pois tanto possui espécies que se distribuem ao longo de um gradiente de saturação hídrica do solo e também espécies diferentes ocupando uma mesma zona ao longo do gradiente. O objetivo deste trabalho é determinar as estratégias específicas, desenvolvidas pelas sementes de cada espécie para germinar em um gradiente de disponibilidade de oxigênio, e a correlação destas estratégias com o ambiente típico de ocorrência de cada uma das espécies.

Nos capítulos I, II, III e IV serão tratados a fisiologia da germinação de cada uma das espécies, e o estudo do metabolismo respiratório durante a germinação. No capítulo V serão comparadas as respostas fisiológicas das quatro espécies, relacionando-as com os respectivos ambientes, sendo apresentado e discutido um estudo citogenético através da contagem cromossômica.

Capítulo I - Fisiologia da germinação e do metabolismo respiratório durante a germinação de sementes de *Inga affinis* DC. (Mimosaceae) submetidas à hipoxia e anoxia.

RESUMO – Sementes de *Inga affinis* mostraram que possuem alta tolerância à falta de oxigênio. Sob hipoxia, a germinação foi de 100%, enquanto que, na ausência total de oxigênio (anoxia) apesar das sementes não germinarem, se mantiveram viáveis até 60 dias. Tal característica garante uma vantagem competitiva nas planícies aluviais recentes, seu habitat.

I.1 - Objetivo

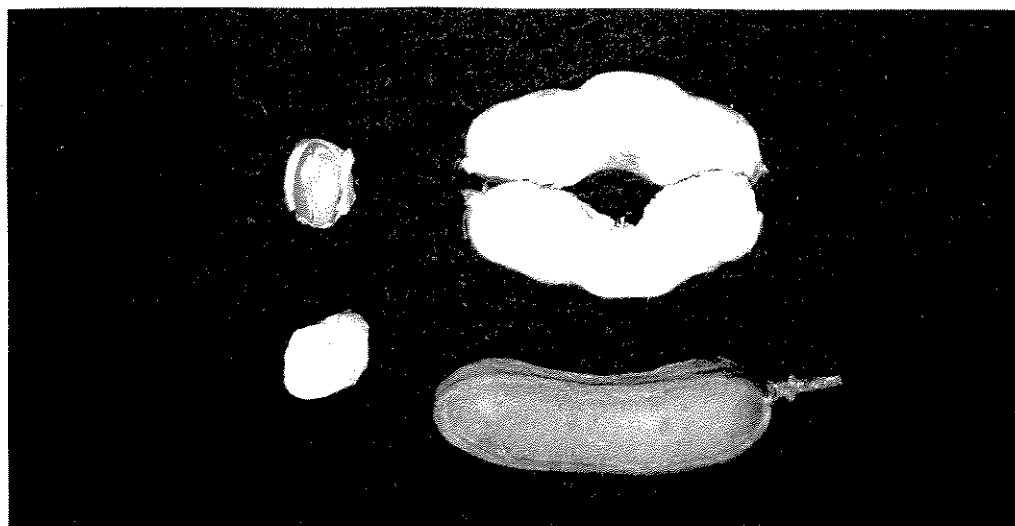
LIEBERG & JOLY (1993) demonstraram que além das plântulas de *Inga affinis* serem altamente tolerantes à saturação hídrica do solo, as sementes eram capazes de germinar totalmente submersas. Neste Capítulo apresentamos os aspectos da fisiologia da germinação e as respostas do metabolismo respiratório durante a germinação das sementes de *I. affinis* DC. submetidas à hipoxia e anoxia, com a finalidade de caracterizar as respostas adaptativas presentes durante a germinação desta espécie em um ambiente com baixa disponibilidade de oxigênio.

I.2 - Material e métodos

I.2.1 - Caracterização da espécie

Inga affinis DC. é uma espécie arbórea que chega a ter de 6 a 15 m de altura e o caule, ferrugíneo-pubescente, pode ter até 40 cm de diâmetro na altura do peito. As folhas apresentam de 3 a 5 jugas de folíolos lanceolados, acima lustrosos, quase glabros e obscuros quando secos, embaixo pálidos e pubescentes, às vezes os apicais muito grandes medindo 5-15 cm de comprimento por 2- 7,5 cm de largura. Pecíolo viloso não alado, ráquis claramente aladas, glândula raqueal em pratinho mediano, séssil ou muito pouco elevado em taça. Espigas de 1 a 2 axilares, hírtulas, conóides, com flores brancas abrindo desde a base, brácteas menores que o cálice, este de 6- 9 mm de comprimento, corola 15-17 mm de comprimento, estames cerca de 4 cm de comprimento. O fruto (Figura I.1) é uma vagem linear um pouco encurvada, grossa de 6- 11 cm de comprimento por 1,6- 2,3 cm de largura, bordo largo estriado, mais longo do que as faces (BURKART 1979).

Esta é uma espécie presente nas planícies aluviais dos rios do interior do estado de São Paulo, portanto altamente tolerante à saturação hídrica do solo provocada pela extravazão das águas no verão (Figura 1.2). As plântulas toleram longos períodos de inundação, sobrevivendo até mesmo à submersão total



5 cm

Figura 1.1- Detalhe do fruto de *Inga affinis* evidenciando a sarcotesta e a semente.

(LIEBERG & JOLY 1993). A maturação dos frutos ocorre no verão e a dispersão é feita por animais, principalmente macacos, e por hidrocoria. As sementes são recalcitrantes (STEADMAN *et al.*, 1996) e apresentam uma longevidade curta, consequentemente, em condições naturais, a germinação ocorre onde a disponibilidade de oxigênio alterna, muitas vezes num curto período de tempo, de normoxia a uma hipoxia acentuada. Muitas vezes a deposição do fruto e/ou da semente ocorre em áreas de intensa deposição de sedimentos que cobrem totalmente os diásporos. Nestes locais é freqüente a semente ficar por dias ou semanas numa condição de total falta de oxigênio (J.R. Spigolon, comunicação pessoal).

Os frutos de *I. affinis* foram obtidos nas margens do Rio Jacaré-Pepira, município de Brotas/SP. A utilização de um barco foi necessária, pois os ramos das árvores desta espécie encontravam-se voltadas para o rio.



Figura 1.2 – Aspecto da Mata Ciliar do rio Jacaré-Pepira no município de Brotas/SP, evidenciando os ramos de *I. affinis* voltados para o rio.

1.2.2 - Metodologia

O termo normoxia foi utilizado neste trabalho para os tratamentos em condições normais de aeração, hipoxia foi utilizada para definir sementes em condições de submersão, portanto, embora não medido, com menor concentração de oxigênio que a condição de normoxia, uma vez que a água atua como uma barreira para a difusão do oxigênio até as sementes. O termo anoxia foi utilizado para os tratamentos em total ausência de oxigênio que foi monitorado através de um indicador.

Após a coleta, os frutos foram levados até o Laboratório de Ecofisiologia Vegetal do Departamento de Botânica da UNICAMP, onde foram efetuadas a retirada das sementes dos frutos e a retirada da sarcotesta, portanto, em todos os tratamentos foram utilizadas sementes sem a sarcotesta. Nos experimentos de germinação, antes de cada tratamento, as sementes foram esterilizadas com solução de Micostatin ($1000 \text{ units.ml}^{-1}$).

A condição de normoxia foi estabelecida com a colocação de 10 sementes em 10 caixas Gerbox sobre papel de filtro úmido. A condição de hipoxia foi conseguida com a submersão de 10 sementes em 250 ml de água destilada em 10 caixas Gerbox.

Para estabelecer a condição de anoxia foi utilizada uma jarra anaeróbica Oxoid onde foram colocadas 10 placas de Petri contendo 10 sementes cada (caixas Gerbox não foram utilizadas por serem incompatíveis com o tamanho das jaras) (Figura 1.3), onde foram colocados 2 sachets, um que libera o catalizador que remove o oxigênio criando uma atmosfera anaeróbica e outro que monitora a ausência de oxigênio.

Todos os tratamentos (normoxia, hipoxia e anoxia) foram realizados em germinador Fanem com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas de luz branca. A condição de escuro foi obtida com o envolvimento das caixas Gerbox em 3 sacos de polietileno pretos, sendo os experimentos montados e o acompanhamento feito em câmara escura com luz verde de segurança (JOLY & FELIPPE 1979).

O armazenamento também foi testado, porém, por se tratar de uma semente recalcitrante (STEADMAN *et al.*, 1996) as sementes começam a perder a viabilidade logo nas primeiras 24 horas, quando armazenadas em sacos de papel a temperatura ambiente. A perda de viabilidade está associada à uma rápida dessecação. Consequentemente, testou-se o armazenamento em água

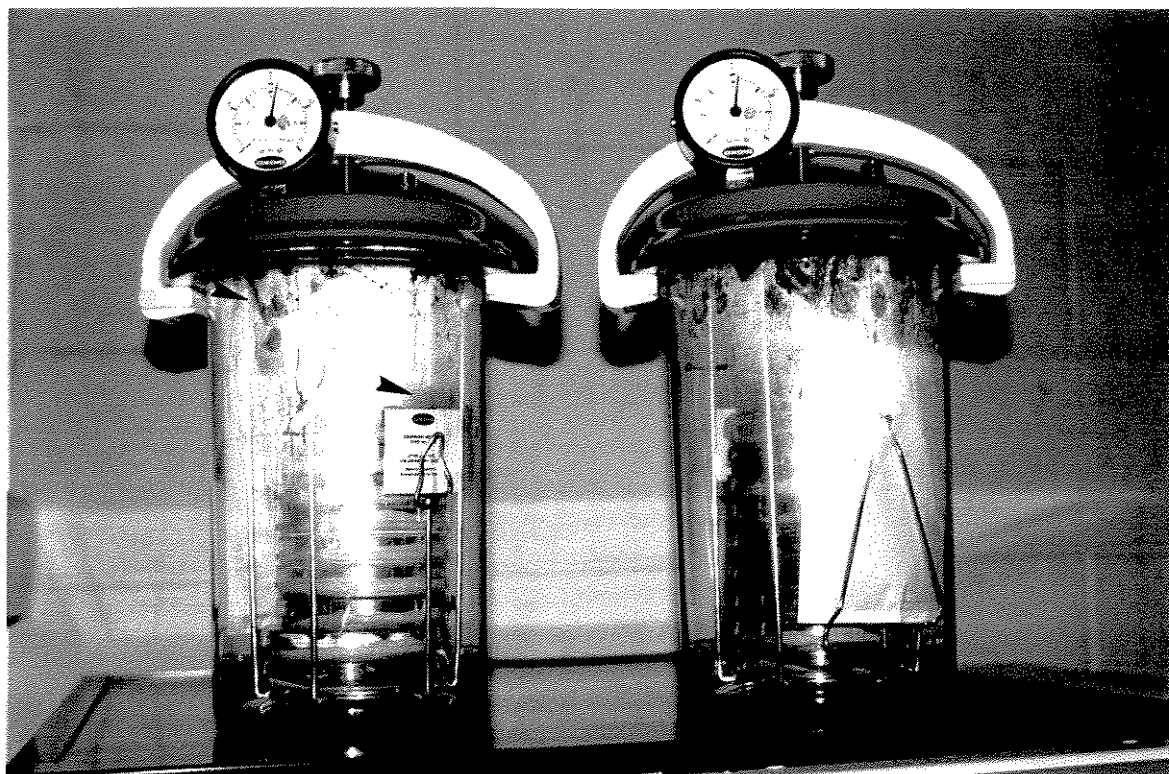


Figura 1.3 - Aspecto da Jarra Anaeróbica Oxoid utilizada para os tratamentos de anoxia evidenciando o indicador rosa que demonstra ainda haver oxigênio na atmosfera da jarra recém selada.

destilada e a 5° C em geladeira, de forma a impedir a dessecação e ao mesmo tempo inibir a germinação com a baixa temperatura.

Durante a contagem do número de sementes germinadas era verificado o estado das mesmas, isto é, se estavam viáveis ou mostravam estar em estado de putrefação, se inviáveis, eram descartadas. Portanto, o experimento era finalizado quando se atingia 100% de germinação ou quando as restantes estavam inviáveis. A protrusão de radícula foi considerada como germinação.

Em todos os tratamentos para determinação de etanol, lactato e malato foram utilizadas 10 sementes colocadas em caixas Gerbox sobre papel de filtro. Para a condição de normoxia, o papel de filtro era umedecido com água destilada. A hipoxia foi conseguida com a adição de 250 ml de água destilada na caixa Gerbox, mantendo-se as sementes totalmente submersas. A condição anóxica foi obtida com a colocação de placas de Petri com 10 sementes cada dentro das jarras anaeróbicas.

Após o período estipulado para cada tratamento, as sementes (± 1 g) foram colocadas em nitrogênio líquido e, em seguida, trituradas em 12 ml de ácido perclórico (6%) gelado. O homogeneizado era centrifugado a 3500 rpm por 20 minutos em centrífuga refrigerada a 0°C. Após a centrifugação, o sobrenadante era retirado e neutralizado com K₂CO₃ 5M, na presença de alaranjado de metila e imediatamente congelado para posterior leitura a 340 nm em espectrofotômetro Beckman DU-65 com a utilização de cubetas de quartzo de 1 ml. No sentido de padronizar os procedimentos e evitar distorções, todas as leituras foram efetuadas com a utilização de kits Boehringer (Mannheim-Germany) conforme descrito por JOLY & BRÄNDLE (1995).

Foram analisadas sementes oriundas dos tratamentos de normoxia, hipoxia e anoxia por 12, 24, 48, 72 e 96 horas.

Para os testes de germinação, os resultados foram analisados através da análise da variância com os dados convertidos para arco seno da raiz quadrada da porcentagem e posteriormente aplicado o teste de Tukey. Nos testes para a quantificação dos metabólitos, os dados foram analisados parametricamente através de análise de variância (ANOVA) e posteriormente pelo teste de Tukey para diferenciação das médias (SOKAL & ROHLF 1979).

I.3 - Resultados e discussão

Na Figura I.4 pode-se observar que as sementes de *Inga affinis* possuem um alto potencial germinativo em condições normais de oxigênio (normoxia). A ausência de luz causa uma pequena diminuição na velocidade inicial de germinação, porém não afeta o tempo necessário para que 100% das sementes germinem. Não há diferença significativa entre os tratamentos de luz e escuro.

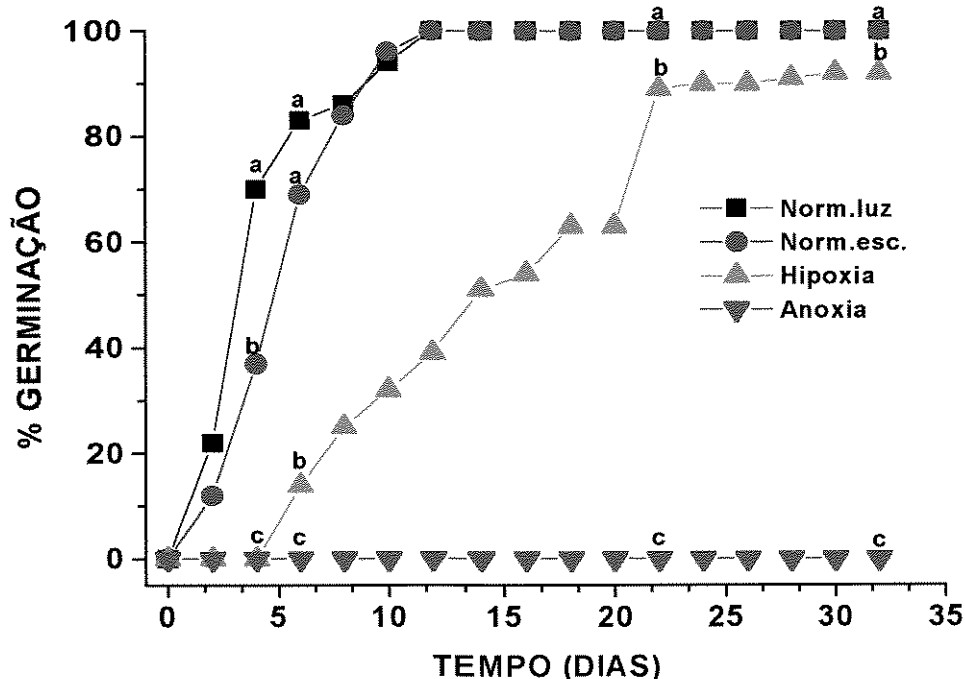


Figura I.4 - Potencial germinativo de sementes de *I. affinis*. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n = 10$.

A baixa disponibilidade de oxigênio, hipoxia, não inibe a germinação mas retarda seu início e reduz significativamente a percentagem final de sementes germinadas enquanto que, em anoxia, a germinação é inibida (Figura I.4)

No tratamento de armazenamento (Figura I.5), dez dias foram suficientes para afetar, significativamente, o potencial germinativo das sementes, pois o percentual final de germinação caiu para 82%. Após 30 dias a porcentagem de germinação já era inferior a 50%.

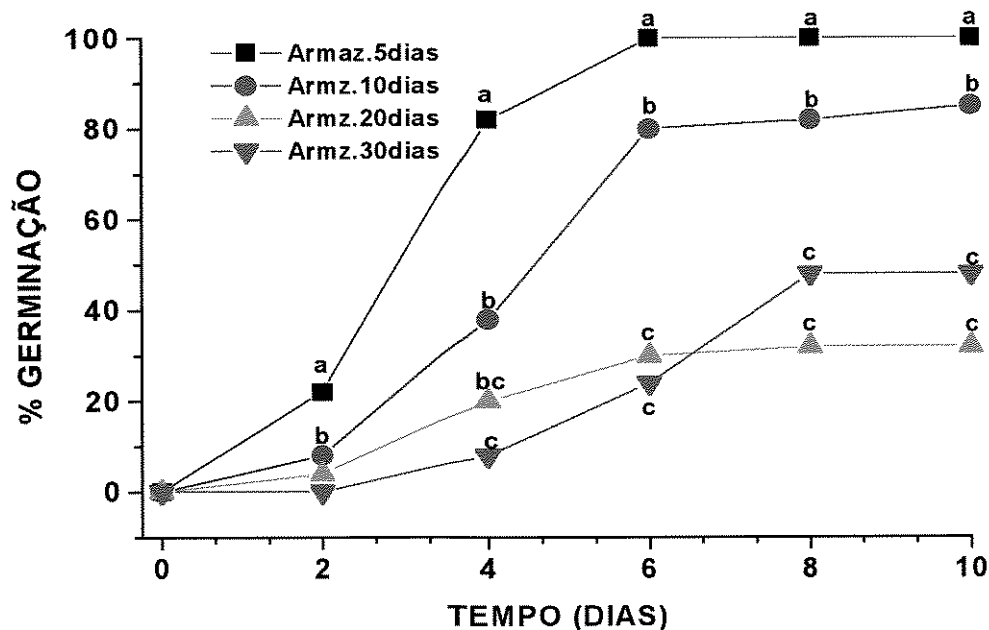


Figura 1.5 - Porcentagem da germinação das sementes de *I. affinis* armazenadas por 5, 10, 20 e 30 dias em condições de baixa temperatura e em água. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n = 10$.

Sementes de *I. affinis* não são fotoblásticas e possuem um potencial germinativo muito elevado. Mesmo em hipoxia o percentual de germinação é considerado alto (92%) e comparável com os resultados obtidos para *Sesbania virgata* (Fabaceae) (OKAMOTO, 1995). Por sua vez, SMOLDERS *et al.* (1995) trabalhando com *Stratiotes aloides* (Hydrocharitaceae) obteve apenas 70% de germinação das sementes e, surpreendentemente, LOBO & JOLY (1996) e KOLB (1998) demonstraram que, respectivamente, as sementes de *Talauma ovata* (Magnoliaceae) e *Tabebuia cassinoides* (Bignoniaceae), espécies típicas de áreas quase que permanentemente encharcadas, são incapazes de germinar sob hipoxia.

No caso de *I. affinis*, a hipoxia induziu a um atraso no início da germinação, sendo este atraso significativo. Em anoxia, em 60 dias de acompanhamento (dados não mostram), as sementes não germinaram mas se mantiveram viáveis.

Com relação ao armazenamento, a viabilidade começa a ser perdida à partir de 10 dias. É interessante observar que a redução na viabilidade está

ocorrendo mesmo mantendo-se o teor de umidade, fator tido como essencial na manutenção da viabilidade de uma semente recalcitrante, pois as sementes foram armazenadas em água e em baixa temperatura.

Observa-se na Figura 1.6 que, já nas sementes recém retiradas dos frutos existe uma considerável concentração de etanol. Nos tratamentos de normoxia e hipoxia (água estagnada, sem aeração) esta concentração permaneceu no mesmo nível ao longo de todo o experimento não havendo diferença significativa entre estes dois tratamentos. Já sob anoxia, a elevação da concentração de etanol é rápida, constante e altamente significativa chegando a quase 6 vezes da concentração encontrada para hipoxia após 96 horas.

A concentração de oxigênio no tratamento de hipoxia, aparentemente não foi suficientemente baixa (uma vez que a difusão de oxigênio até a sementes é dificultada pela água) para que a via fermentativa fosse acelerada, permanecendo num mesmo patamar observado para a condição de disponibilidade normal de oxigênio (aerada). Todavia, a presença de etanol em

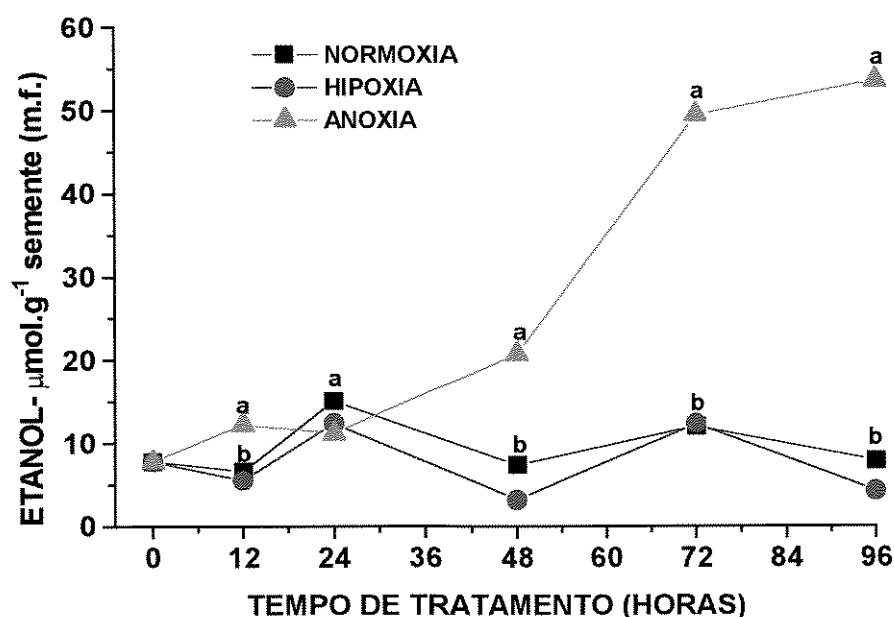


Figura 1.6 - Concentração de etanol, durante a germinação de sementes de *I. affinis* submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05) com n=5.

ambos os tratamentos pode significar que parte dos tecidos estejam em condições de hipoxia ou anoxia. Portanto pode-se considerar que este valor encontrado represente a produção basal de etanol. Aparentemente, somente a anoxia induziu a uma fermentação alcoólica efetiva, isto é, a aceleração da via fermentativa ocorreu apenas na condição de total ausência de oxigênio.

Embora em relação à produção de etanol os valores da concentração de lactato sejam baixas em todos os tratamentos, observa-se (Figura 1.7) que a anoxia causou um aumento na concentração deste metabólito a partir de 48 horas, sendo esta diferença significativa.

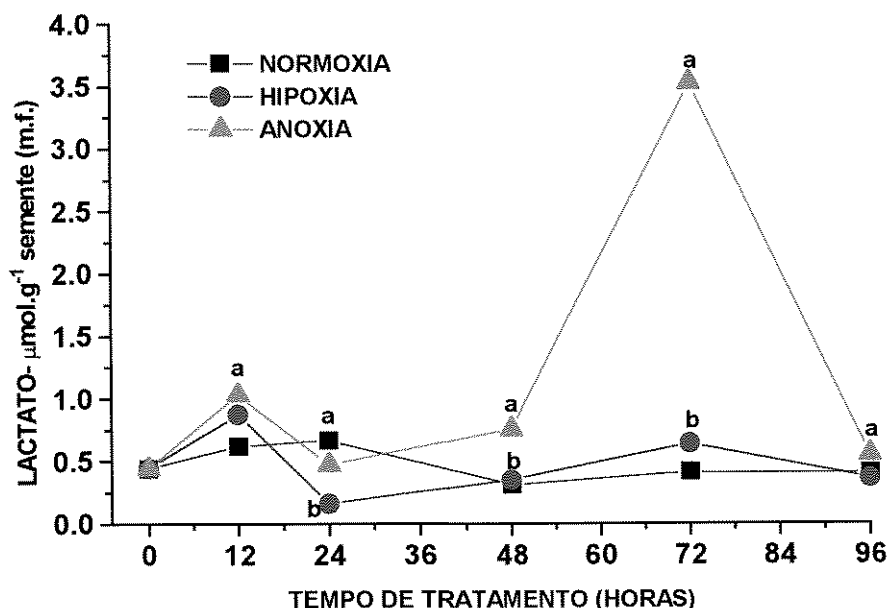


Figura 1.7 - Concentração de lactato, durante a germinação de sementes de *I. affinis* submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n=5$.

O malato por sua vez (Figura 1.8), teve sua produção significativamente aumentada após 12 horas em todos os tratamentos (Figura 1.8). Em anoxia, após 24 horas do tratamento, o aumento deste metabólito é acentuadamente significativo, porém há um decréscimo após 96 horas. Em condições de hipoxia e normoxia os valores das concentrações permaneceram quase que nivelados.

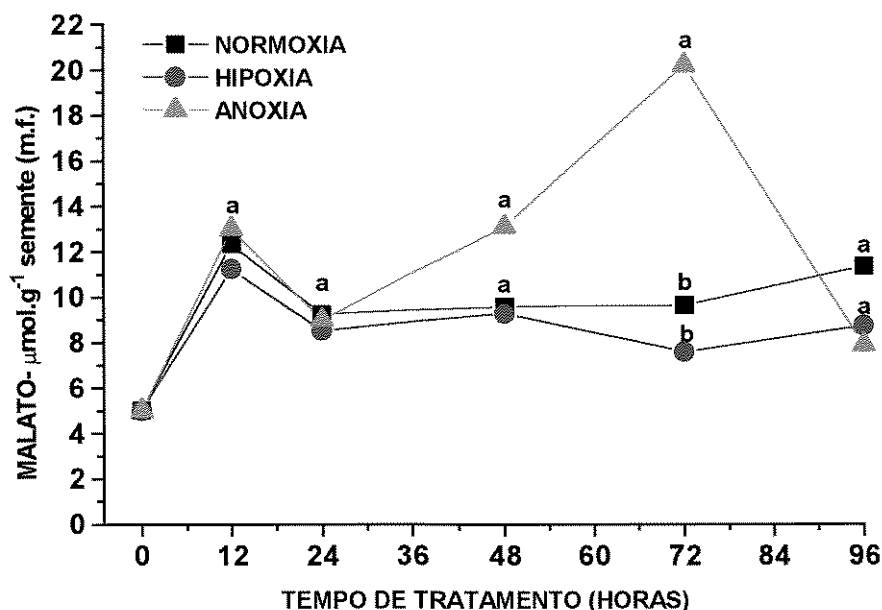


Figura 1.8 - Concentração de malato, durante a germinação de sementes de *I. affinis* submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n=5$.

As sementes de *I. affinis*, em condições experimentais de baixa disponibilidade de oxigênio, apresentaram uma ativação da via fermentativa com a produção de etanol e de lactato. Entretanto, esta resposta foi mais evidente em condições de ausência completa de oxigênio, anoxia.

A aceleração da fermentação alcoólica foi observada na germinação de sementes de outras espécies consideradas tolerantes, por exemplo, *Echinochloa crus-galli* (Poaceae) (RUMPHO & KENNEDY, 1981), arroz (*Oryza sativa* Poaceae) (KENNEDY *et al.*, 1987; SETTER *et al.*, 1994), *Erythrina caffra* (Fabaceae) (SMALL *et al.*, 1989) e *Sesbania virgata* (Fabaceae) (OKAMOTO, 1995), assim como em sementes de espécies não tolerantes à saturação hídrica do solo, como *Chorisia speciosa* (Bombacaceae) (JOLY & CRAWFORD, 1983), milho (*Zea mays*, Poaceae), soja (*Glycine* sp, Fabaceae), ervilha (*Pisum sativum*, Fabaceae) (RAYMOND *et al.*, 1985) e trigo (*Triticum aestivum*, Poaceae) (WATERS *et al.*, 1991). Portanto, o grau de tolerância de uma espécie à restrição

quanto à disponibilidade de oxigênio no ambiente natural não pode ser determinado através apenas da aceleração da via fermentativa alcoólica.

É importante ressaltar que a aceleração da via fermentativa pode compensar a baixa taxa de produção de ATP inerente ao metabolismo respiratório (RAYMOND *et al.*, 1985) explicando desta forma a manutenção da viabilidade das sementes por até 30 dias em hipoxia (Figura 1.6), demonstrando também que esta espécie deve tolerar altas concentrações de etanol, não sendo 53,6 μ moles por grama de semente (massa fresca) o suficiente para causar algum dano, aliado a capacidade desta espécie de eliminar mais de 50% do etanol produzido para o meio (dados não mostram).

A hipótese proposta inicialmente por Davies-Roberts (KENNEDY *et al.*, 1992) que relaciona a produção de lactato com a diminuição do pH citoplasmático, conseqüentemente, levando à indução da atividade da ADH (álcool desidrogenase) e inibindo a ação da LDH (lactato desidrogenase), poderia explicar o rápido decréscimo nos níveis de lactato, após o pico observado com 72 horas de anoxia. A acidificação do citoplasma deve ter inibido a atividade da LDH e induzido a atividade da ADH com o conseqüente aumento nos níveis de etanol.

Estudando as respostas metabólicas do sistema radicular de plantas tolerantes à saturação hídrica do solo, McMANMON & CRAWFORD (1971) sugeriram que estas espécies, para evitar a produção de níveis tóxicos de lactato e etanol, utilizariam uma rota metabólica alternativa que resultaria no acúmulo de malato. Esta proposta foi duramente criticada por diversos autores (SMITH & Ap REES, 1979; Ap REES *et al.*, 1987), principalmente pelo fato da rota proposta não resultar em ganho líquido de ATP. Recentemente, JOLY (1994b) demonstrou que a Teoria Metabólica de McMANMON & CRAWFORD (1971) explica o acúmulo de malato em espécies nas quais há difusão de oxigênio da parte aérea para o sistema radicular. O metabolismo aeróbico mantido com este oxigênio difundido é o responsável pela produção do ATP, enquanto que a conversão de fosfoenolpiruvato em oxaloacetato e malato evita o acúmulo de piruvato devido à aceleração da glicólise e conseqüentemente o acúmulo de etanol e lactato.

No caso de *I. affinis*, entretanto, a concentração de malato observada na germinação das sementes, aparentemente, não está relacionada com o

metabolismo anaeróbico, como foi sugerido por estes autores. Pois, apesar de apresentar um acúmulo significativo deste metabólito nas primeiras 72 horas de anoxia há um rápido decréscimo nas 24 horas seguintes de tal forma que no final do tratamento os níveis de malato são iguais aos observados no controle (normoxia).

O acúmulo de malato nos tratamentos de normoxia e hipoxia (Figura 1.8) pode estar relacionado com um metabolismo caracterizado pela atividade simultânea da respiração aeróbica e algum grau de fermentação em partes do tecido (RICARD *et al.*, 1994) e o malato observado pode estar relacionado ao Ciclo de Krebs. Segundo estes autores a simultaneidade entre a respiração aeróbica e o metabolismo fermentativo ocorre um pouco antes da protrusão da radícula estando então relacionada com os estádios finais da germinação. Os resultados obtidos com a germinação das sementes de *I. affinis* corroboram esta hipótese.

Outros trabalhos evidenciaram o funcionamento de mitocôndrias em baixas concentrações de oxigênio (VARTAPETIAN, 1991) ou mesmo em completa anoxia (KENNEDY *et al.*, 1991). Estes autores descrevem que em plântulas de *Echinochloa phyllopogon* (Poaceae) crescidas em nitrogênio as mitocôndrias são muito distintas daquelas encontradas em plântulas cultivadas em condições de normoxia, o que sugere que estas organelas são funcionais mesmo na total ausência de oxigênio. FOX & KENNEDY (1991) demonstraram também que várias enzimas do ciclo de Krebs estão presentes em plântulas de *E. phyllopogon* cultivadas na ausência de oxigênio.

Por outro lado KEELEY (1979), trabalhando com diferentes populações de *Nyssa sylvatica* (Nyssaceae) ao longo de um gradiente de saturação hídrica do solo, demonstrou que, após um ano de alagamento, o sistema radicular da população que cresce na área pantanosa apresenta níveis de malato até três vezes superior ao observado na população de áreas bem drenadas. O autor sugere que o resultado indica haver uma diferenciação genética do metabolismo do sistema radicular, devido à pressão exercida pelo ambiente para um aumento na absorção de metais. Assim o malato poderia simplesmente estar atuando no balanceamento do desequilíbrio iônico das células das raízes.

Entretanto, seria muito difícil explicar a presença deste metabólito, uma vez que o malato pode ser encontrado como parte de muitas rotas metabólicas da planta (MARTINOIA & RENTSCH, 1994).

I.4 - Conclusão

As respostas obtidas no estudo do metabolismo respiratório das sementes de *I. affinis* durante a germinação indicam que esta espécie está altamente adaptada a germinar e/ou manter a viabilidade de suas sementes sob condições de baixa concentração de oxigênio. Entre os tratamentos de normoxia e hipoxia não há diferenças significativas nem no processo de germinação nem no padrão de produção de etanol, lactato e malato. A indução da via fermentativa ocorre apenas na completa ausência de oxigênio e, muito provavelmente, está associada à produção de energia necessária para manter a viabilidade da semente.

Capítulo II - Fisiologia da germinação e do metabolismo respiratório durante a germinação de sementes de *Inga fagifolia* (L.) Willd ex Benth. (Mimosaceae) submetidas à hipoxia e anoxia.

RESUMO – Os estudos sobre germinação de sementes de *Inga fagifolia* (L.) Willd ex Benth. sob condições de hipoxia e anoxia mostraram que as sementes desta espécie possuem uma rara tolerância à anoxia, pois após 20 dias nestas condições a germinação foi de 100%. Este resultado pode ser explicado pela altíssima produção de etanol e, conseqüentemente, de ATP na completa ausência de oxigênio o que poderia estar favorecendo a germinação.

II.1 - Objetivo

Considerando que *Inga fagifolia* ocorre ao longo de um gradiente de saturação hídrica do solo, o objetivo deste capítulo é compreender a fisiologia da germinação e as respostas do metabolismo respiratório de sementes submetidas à hipoxia e anoxia.

II.2 - Material e Métodos

IV.2.1 - Caracterização da Espécie

Inga fagifolia Will. ex Benth. é uma árvore de porte médio, glabra ou com ramos do pecíolo e da inflorescência com pelos curtos e pouco amarelado, com estípulas pequenas, muito caducas, raramente observadas, pecíolo de 1 a 1,5 polegada, cilíndrico, levemente canaliculado na face superior, marginado ou estreitamente alado, raramente largamente alado. Apresenta uma glândula pequena e escutelada, suas folhas são rígido-coriáceas de brilhante até opaca; bijugas, às vezes com folíolos peciolulados muito curtamente; as maiores com 3 a 4 polegadas de comprimento e 1,5 a 2 polegadas de largura; ápice breve acuminado a obtuso; base contráctil. Com a inflorescência (Figura II.1) na axila dos ramos em fascículos de 1,5 a 3 polegadas de comprimento. Mostrando flores sésseis, glabras, com brácteas curtas, lanceoladas ou setosas e muito caducas, com um cálice de 3/4 a 1 linha de comprimento, tubuloso, campanulado. A corola com cerca de 3 linhas de comprimento com 4 a 5 lobos, o tubo do estame quase duas vezes maior que a corola. A vagem (Figura II.2) é glabra, plana, com margens elevadas, engrossando quando madura, com 3 a 5 polegadas de comprimento e 3/4 de polegada de largura (BENTHAM 1876).

Segundo LÉON (1966) *apud* OLIVEIRA & BELTRATI (1994) *Inga fagifolia* é uma das espécies do gênero *Inga* com maior área de distribuição geográfica, estendendo-se desde Jalisco no México até o Sul do Brasil. Segundo Prance & Silva (1995) no Brasil é encontrada em toda a região extra-Amazônica, do Ceará até São Paulo, habitando matas mesófilas semidecíduas, matas ciliares e matas paludícolas. Relatos em sua recente revisão do gênero *Inga* Flávia Garcia (comunicação pessoal) mostra que na faixa litorânea da região Sudeste esta espécie ocorre tanto nas áreas sazonalmente alagadas das dunas como nas áreas quase que permanentemente inundadas das restingas, atingindo a floresta ombrófila densa.



Figura II.1- Aspecto da inflorescência de *Inga fagifolia* Willd no campus da UNICAMP.

Os frutos de *Inga fagifolia* foram coletados no campus da Universidade Estadual de Campinas de árvores oriundas de sementes providas das margens dos córregos canalizados da cidade de Santos.

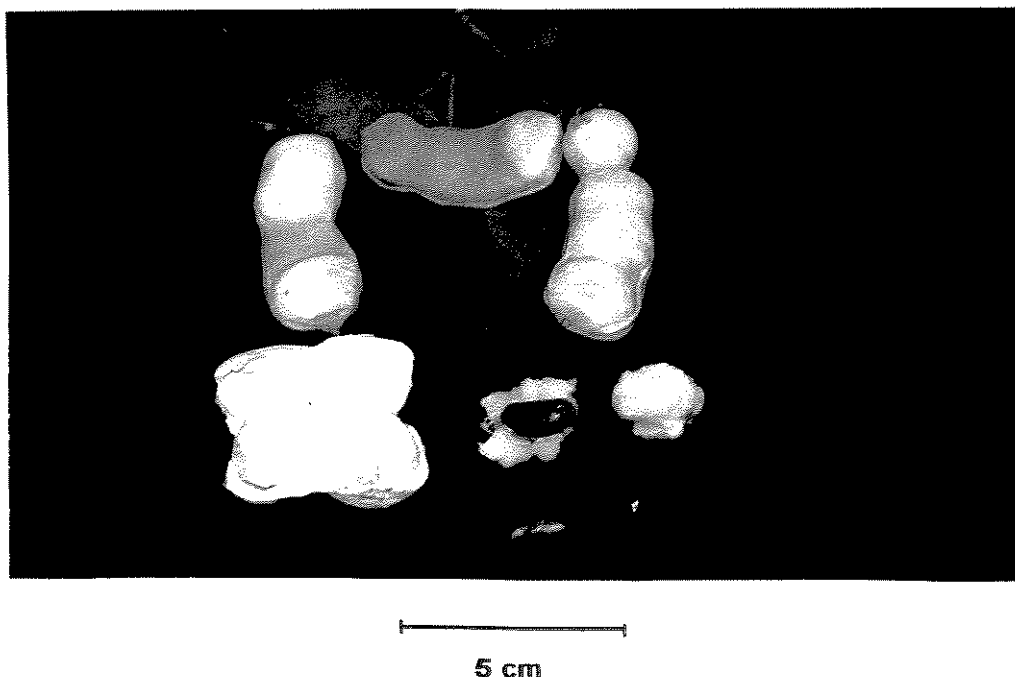


Figura II.2 - Detalhe do fruto de *Inga fagifolia* Willd evidenciando a sarcotesta e a semente.

II.2.2 - Metodologia

Os experimentos de germinação, a determinação dos metabólitos (etanol, lactato e malato) e as análises estatísticas foram conduzidos conforme a metodologia descrita no capítulo I, referente à ecofisiologia da germinação de *Inga affinis* DC.

II.3 - Resultados e discussão

Os estudos sobre o potencial germinativo das sementes de *I. fagifolia* (Figura II.3) mostraram que as sementes não são fotoblásticas e que a baixa disponibilidade e a ausência de oxigênio atrasam, significativamente, a germinação mas não afetam o percentual final, pois em todos os tratamentos obteve-se 100% de germinação.

Em anoxia (Figura II.3), embora os dados mostrados apresentem aumentos súbitos de germinação, em função das contagens terem sido feitas apenas nas datas de abertura das jarras (10, 15 e 20 dias em anoxia), observa-se um resultado surpreendente que é a obtenção de 100% de germinação em total falta de oxigênio (Figuras II.4 e II.5).

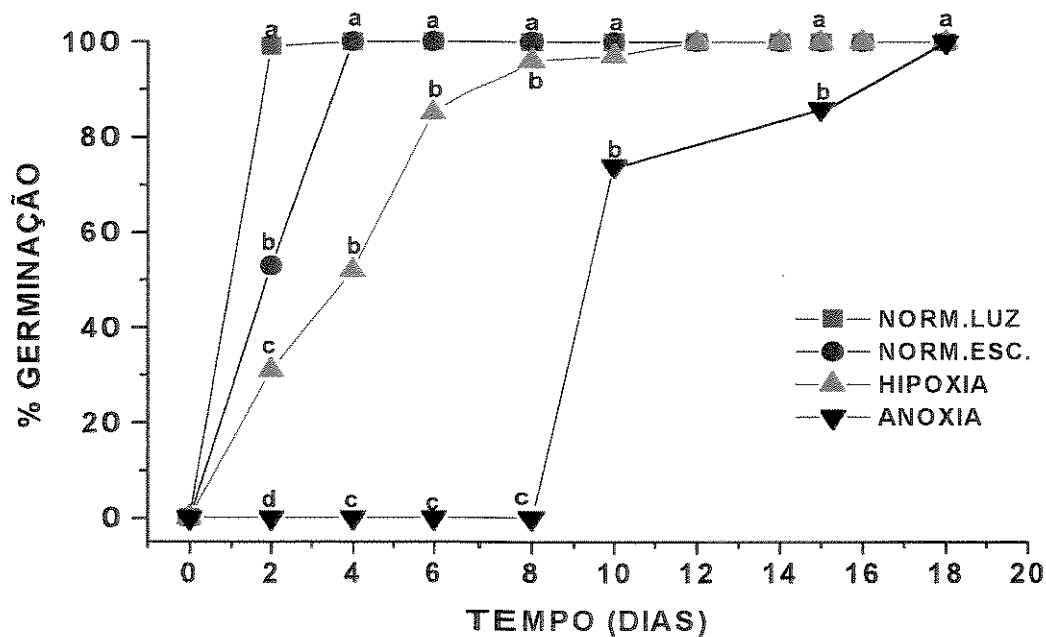


Figura II.3 - Potencial germinativo de sementes de *I. fagifolia* submetidas à normoxia na luz, normoxia no escuro, hipoxia e anoxia. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n=10$.



Figura II.4 - Aspecto de sementes de *I. fagifolia* sem a sarcotesta germinando no interior da Jarra anaeróbica, a seta indica a radícula protruída. (Foto E. L. Borba).



Figura II.5 - Aspecto de sementes de *Inga fagifolia* sem a sarcotesta germinadas nas jarras anaeróbicas imediatamente após a abertura das mesmas. (Foto E. L. Borba)

A manutenção da viabilidade das sementes armazenadas em água destilada e em baixa temperatura pode ser observada na Figura II.6.

Verifica-se que apenas após 30 dias de armazenagem ocorre um atraso e uma queda significativa, cerca de 50%, no potencial germinativo das sementes.

As respostas obtidas na germinação de sementes de *I. fagifolia* demonstram que esta é uma espécie cujas sementes estão, sem dúvida, altamente adaptadas à flutuações na disponibilidade de oxigênio no ambiente, germinando até mesmo na completa ausência de oxigênio.

A capacidade de germinar em condições hipóxicas é uma característica incomum para a maioria das espécies de plantas superiores, porém em total ausência de oxigênio, até hoje, somente 7 espécies são conhecidas na literatura: três espécies de Poaceae, arroz (*Oryza sativa*) (BERTANI *et al.*, 1980), *Echinochloa crus-galli* (recentemente colocada na sinonímia de *Echinochloa pillopogon*, KENNEDY *et al.*, 1983; KENNEDY *et al.*, 1992); três espécies de

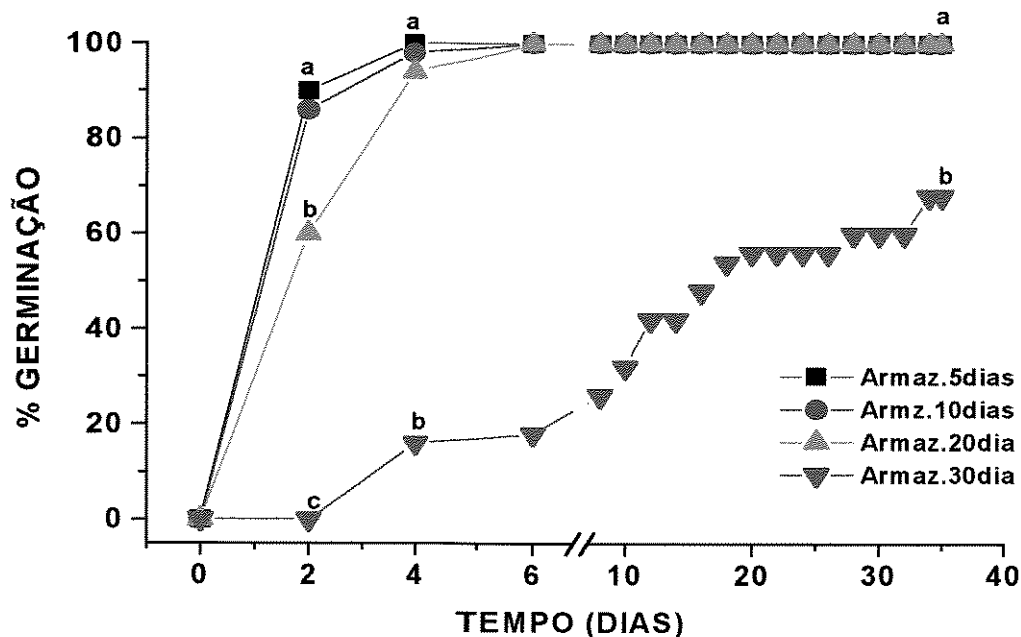


Figura II.6 - Porcentagem da germinação das sementes de *I. fagifolia* armazenadas por 5, 10, 20 e 30 dias em condições de baixa temperatura e em água destilada. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n=10$.

plantas aquáticas *Trapa natans* L. (Trapaceae), *Nuphar luteum* (Nymphaeaceae) *Scirpus mucronatus* L. (Cyperaceae) (MENEGUS *et al.*, 1992); e duas arbóreas *Erythrina caffra* (Fabaceae) (SMALL *et al.*, 1989), cuja capacidade de germinar sob anoxia parece estar associada à utilização, pelo embrião, de oxigênio retido no interior da semente, e *Chorisia speciosa* (Bombacaceae) (JOLY & CRAWFORD, 1983).

A capacidade de sementes de *I. fagifolia* germinarem na total ausência de oxigênio contrasta com os resultados obtidos para outras espécies típicas de ambientes sujeitos à saturação hídrica do solo, que desenvolveram mecanismos para evitar até mesmo a situação de hipoxia, restrição já suficiente para inibir a germinação. É o caso de sementes de *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae) *Protium heptaphyllum* (Burseraceae), *Cariniana legalis* (Lecythidaceae) e *Pseudobombax grandiflorum* (Bombacaceae) (LOBO, 1998), espécies típicas das Matas Paludícolas do interior do estado de São Paulo, e *Tabebuia cassinoides* (Bignoniaceae) (KOLB, 1998), espécie típica das matas de restinga alagável do

litoral paulista.

Outros mecanismos como em sementes *Parkia pendula* (Mimosaceae) (SCARANO & CRAWFORD, 1992), que conseguem se manter viáveis por até 7 meses em submersão, *Talauma ovata* (Magnoliaceae) (LOBO & JOLY, 1996) que dispersam suas sementes durante a estação seca.

Aliada à capacidade de germinar na ausência completa de oxigênio, verificou-se também que as sementes de *I. fagifolia* toleram um período mais longo de armazenamento em água destilada à 5 °C, pois após 20 dias nestas condições ainda permaneciam 100% viáveis. Após 30 dias de armazenamento pelo menos 56% delas ainda estavam viáveis.

Estes resultados contrastam com o comportamento das sementes de *I. affinis* apresentado no capítulo anterior, pois as sementes daquela espécie não germinaram sob anoxia e após 20 dias de armazenamento em água destilada a baixa temperatura somente cerca de 30% das sementes continuavam viáveis. Portanto, as sementes de *I. fagifolia* apresentam uma maior tolerância em resposta às variações ambientais, explicando sua capacidade de explorar na plenitude o gradiente de saturação hídrica do solo que caracteriza as matas paludícolas, as matas ciliares e as matas mesófilas semidecíduas.

Em relação ao metabolismo respiratório durante a germinação das sementes de *I. fagifolia* podemos observar que o tratamento de hipoxia leva a um aumento, não significativo (Figura II.7), dos níveis de etanol nas primeiras 24 horas. Após este período a concentração de etanol manteve-se semelhante à observada em condições de normoxia.

Por outro lado, a completa ausência de oxigênio, induziu de forma significativa a via fermentativa alcoólica desde as primeiras 12 horas de tratamento (Figura II.7). Ao final do tratamento, 96 horas de incubação, o nível de etanol presente nestas sementes era cerca de 60 vezes superior ao observado nas sementes mantidas em pleno ar, normoxia, e às mantidas submersas, hipoxia.

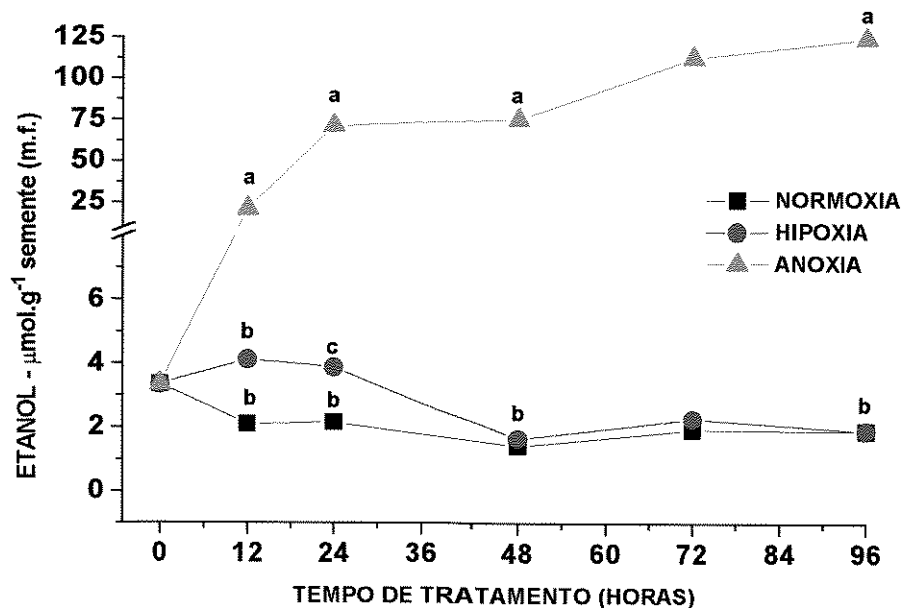


Figura II.7- Concentração de etanol, durante a germinação de sementes de *I. fagifolia* submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$) com $n=5$.

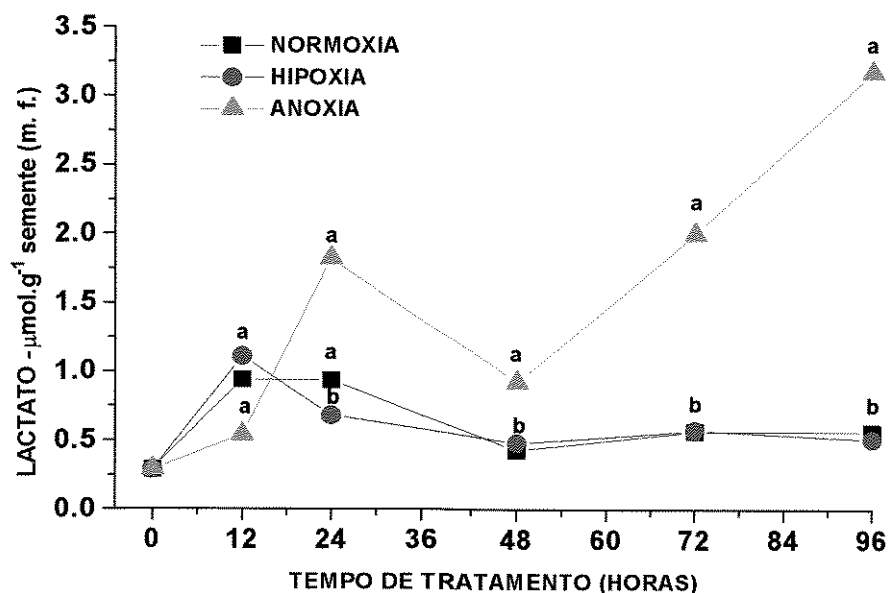


Figura II.8 - Concentração de lactato, durante a germinação de sementes de *I. fagifolia* submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$) com $n=5$.

Em 48 horas de germinação não foram observadas diferenças significativas, entre os tratamentos com relação à concentração de lactato (Figura II.8). A partir deste momento há uma evidente indução da via fermentativa láctica nas sementes mantidas na jarra anaeróbica. Ao final das 96 horas de tratamento a concentração de lactato nas sementes da jarra era cerca de 10 vezes superior à observada nos outros dois tratamentos (Figura II.8).

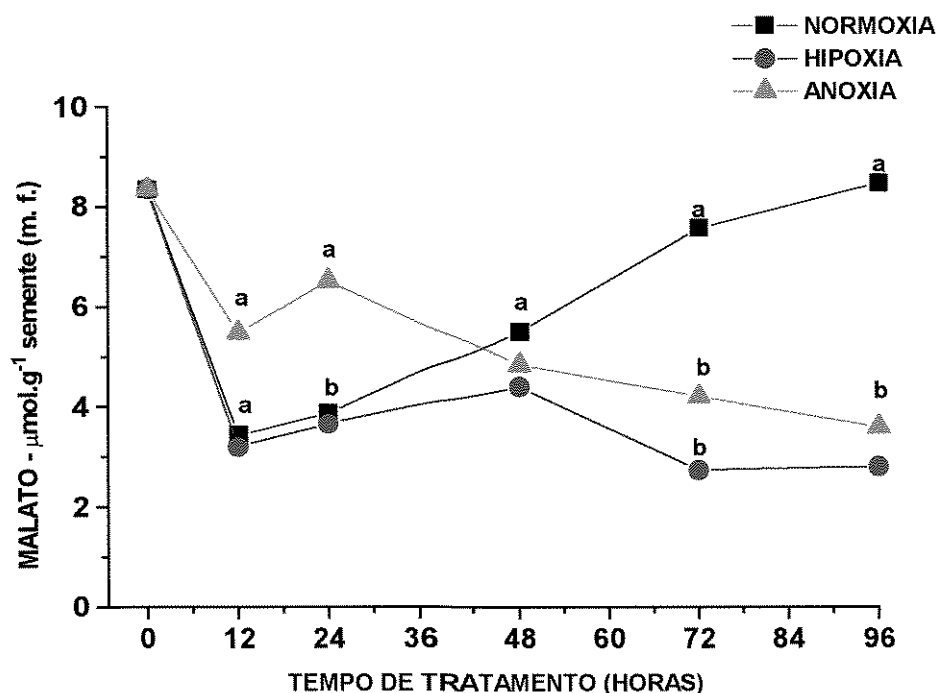


Figura II.9 - Concentração de malato durante a germinação de sementes de *I. fagifolia* submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n=5$.

Em todos os tratamentos houve uma significativa queda nos níveis de malato nas primeiras 12 horas do processo de germinação. Posteriormente, ao contrário do que se observou para etanol e lactato, o aumento significativo de malato ocorreu somente nas sementes mantidas sob normoxia (Figura II.9), de forma que após 96 horas a concentração de malato era semelhante ao nível basal encontrado no tempo 0.

Segundo RAYMOND *et al.* (1985), sob condições limitantes de oxigênio, a fermentação alcoólica é a mais importante. Esta via permite a reoxidação do NAD em plantas devido a glicólise contínua, e a produção de ATP. Durante a germinação de sementes de *I. fagifolia*, a alta concentração de etanol em

condições de anoxia indica uma forte indução da ativação da via fermentativa alcoólica.

Na germinação de *I. fagifolia*, em condições de baixa disponibilidade de oxigênio (hipoxia), os níveis de etanol permaneceram semelhantes ao encontrado em sementes germinando em condições normais de oxigênio (normoxia), sugerindo que não houve uma ativação da via fermentativa como um mecanismo indispensável para a manutenção do potencial germinativo. Resultado semelhante foi observado no capítulo anterior para a germinação de semente de *I. affinis* (Capítulo I) e se deve, possivelmente, ao fato de que, mesmo em pleno ar, partes do tecido das sementes não têm oxigênio suficiente para manter um metabolismo totalmente aeróbico.

Sementes de *I. affinis* foram classificadas como altamente tolerantes à baixa disponibilidade de oxigênio do ambiente devido à ativação da via fermentativa alcoólica somente em condições de anoxia (Capítulo I), o mesmo ocorre com sementes de *I. fagifolia*, contudo, sementes desta espécie produziram quantidades muito elevadas de etanol ($125 \mu\text{mol. g}^{-1}$ semente m.f.), em 96 horas de tratamento, mais que o dobro do que foi encontrado para *I. affinis* ($53,6 \mu\text{mol. g}^{-1}$ semente m.f), além disso, sementes de *I. fagifolia* germinam em condições anóxicas.

A capacidade de germinar em anoxia pode ser explicada pela alta produção de etanol, pois segundo RAYMOND *et al.* (1985), o balanço da carga energética da via fermentativa é de 1 ATP por etanol ou lactato produzido.

Mesmo no caso de *Erythrina caffra* (Fabaceae) (SMALL *et al.*, 1989) que também conseguem germinar em condições de anoxia, não foi verificada esta alta concentração de etanol, atingindo um máximo de $76 \mu\text{mol. g}^{-1}$ semente. aproximadamente em 72 horas de tratamento.

Com relação à produção de lactato durante a germinação de sementes de *I. fagifolia* verifica-se que esta via é ativada somente em anoxia, como para o etanol, reforçando mais ainda a observação de que a ativação da via fermentativa ocorre somente em anoxia.

A produção de lactato, segundo a teoria de Davies & Roberts (KENNEDY *et al.*, 1992), sugere que este metabólito estaria intimamente relacionado com a acidose citoplasmática e a uma consequente ativação da enzima ADH (álcool

desidrogenase) e a inibição da enzima LDH (lactato desidrogenase), porém esta ativação/inibição não foi constatada para sementes de *I. fagifolia*, pois a medida em que aumentava a concentração de lactato, o acúmulo de etanol ocorria concomitantemente.

Esta resposta difere da encontrada para *I. affinis* concordando com o que foi dito por CRAWFORD & BRÄNDLE (1996) que concluem que na ocupação de habitats com baixa disponibilidade de oxigênio as plantas desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, uma ampla gama de estratégias. Invariavelmente a resposta observada depende não só da espécie mas também da intensidade e da duração do estresse.

A concentração de malato durante a germinação de sementes de *I. fagifolia* não foi significativa em condições de hipoxia e nem anoxia, somente em normoxia observou-se um ligeiro aumento ao final do tratamento sugerindo que este acúmulo poderia estar relacionada com a respiração fazendo parte do Ciclo de Krebs.

II.4 - Conclusão

O padrão de resposta encontrado para a germinação de sementes de *I. fagifolia* mostra a rara capacidade de germinação na total ausência de oxigênio sendo, portanto, uma espécie com alto grau de adaptabilidade em ambientes hipóxicos e/ou anóxicos. Não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos de hipoxia e normoxia com relação a produção de etanol e lactato. A ativação das vias fermentativas alcoólicas e lácticas ocorreram somente em condições anóxicas, estando provavelmente associadas à produção de energia para desencadear a germinação em anoxia.

Observa-se também que os padrões obtidos para a germinação de sementes de *Inga fagifolia* difere dos padrões observados em *Inga affinis* mostrando assim, que o grau de tolerância, os mecanismos adaptativos estão intimamente relacionados com as pressões do ambiente.

CAPÍTULO III - Fisiologia da germinação e do metabolismo respiratório durante a germinação de sementes de *Inga luschnathiana* Benth. (Mimosaceae) submetidas à hipoxia e anoxia

Resumo: O estudo da germinação de sementes de *Inga luschnathiana* Benth. sob condições de hipoxia e anoxia mostrou que esta espécie, como outras do mesmo gênero, possuem mecanismos adaptativos que permitem a sua sobrevivência em ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio. As sementes não são fotoblásticas e possuem um alto potencial germinativo quando em hipoxia (96%), em anoxia a germinação é inibida. A utilização da via fermentativa foi caracterizada pela presença do etanol e lactato, sendo significativo quando em anoxia de ambos os metabólitos. Foi verificada também a presença de malato, porém provavelmente sem alguma relação com a falta de oxigênio.

III.1 - Objetivo

Este trabalho teve como objetivo verificar as respostas referente ao potencial germinativo e o metabolismo respiratório durante a germinação de sementes de *Inga luschnathiana* de um ambiente de mata paludícola, portanto um local sujeito a saturação hídrica do solo quase que permanentemente, visando elucidar os mecanismos adaptativos presentes nesta espécie.

III.2 - Material e métodos

III.2.1 - Caracterização da espécie

Inga luschnathiana Bentham é uma árvore comumente com 10 -12m de altura podendo raramente chegar até 18- 20 m, com diâmetro de 20 a 30 cm na altura do peito, ferrugínea, tomentosa ou pubescente, folhas de 4-5 jugas, pecíolo curto pubescente não alado, ráquis aladas, asas largas, glândulas pequenas, pouco elevadas. Folíolos obovados a ovado acuminado, cartáceos, discolores até 12- 14 por 5- 6 cm de comprimento e largura, os apicais maiores que os basais. Espigas axilares curtas aglomeradas nos ápices dos ramos, flores subsésseis, seríceo- encrespado- vilosas, cálice de 5- 7 mm, corola tubulosa de 15- 20 mm de comprimento, estames 3,5- 4 cm de comprimento, seu tubo incluso, brácteas curtas, ovais caducas. Vagem (Figura III.1) ferrugínea-afelpada, oblonga- falcada, de 7- 15 cm de comprimento por 1,5- 2 cm de largura e 1,3 de grossura, obtusa,

de margens largas, 8mm, planas, pouco ou nada sulcadas, faces lisas, larga entre as margens proeminentes mais ou menos 1- 1,5 cm (BURKART, 1979).

Espécie típica das matas paludícolas do interior do estado de São Paulo, portanto, altamente tolerante à saturação hídrica do solo decorrente do afloramento do lençol freático.

Os frutos de *I. luschnathiana* foram coletados em um do fragmento de Mata Paludícola anexo à Reserva Municipal Mata Santa Genebra no município de Campinas/SP.

III.2.2 - Metodologia

Estudos sobre o potencial germinativo e determinação de metabólitos (etanol, malato e lactato) e as análises estatísticas foram efetuadas conforme descrito no capítulo I.

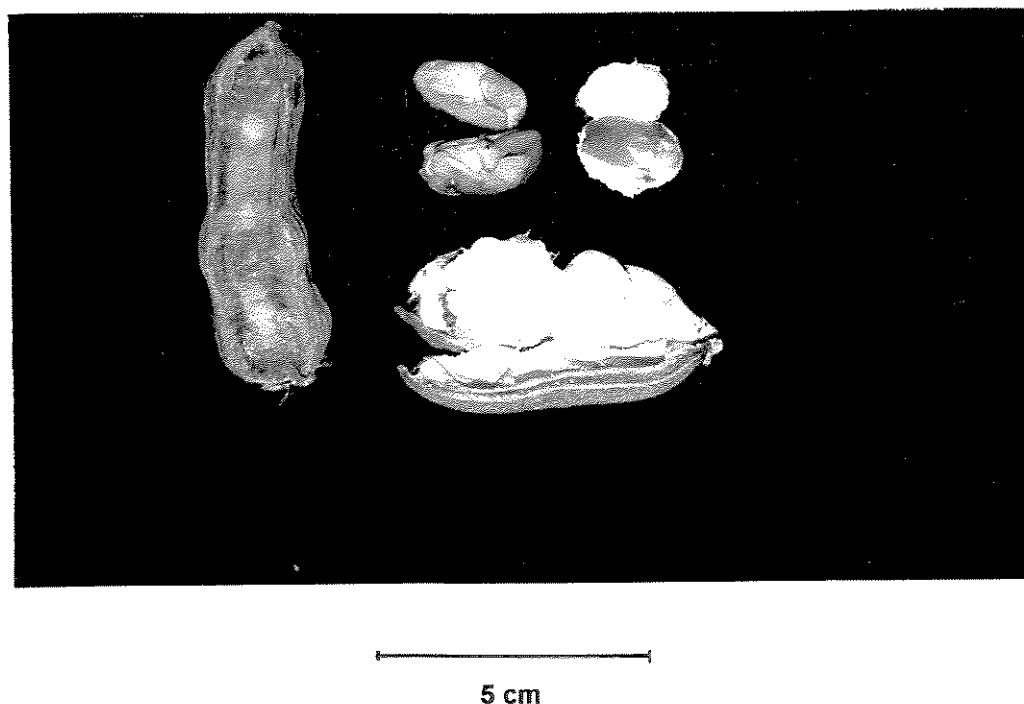


Figura III.1 - Detalhe do frutos de *Inga luschnathiana* evidenciando a sarcotesta e a semente.

III.3 - Resultados e discussão

Com relação ao potencial germinativo de sementes de *Inga luschnathiana* observa-se na Figura III.2 que em condições de normoxia na luz e no escuro ocorreu 100% de germinação.

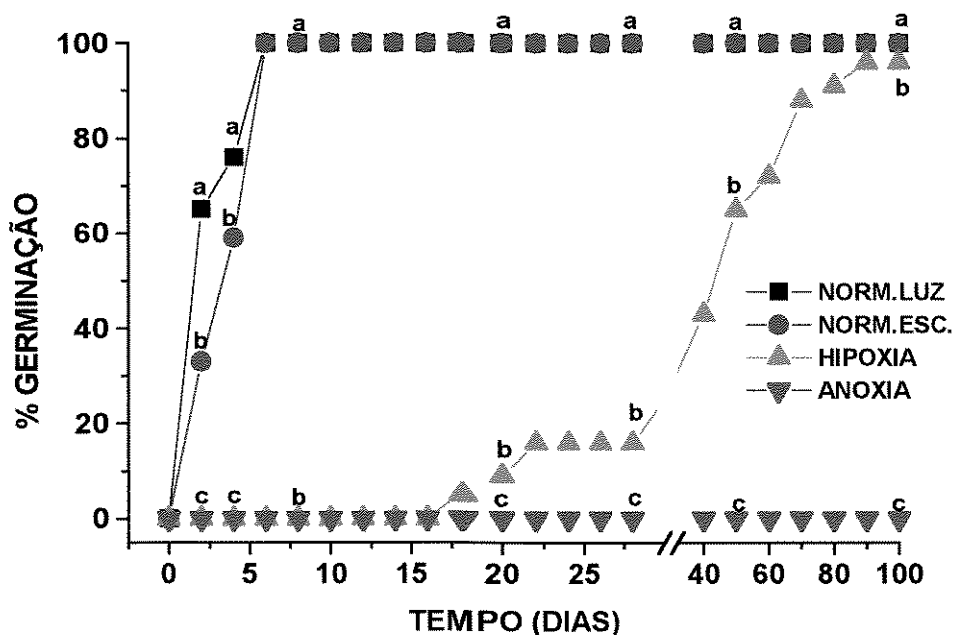


Figura III.2 - Potencial germinativo de sementes de *I. luschnathiana* submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n=10$.

Embora a germinação tenha sofrido um atraso para o seu início quando comparadas às sementes não armazenadas (Figs. III.2 e III.3), verifica-se que nos tratamentos de 5, 10 e 20 dias não ocorreu uma grande variação no percentual final. Já em sementes armazenadas por 30 dias, observa-se que o potencial germinativo destas foi significativamente afetado (Figura III.3).

Sementes de *Inga luschnathiana* não são fotoblásticas e apresentam um alto potencial germinativo.

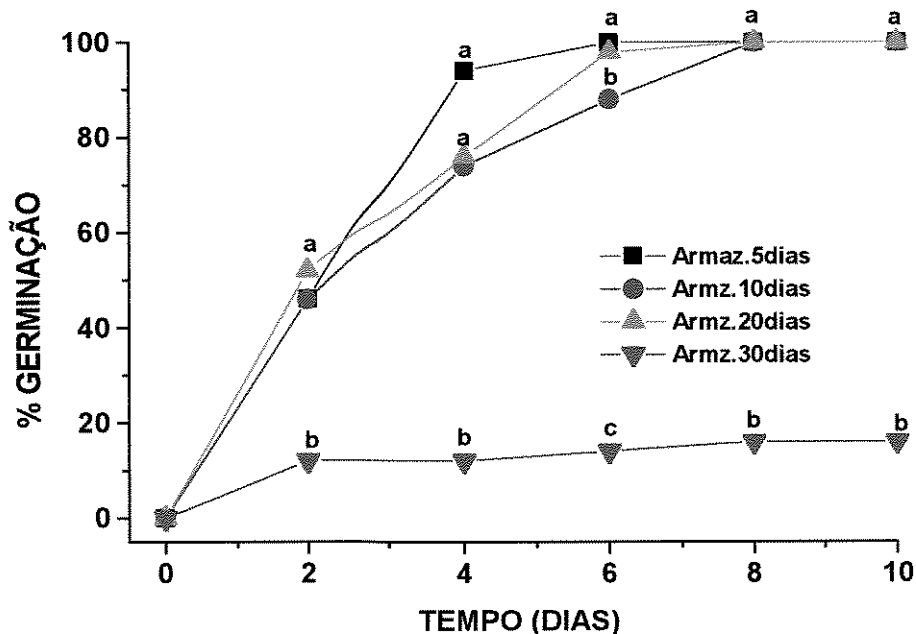


Figura III.3 - Porcentagem da germinação das sementes de *I. luschnathiana* armazenadas por 5, 10, 20 e 30 dias em condições de baixa temperatura e em água. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n=10$.

Em hipoxia o alto percentual germinativo (96%) também foi verificado para outras espécies deste mesmo gênero como *Inga affinis* e *Inga fagifolia*, Capítulos I e II respectivamente. Além desta espécie pode ser destacada também sementes de *Sesbania virgata* (Fabaceae) (OKAMOTO, 1995).

Estudos recentes de BENVENUTTI & MACCHIA (1995) com sementes de *Datura stramonium* (Solanaceae) verificaram que a baixa disponibilidade de oxigênio (hipoxia) diminuía a capacidade e a taxa germinativa e a anoxia induzia as sementes a uma dormência secundária. Outros autores como WESSOM & WAREING (1969) demonstraram haver algum gás inibitório resultante do metabolismo fermentativo inibindo a germinação. Mais tarde, HOLM (1972) identificou vários produtos da fermentação como o acetaldeído, acetona e etanol como principais causas da dormência.

A resposta encontrada para as sementes de *I. luschnathiana* em hipoxia, onde ocorreu um intervalo de aproximadamente 75 dias a partir do décimo sexto dia para que a germinação máxima fosse atingida, provavelmente possa ser um resultado da dormência adquirida (secundária) devido a baixa disponibilidade de

oxigênio, pois segundo TOOLE (1942 *apud* BENVENUTTI & MACCHIA, 1995), uma das estratégias de sobrevivência das espécies consiste na formação de um banco de sementes que se baseia na dormência e longevidade das sementes. Ou ainda poderia ser somente uma alteração no quadro metabólico reduzindo-o drasticamente

A ausência de oxigênio inibiu completamente a germinação das sementes de *I. luschnathiana*, como já havia sido observado para sementes de *I. affinis* (Cap. I).

A Figura III.4 mostra que durante a germinação de sementes de *I. luschnathiana* em condições de normoxia e hipoxia, o metabolismo fermentativo não foi efetivamente induzido tendo em vista as baixas concentrações de etanol produzido, não havendo diferença significativa entre ambos os tratamentos.

No tratamento de anoxia as concentrações de etanol aumentaram gradativamente, sendo este, um aumento significativo, chegando a um máximo de aproximadamente 39 μmol por grama de semente (m.f.) ao final dos tratamento, caracterizando então, a indução da fermentação alcoólica

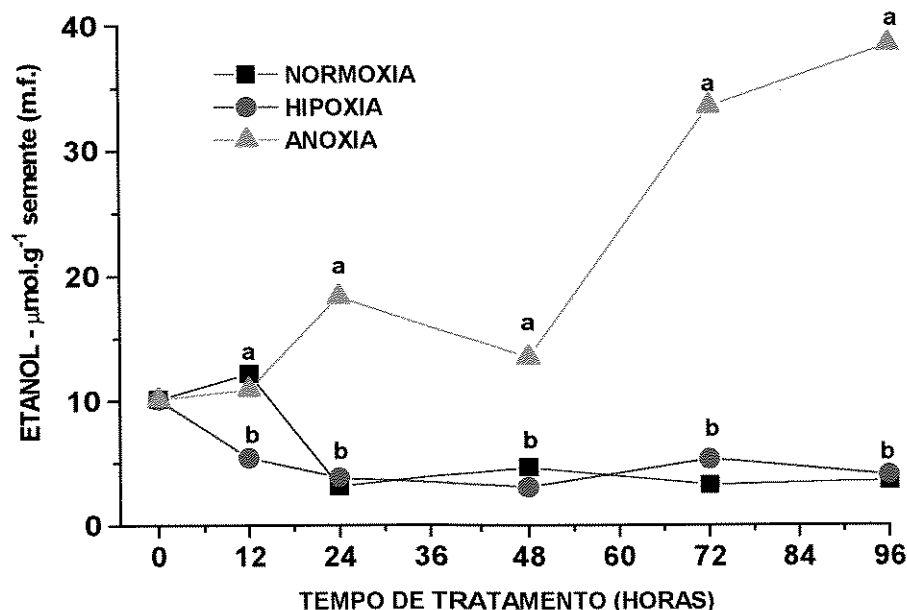


Figura III.4 - Concentração de etanol, durante a germinação de sementes de *I. luschnathiana* submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n=5$.

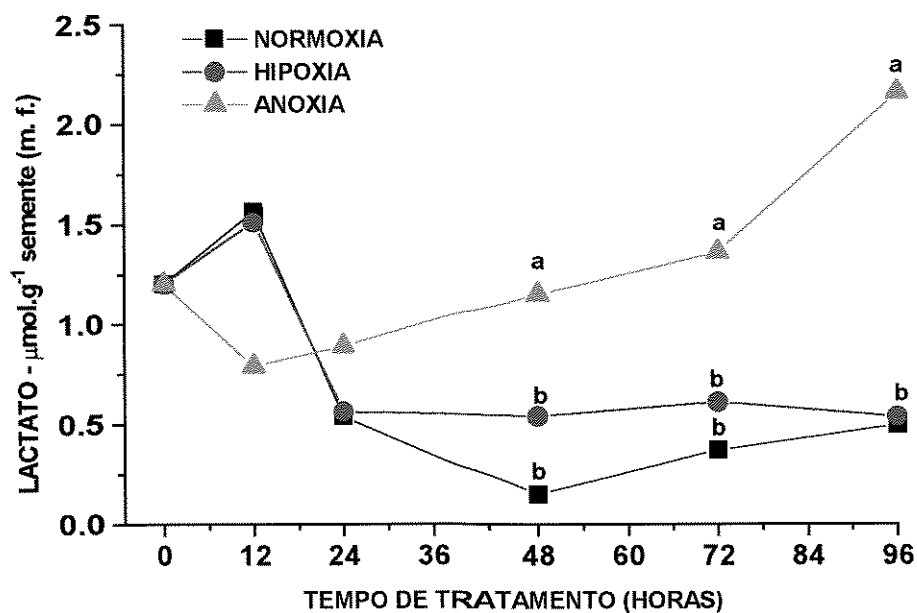


Figura III.5- Concentração de lactato, durante a germinação de sementes de *I. luschnathiana* submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n=5$.

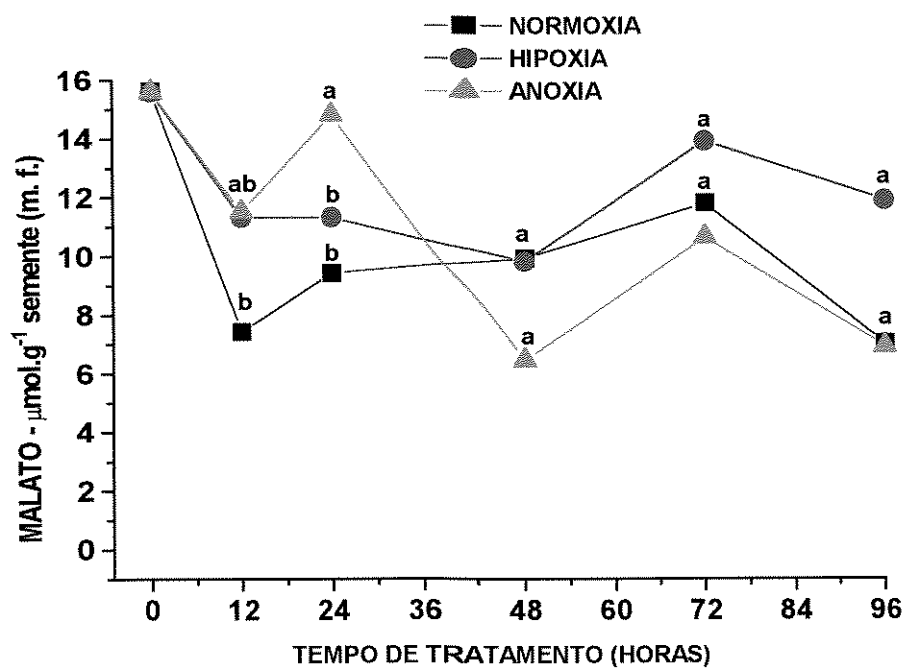


Figura III.6 - Concentração de malato, durante a germinação de sementes de *I. luschnathiana* submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n=5$.

A presença do lactato foi verificada em todos os tratamentos (Fig. III.5), porém em normoxia e hipoxia, a concentração deste metabólito foi insignificante, o que sugere uma fermentação láctica basal.

A produção de malato durante a germinação de sementes de *I. luschnathiana* foi a mesma para os tratamentos de normoxia, hipoxia e anoxia, não havendo diferenças significativas entre eles (Figura III.6).

A semelhança nos níveis de etanol e lactato encontrados em sementes em condições aeradas (normoxia) e em baixa concentração de oxigênio (hipoxia) demonstra que esta espécie é altamente adaptada a um ambiente onde o estresse pela baixa disponibilidade de oxigênio é comum.

Os níveis de etanol encontrados durante a germinação em normoxia e hipoxia pode significar que parte de algum tecido esteja em condições de hipoxia ou anoxia, sendo então considerado como resultado da produção basal de etanol.

Em anoxia, sementes desta espécie respondem a essa condição com o funcionamento do metabolismo fermentativo tanto alcoólico quanto láctico.

Vários autores têm encontrado a via fermentativa alcoólica como sendo a principal responsável pela produção de energia durante a hipoxia ou anoxia em espécies tolerantes, por exemplo RUMPHO & KENNEDY (1981) em *Oryza sativa*, SMALL *et al.* (1989) em *Erythrina caffra*, OKAMOTO (1995) em *Sesbania virgata*; e mesmo em espécies consideradas não tolerantes ao alagamento, como JOLY & CRAWFORD (1983) em *Chorisia speciosa*, RAYMOND *et al.*, (1985) em milho, soja e ervilha e WATERS *et al.*, (1991) em trigo (*Triticum aestivum*).

O aumento significativo da concentração de lactato somente em condições de anoxia a partir de 48 horas até ao final do tratamento, difere daquele que foi observado para a germinação de sementes de *I. affinis* que sofre um decréscimo. Este padrão não obedece ao que foi descrito por KENNEDY *et al.*, (1992) onde descreve a teoria de Davies-Roberts que relaciona a concentração de lactato com o aumento do pH citoplasmático o qual induz a atividade da ADH (álcool desidrogenase) e inibe a atividade da LDH (lactato desidrogenase).

Aqui, a crescente produção de lactato atua concomitantemente à crescente produção de etanol, não se observando qualquer resposta inversamente proporcional (Figuras III.3 e III.4).

A produção de malato nesta espécie não demonstrou haver correlação alguma com a baixa ou a falta de oxigênio. Em condições de normoxia, hipoxia e anoxia observou-se praticamente a mesma concentração deste metabólito, caracterizando provavelmente o que foi descrito por RICARD *et al.*, (1994) onde afirmam que mesmo em baixas concentrações de oxigênio, ainda se pode constatar uma atividade simultânea da respiração aeróbica, onde o malato faz parte desse Ciclo de Krebs.

III.4 - Conclusão

As respostas observadas durante a germinação hipóxica e anóxica de sementes de *I. luschnathiana* demonstram a existência de grandes variabilidades no metabolismo das plantas. As interpretações desses resultados demonstram a necessidade de maiores estudos levando em consideração todas as pressões impostas pelo ambiente.

Neste estudo preliminar podemos apenas concluir que esta espécie é altamente tolerante à baixa disponibilidade de oxigênio e possui mecanismos, como a ativação da via fermentativa e a possibilidade de manter sua viabilidade durante algum tempo através da formação de um banco de sementes com uma provável dormência secundária, que permitem a sobrevivência da espécie neste ambiente hipóxico.

CAPÍTULO IV - Fisiologia da germinação e do metabolismo respiratório durante a germinação de sementes de *Inga sessilis* (Vell.) Mart. (Mimosaceae) submetidas à hipoxia e anoxia.

Resumo: Os estudos referentes a germinação de sementes de *Inga sessilis* (Vell.) Mart. mostraram que, sementes dessa espécie são capazes de germinar em condições de baixa disponibilidade de oxigênio (hipoxia), entretanto, nestas condições o potencial germinativo é grandemente afetado, atingindo somente 40% de germinação. Em condições de anoxia, a germinação foi inibida. A produção de etanol foi verificada, assim como também lactato e malato.

IV.1 - Objetivos

Este trabalho teve como objetivo verificar as respostas relacionadas ao potencial germinativo e ao metabolismo respiratório durante a germinação de sementes de *Inga sessilis*, visando elucidar os mecanismos adaptativos desta espécie que permitem sua sobrevivência em um ambiente de mata mesófila semidecídua. Ambiente este, diferenciado das demais espécies de seu gênero.

IV.2 - Material e métodos

IV.2.1 - Caracterização da Espécie

Inga sessilis (Vell.) Mart., segundo BURKART (1979), é uma árvore de 12 a 20 m de altura, com um caule curtamente rufo-pubescente que chega a ter entre 20 a 40 cm de diâmetro na altura do peito. Folhas amplas (até 30 cm de comprimento), 5 -7 jugas, pecíolo e ráquis aladas, pecíolo de 1,5 a 2 cm de comprimento, glândulas raqueais proeminentes, frequentemente transversalmente alongadas. Folíolos ovais agudos com 6 a 12 cm de comprimento por 2,5 a 4 cm de largura. Racemos axilares pauci- 1-4-floros, 6-10 cm de comprimento. Flores para o gênero muito grandes e grossas, abrindo-se 1 por racemo, brancas, pediceladas, bronzeado velosas. Fruto (Figura IV.1) obscuro rubro-bronzeado afelpado-tomentoso, longo, encurvado, achatado em $\frac{1}{2}$ a 1 círculo completo, de 10 - 16 cm de comprimento por 2,5 cm de largura, mas obtusamente marginado faces transversalmente estriadas.

Espécie típica das matas mesófilas semidecíduas do interior do estado de São Paulo. Portanto, naturalmente, as sementes desta espécie não estão sujeitas a variações na disponibilidade de oxigênio para a germinação.

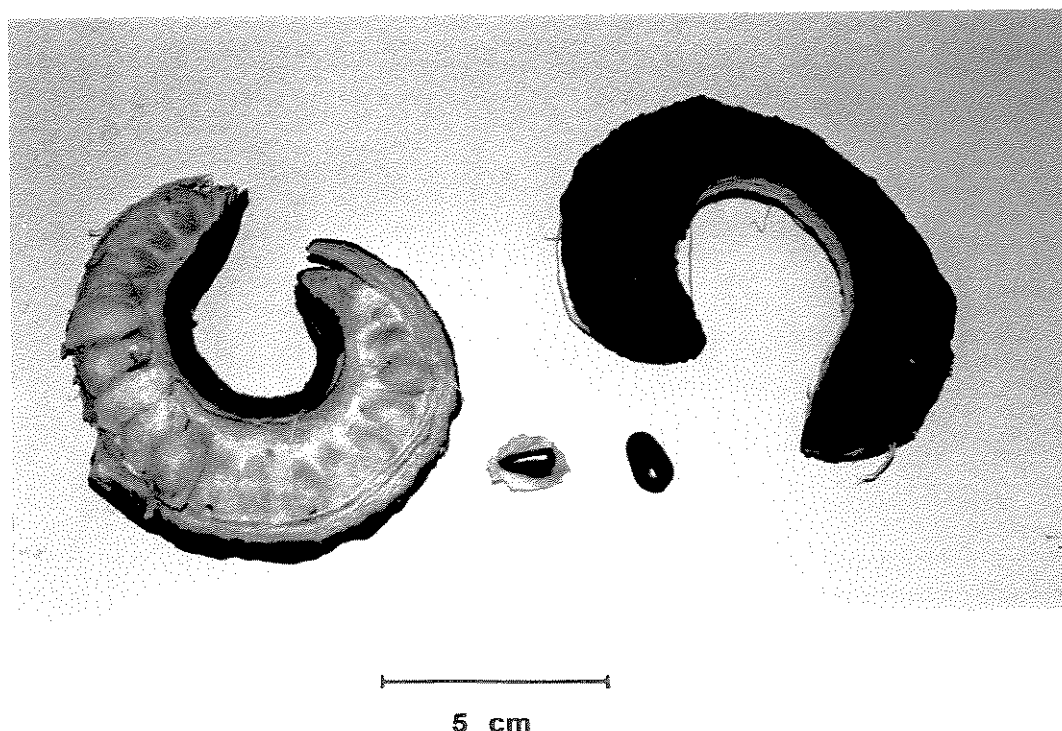


Figura IV.1 - Detalhe do fruto de *Inga sessilis* (Vel.) Mart. evidenciando sua robustez, a sarcotesta e a semente.

As sementes de *Inga sessilis* foram obtidas de frutos coletados na Reserva Municipal da Serra do Japi, município de Jundiaí/SP (Figura IV.2).

IV.2.2 - Metodologia

Estudos sobre o potencial germinativo e determinação de metabólitos (etanol, malato e lactato) e as análises estatísticas foram efetuadas conforme descritos no Capítulo I.



Figura IV.2- Aspecto do ambiente de *Inga sessilis* (Vell.) Mart. na Serra do Japi, município de Jundiaí-SP.

IV.3 - Resultados e discussão

Observa-se na Figura IV.3 que a baixa concentração de oxigênio afetou drasticamente o potencial germinativo das sementes de *I. sessilis*, tanto com relação à velocidade de germinação quanto ao início desta, assim como o percentual final. Com relação à presença ou ausência de luz, não houve alteração quanto à capacidade germinativa. A falta de luz causou apenas uma pequena diminuição na velocidade, sendo esta diferença significativa.

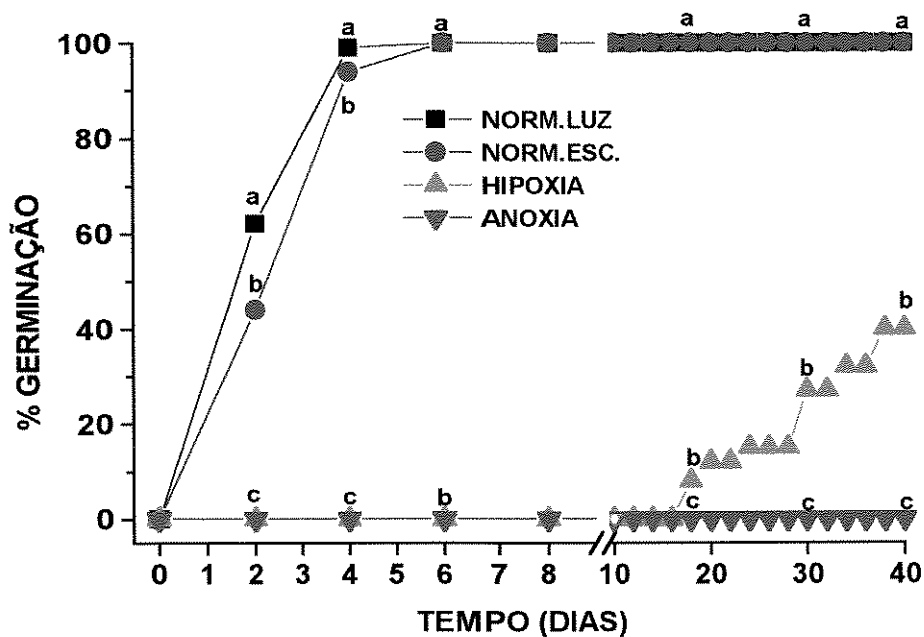


Figura IV.3 - Potencial germinativo de sementes de *I. sessilis* submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n=10$.

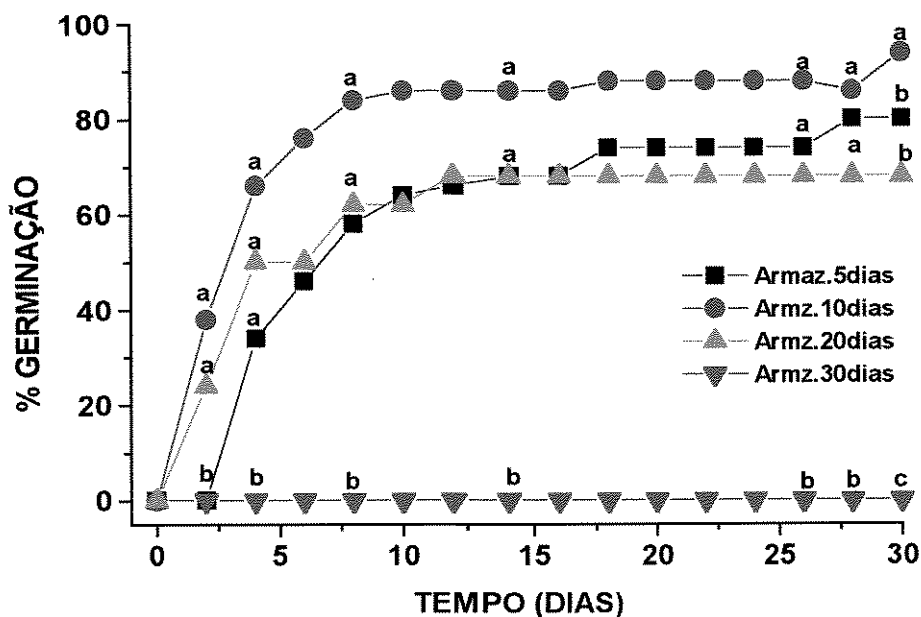


Figura IV.4 - Porcentagem da germinação das sementes de *I. sessilis* armazenadas por 5, 10, 20 e 30 dias em condições de baixa temperatura e em água. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n=10$.

De acordo com a Figura IV.4, a resposta encontrada referente aos testes de armazenamento mostrou que logo após 5 dias em água e baixa temperatura, as sementes de *I. sessilis* perdem aproximadamente 30% de sua capacidade germinativa e que em 30 dias as sementes perdem totalmente esta capacidade.

Verifica-se que nos tratamentos de 5, 10 e 20 dias não ocorre uma grande variação no percentual final (Figura IV.4). O percentual germinativo encontrado para as sementes armazenadas por 10 dias foi maior do que para as armazenadas por 5 dias, este comportamento também foi verificado para as sementes armazenadas de *I. affinis* onde sementes armazenadas por 30 dias apresentaram um maior poder germinativo do que as armazenadas por 20 dias.

O potencial germinativo das sementes de *Inga sessilis* em condições normais de oxigênio é alto, chegando a 100% em 4 dias na luz e 6 dias no escuro. Contudo, em condições de hipoxia, o potencial germinativo foi parcialmente inibido, chegando a um máximo de 40%.

Apesar do ambiente de *Inga sessilis* (mata mesófila semidecídua) não apresentar variações com relação à disponibilidade de oxigênio cerca de 40% das sementes mantêm a capacidade de germinar em condições hipóxicas sugerindo aqui, uma grande plasticidade.

Com relação ao armazenamento, esta espécie se mostrou pouco resistente pois após 30 dias nenhuma semente se manteve viável.

O padrão apresentado por esta espécie com relação à produção de etanol (Figura IV.5) mostra uma alta concentração inicial (tempo 0), após um súbito decréscimo em todos os tratamentos, porém após 24 horas ocorre a diferenciação das médias, ocorrendo um aumento significativo em condições de anoxia. Este aumento é mantido até 72 horas quando inicia-se um decréscimo.

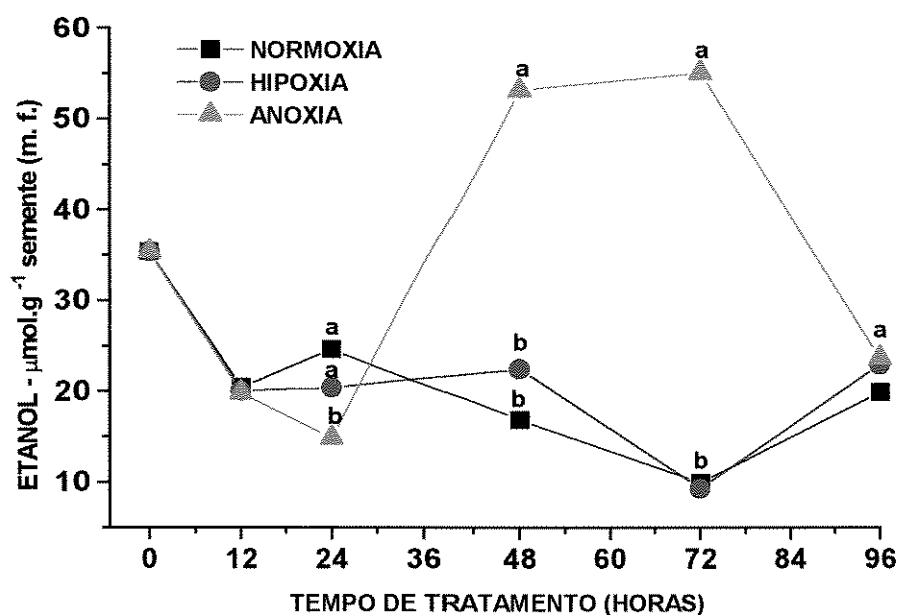


Figura IV.5 - Concentração de etanol durante a germinação de sementes de *I. sessilis* submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n=5$.

Em 96 horas a concentração de etanol se mostrou semelhante para todos os tratamentos (normoxia, hipoxia e anoxia), não demonstrando diferença significativa.

A concentração de lactato verificada na germinação das sementes de *I. sessilis* mostra claramente que é influenciada diretamente pela concentração de oxigênio (Figura IV.6). Quanto menor a concentração de oxigênio, maior foi a produção de lactato, sendo que em condições de hipoxia e anoxia, os valores se mostraram elevados, porém a diferença entre eles foi significativa. Em condições de normoxia, a produção de lactato se manteve quase que constante desde o início ao final do tratamento.

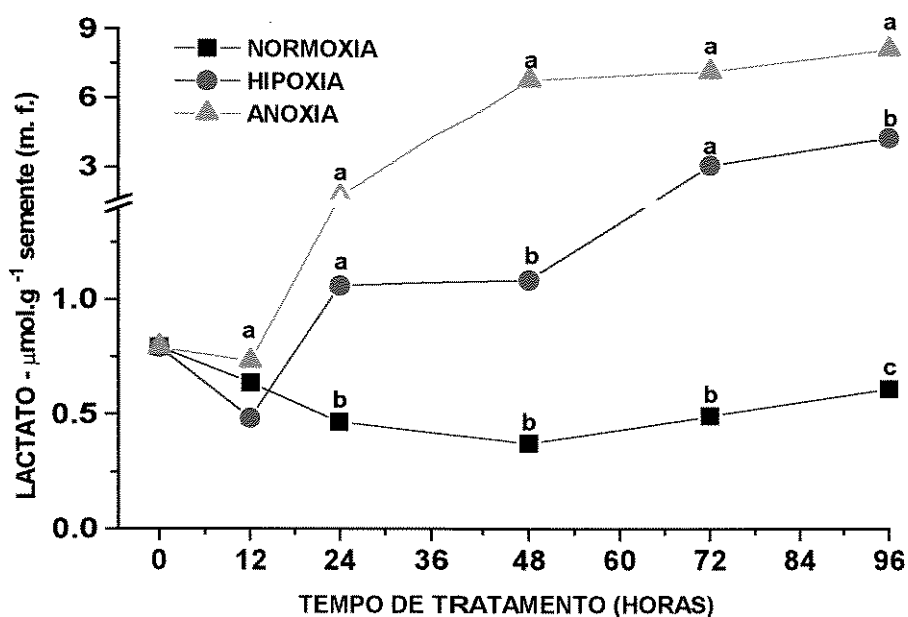


Figura IV.6 - Concentração de lactato durante a germinação de sementes de *I. sessilis* submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n=5$.

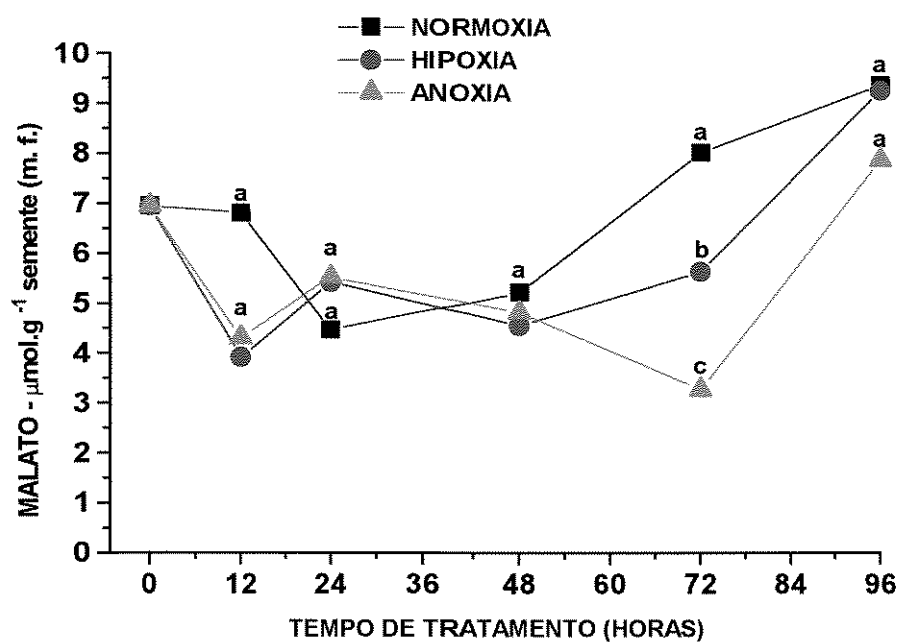


Figura IV.7 - Concentração de malato durante a germinação de sementes de *I. sessilis* submetidas à normoxia, hipoxia e anoxia. Médias em colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) com $n=5$.

A produção de malato é mostrada na Figura IV.7, onde pode ser verificada a produção deste metabólito em todos os tratamentos. Sua produção aparentemente possui uma resposta semelhante entre todos os tratamentos no decorrer do tempo, não havendo diferença significativa.

Com relação à alta concentração de etanol observada no tempo inicial podemos supor, embora a medida da concentração de oxigênio no interior do fruto não tenha sido efetuada, que seja devido à característica de seu fruto, isto é, o fruto de *Inga sessilis* possui uma casca grossa, muito fibrosa (Figura IV.1), dificultando a troca de gases com o meio, caracterizando uma atmosfera quase que anóxia. Uma vez que sementes desta espécie são vivíparas, provavelmente a via fermentativa já estaria ativada.

A diminuição da concentração de etanol observada após 72 horas em anoxia provavelmente seja um reflexo da perda da viabilidade das sementes após este período na ausência de oxigênio (dados não mostram).

O aumento linear da concentração de lactato aliado ao fato das sementes perderem a viabilidade após algum tempo na ausência de oxigênio, corrobora o que foi evidenciado no trabalho de ROBERTS *et al.*, (1985) que afirma que espécies capazes de controlar (tolerar ou regular) o pH citoplasmático são mais tolerantes ao alagamento que as espécies que não possuem esta capacidade.

A produção de malato nesta espécie, não pode ser associada com a baixa concentração ou mesmo na falta de oxigênio, pois as concentrações entre os três tratamentos foram semelhantes durante todos os tempos.

IV.4 - Conclusão

Podemos observar através do comportamento do potencial germinativo e pelo metabolismo respiratório desta espécie, que esta não é uma espécie altamente tolerante, porém apresenta algumas características de uma espécie tolerante, embora seu ambiente não exija.

Estas respostas podem ser avaliadas de duas formas, a primeira seria um possível mecanismo adquirido que poderá permitir sua ocupação em áreas saturadas hidricamente, ou a segunda seria que a capacidade de germinar em um ambiente onde a saturação hídrica do solo raramente ocorra seja um mecanismo que tenha sido conservado, mas que neste ambiente não existe a

necessidade de ser manifestado.

Somente através de estudos filogenéticos muitos dos aspectos levantados neste trabalho, como a questão da hipótese de que poderia haver uma conservação de características ancestrais ou uma aquisição de um caráter derivado, poderão ser elucidados.

Capítulo V – Estudo comparativo dos aspectos ecofisiológicos do metabolismo respiratório durante a germinação sob anoxia e da viabilidade pós-anoxia de sementes de quatro espécies de *Inga*.

Resumo - No estudo comparativo das estratégias desenvolvidas pelas sementes de *Inga affinis*, *Inga fagifolia*, *Inga luschnathiana* e *Inga sessilis* para tolerar distintos graus de saturação hídrica do solo, foi constatada uma diferença significativa com relação a germinação, metabolismo respiratório e grau de tolerância a anoxia. As características adaptativas específicas de cada espécie estão diretamente correlacionadas com o ambiente típico de cada uma, sugerindo que ao longo do processo evolutivo estas espécies sofreram pressões seletivas distintas. A busca de uma melhor compreensão sobre as diferenças incluiu a contagem cromossômica que mostrou que *Inga fagifolia* e *Inga luschnathiana* são poliplóides. Sendo a poliploidia, uma valorosa argumentação que auxiliou na compreensão dos vários resultados obtidos com relação a estas duas espécies.

V.1 - Introdução

Os efeitos da inundação na sobrevivência da semente e na germinação são raramente investigados. O avanço e o progresso no entendimento sobre a tolerância das sementes à inundação dependem de uma análise detalhada do ambiente, dos parâmetros fisiológicos e metabólicos do processo de germinação, bem como da análise das várias fases da história de vida da planta (ERNST, 1990).

Segundo CRAWFORD & BRÄNDLE (1996) as plantas desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, uma gama de mecanismos distintos que as habilita a sobreviver em habitats nos quais a disponibilidade de oxigênio no solo pode ser baixa, sazonal ou permanente.

Esta gama de respostas depende, muitas vezes, da intensidade e duração do estresse e inclui os mecanismos de dispersão (VAN DER PIJL, 1969), as características do banco de sementes e os mecanismos que garantem a emergência das plântulas (BLOM *et al.*, 1990), a capacidade de germinar na total ausência de oxigênio (RUMPHO & KENNEDY, 1980 e 1983; JOLY & CRAWFORD, 1983) e a capacidade de substituir o metabolismo aeróbico pela via fermentativa (CRAWFORD & BRÄNDLE, 1996) são importantes para o estabelecimento da espécie.

O grau de tolerância ao estresse anaeróbico varia amplamente (DOLFERUS *et al.*, 1997), tornando-se um importante fator ambiental que influencia a estrutura e a composição das comunidades bem como o crescimento das plantas (BLOM *et al.*, 1990).

As respostas metabólicas, fisiológicas, morfológicas e as consequências destas na biologia populacional diferem significativamente de um ambiente que sofre a saturação hídrica do solo para um ambiente no qual as plantas ficam totalmente submersas (BLOM *et al.*, 1990a). Considerando que em determinados ambientes, a duração e a amplitude do alagamento podem ser imprevisíveis, causando desde a submersão total de plântulas até a submersão total de árvores, como nas matas de igapó da região amazônica (JOLY, 1991), este é um fator determinante no processo de sucessão e estabelecimento de plantas nestas áreas (FENNER, 1987 *apud* BLOM, 1990a)

Segundo HIESEY & MILNER (1965), as várias raças ecológicas são resultantes da seleção natural decorrente de várias combinações de fatores ambientais e, destes fatores, o de maior importância seria a disponibilidade de água do ambiente. Portanto espécies que, como resultado do processo de seleção natural, ocupam habitats distintos, apresentam uma alta correlação entre o ambiente que ocupam hoje e as características genéticas, fisiológicas, morfológicas e de crescimento.

Na literatura são frequentes as sugestões de que a poliploidia é um dos caracteres que conferem uma grande tolerância aos rigores do ambiente, possibilitando a ampla distribuição geográfica e de tipo de ambiente ocupados por uma espécie (STEBBINS, 1950 *apud* MAUER *et al.*, 1978; LUMARET, *et al.*, 1987).

A poliploidia possui um importante papel na origem, evolução e manutenção da diversidade de uma população de plantas e tem sido reconhecida como componente integrante da dinâmica ecológica e evolutiva (THOMPSON & LUMARET, 1992).

Hábito, habitat e o sistema de reprodução parecem contribuir para a origem e sucesso dos poliplóides. Os poliplóides só serão bem sucedidos se forem capazes de competir com seus parentais e com outras taxa por um habitat. Nesta competição o componente principal é a capacidade desses indivíduos de

produzirem descendentes poliplóides e bem adaptados, garantido o estabelecimento e o sucesso das populações e/ou espécies poliplóides. Além disso, geralmente, os poliplóides não mostram diferenças consistentes de modelos de distribuição quando comparadas com seus parentes diplóides (THOMPSON & LUMARET, 1992).

As quatro espécies *I. affinis*, *I. fagifolia*, *I. luschnathiana* e *I. sessilis* estudadas neste trabalho habitam ambientes diferenciados com relação à saturação hídrica do solo. O gradiente se estende desde as matas mesófilas semidecíduas de altitude (solos rasos e bem drenados) às matas paludícolas (solos hidromórficos, hidricamente saturados quase o ano todo).

O objetivo deste capítulo é a verificação da possível relação entre as diferenças das respostas fisiológicas na germinação de sementes das quatro espécies de *Inga* (potencial germinativo e metabolismo respiratório) estudadas em capítulos anteriores, e as pressões seletivas de seus respectivos ambientes, aliada a contagem cromossômica para investigar a possível ocorrência de poliploidia dentre as espécies estudadas.

V.2 - Materiais e Métodos

A caracterização das espécies está, respectivamente, no Capítulo I (*Inga affinis*), Capítulo II (*Inga fagifolia*), Capítulo III (*Inga luschnathiana*) e Capítulo IV (*Inga sessilis*).

V.2.1 - Caracterização das áreas de coleta

***Inga affinis*:** os frutos desta espécie foram coletados nas manchas de matas ciliares do rio Jacaré-Pepira, município de Brotas/SP.

O rio Jacaré-Pepira é um afluente da margem direita do rio Tietê, com cerca de 194 km de extensão. Nasce na Serra de São Pedro, percorre 13 municípios e deságua na Represa de Ibitinga. Sua profundidade máxima é de 12 metros com uma largura que varia de 10 a 30 metros (LIEBERG, 1990).

As manchas de Mata Ciliar onde os frutos de *Inga affinis* foram coletados ficam no município de Brotas-SP e estão sujeitas a inundações periódicas no verão, época de chuvas e de frutificação de *Inga affinis*. As coletas foram efetuadas de barco ao longo de um trecho de cerca de 8 km onde diversos

indivíduos foram observados com suas ramagens voltadas para o rio de onde foram coletados.

Segundo SETZER (1986 *apud* AIDAR, 1992), o clima da região de Brotas é classificado como subtropical úmido, com estiagem de maio a outubro. Segundo AIDAR (1992) Brotas possui temperatura média anual de 20,9°C, média anual máxima de 23,6 °C e mínima de 16,9 °C. O verão é caracterizado pelas chuvas e pela extravasão dos rios, que podem atingir cerca de 1,20 metros acima do seu nível normal. Janeiro é o mês mais quente e chuvoso, com uma precipitação mensal da ordem de 320 mm (LIEBERG, 1990).

Inga fagifolia: os frutos desta espécie foram coletados de árvores cultivadas no campus da Universidade Estadual de Campinas oriundas de sementes de árvores que estão plantadas ao longo dos canais do município de Santos - SP.

Devido ao fato de serem árvores cultivadas, foi necessário realizar um levantamento sobre o ambiente de ocorrência natural desta espécie. Recente revisão do gênero *Inga* efetuada por FLÁVIA GARCIA (comunicação pessoal) mostra que na faixa litorânea da região Sudeste, esta espécie ocorre tanto nas áreas sazonalmente alagadas das dunas como nas áreas quase que permanentemente inundadas das restingas, atingindo a Floresta Ombrófila Densa. Sua ocorrência também foi registrada na Serra do Japi (LEITÃO FILHO, 1995) e nas matas mesófilas semidecíduas do interior do Estado de São Paulo (OLIVEIRA & BELTRATI, 1996).

Inga luschnathiana: os frutos desta espécie foram coletados em fragmento florestal de mata paludícola, ou conforme LEITÃO FILHO (1995), floresta semidecídua higrófila, da Reserva Municipal de Santa Genebra, município de Campinas/SP, distrito de Barão Geraldo. O fragmento florestal está localizado em uma baixada nos fundos do CEASA/Campinas às margens da Rodovia D. Pedro I, km 139.

Segundo LEITÃO FILHO (1995) este fragmento é constituído por uma vegetação predominantemente arbórea, com alta densidade de indivíduos sobre um solo saturado hidricamente que, em consequência do afloramento do lençol freático, apresenta frequentemente água superficial durante o ano todo. O solo é

classificado como hidromórfico e apresenta um microrrelevo irregular (TONIATO, 1996). Esporadicamente, nos longos períodos sem precipitação que podem ocorrer na região, o solo hidromórfico pode secar por completo por algumas semanas, impondo uma forte restrição hídrica à vegetação.

Fisionomicamente os estratos arbustivos e herbáceos são pouco densos, é baixa a ocorrência de epífitas e grande a abundância de lianas, principalmente nas bordas. As espécies arbóreas frequentemente apresentam enraizamento superficial. O clima da região de Campinas é tropical de altitude, com duas estações bem marcadas, inverno seco e verão quente e chuvoso. Temperatura média no mês mais frio (julho) é 18,2°C e do mês mais quente (fevereiro) é de 24,4°C. A maior precipitação ocorre no mês de janeiro, cerca de 240 mm e a menor no mês de julho, cerca de 37 mm, ocorrendo, esporadicamente, períodos de até 90 dias sem precipitação (TONIATO, 1996).

Inga sessilis: os frutos desta espécie foram coletados na Serra do Japi.

A Serra do Japi, localizada no município de Jundiá, estado de São Paulo, está situada entre duas fisionomias vegetacionais distintas e de ampla distribuição no Brasil - a Mata Atlântica e as Florestas Mesófilas Semidecíduas de Planalto. Sendo a maior parte de sua área florestal ocupada pelas Florestas Mesófilas Semidecíduas (LEITÃO FILHO, 1995).

A área de coleta dos frutos de *Inga sessilis* (Mirante da Serra do Japi) é classificada como sendo uma Mata Mesófila Semidecídua de Altitude, pois a influência da Mata Atlântica não se faz muito evidente (RODRIGUES *et al.*, 1989). Esta formação possui árvores que variam de 10 a 15 metros, com poucas espécies emergentes, estrato arbóreo muito denso, copas nitidamente sobrepostas, produzindo um sombreamento intenso e com um estrato arbustivo e herbáceo muito pobre.

Segundo AB'SABER (1992) na Serra do Japi os múltiplos processos abióticos de pedogênese, associados às interações bióticas como a ação de animais fuçadores, a penetração intersticial de raízes e a ação de formigas e cupins, bem como a posição geográfica que determina uma padrão único de pluviosidade, resultaram numa nova paisagem geomorfológica que permitiu a re-expansão das florestas tropicais de planalto. No solo predominam sedimentos

arenosos que formam uma camada de arenito que, por transformações físico-químicas, são transformadas em rochas quartzíticas.

A Serra do Japi possui altitudes que variam entre 700 a 1300 metros acima do nível do mar, com temperaturas médias de 15,7°C nas partes mais altas e de 19 °C nas partes mais baixas, sendo julho o mês mais frio com temperaturas médias variando entre 11,8 e 15,3 °C e janeiro o mês mais quente com temperaturas variando entre 18,0 e 22,2°C em função da altitude (PINTO, 1995).

Ainda segundo este autor na Serra do Japi chove, em média 95 dias por ano, especialmente nos meses de dezembro e janeiro, que podem apresentar índices mensais de cerca de 250 mm. A estiagem se prolonga de junho a setembro, com índices mensais de cerca de 40 mm. Cabe ressaltar, entretanto, que nestes meses de inverno a neblina que se forma diariamente nos cumes pode representar outra fonte significativa de água para a vegetação.

V.2.2 - Metodologia

Os experimentos de germinação, a determinação dos metabólitos e as análises estatísticas foram efetuadas de acordo com a metodologia descrita no capítulo I.

Tendo em vista que nos capítulos anteriores não se observou uma diferença significativa entre os tratamentos de normoxia e hipoxia para as quatro espécies estudadas, e que no máximo após 10 dias nestas condições as sementes já haviam germinado, neste estudo utilizamos apenas o tratamento de anoxia.

Foram realizados testes para determinar a viabilidade das sementes após 3, 4, 10, 20 e 30 dias de incubação nas jarras anaeróbicas bem como a determinação dos produtos finais do metabolismo respiratório após 0 (controle), 4, 10, 15, 20 e 30 dias de anoxia.

A heterogeneidade das respostas observadas determinou a inclusão de outro parâmetro no estudo, a contagem cromossômica para investigar a ocorrência ou não de poliplóides entre as quatro espécies estudadas.

A contagem cromossômica foi efetuada com a utilização de ápices de raiz para verificação da mitose. Os ápices radiculares foram obtidos de sementes colocadas para germinar em placas de Petri sob papel de filtro umedecido com

água destilada. As placas foram mantidas em germinador FANEM sob luz branca, com fotoperíodo de 12 horas e em temperatura de $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$.

Após a germinação os ápices radiculares foram coletados e submetidos a um pré-tratamento com 8-hidroxiquinoleína (8HQ), um agente anti-mitótico. Após este procedimento, os ápices radiculares foram fixados em Carnoy (3 partes de etanol : 1 parte de ácido acético) e estocados em álcool 70% em baixa temperatura (freezer).

A técnica utilizada para observação dos cromossomos foi a de Giemsa (GUERRA, 1983). Os ápices radiculares foram hidrolisados com HCl 5N em temperatura ambiente por 20 minutos e, posteriormente, transferidos para água destilada. Para preparação das lâminas, um ápice de raiz com uma gota de ácido acético 45% foi esmagado entre lâmina e lamínula. Após o esmagamento verificou-se o espalhamento do material, retirando-se em seguida a lamínula com o auxílio de nitrogênio líquido. O material foi então corado com uma solução de Giemsa a 2%. Após a coloração, a lâmina foi montada com Entelam. Os cromossomos foram observados em microscópio óptico em um aumento de 1000 X e, quando possível, fotografados.

V.3 - Resultados

Observa-se na Figura V.1-A que três dias de anoxia não afetam a viabilidade das sementes pois a germinação pós-anoxia destas não foi afetada de forma significativa, pois praticamente todas as espécies atingiram o percentual máximo de germinação. Entretanto, apenas um dia a mais de anoxia já foi o suficiente para matar cerca de 40% das sementes de *Inga sessilis*, enquanto as sementes das demais espécies mantiveram a viabilidade apresentando 100% de germinação (Figura V.1-B).

Na Figura V.1-C já não constam os dados referentes às sementes de *I. fagifolia* pois, como foi descrito no capítulo II, 72% das sementes desta espécie haviam germinado na completa ausência de oxigênio (Figura II.3 do Capítulo II). No tratamento pós-anoxia, entretanto, não ocorreu o desenvolvimento de plântulas das sementes que haviam germinado na jarra anaeróbica, pelo contrário a exposição ao ar levou a uma rápida morte destes indivíduos bem como dos 28% de sementes que não haviam germinado na jarra anaeróbica,

provavelmente devido ao dano peroxidativo.

Nas demais espécies, as respostas ao período de 10 dias de anoxia variaram da perda de viabilidade de cerca de 80% das sementes de *I. sessilis*, além do sensível atraso no início da germinação pós-anoxia, até a manutenção de 100% da viabilidade das sementes de *I. affinis* (Figura V.1.C).

Após 20 dias na completa ausência de oxigênio, todas as sementes de *I. sessilis* estavam mortas. No caso de *I. luschnathiana*, além do significativo atraso no início da germinação, apenas cerca de 40% das sementes continuavam viáveis, entretanto, o percentual de sementes viáveis de *I. affinis* continuava elevado, cerca de 90% (Figura V.1.D). Cabe ressaltar também que no caso de *I. fagifolia* todas as sementes haviam germinado após 20 sob anoxia (Figura II.3) e que, assim como no caso do tratamento anterior, as plântulas retiradas da jarra foram incapazes de se desenvolver morrendo em poucos dias de normoxia.

Na Figura V.1.E observa-se que o período de 30 dias de anoxia foi letal para a viabilidade de sementes de *I. luschnathiana* que perderam por completo seu potencial germinativo. No caso de *I. affinis* o tratamento induziu um pequeno atraso na germinação mas um percentual alto de sementes, 84%, ainda se mostrou capaz de germinar quando retornou a normoxia. Este resultado corrobora um resultado anterior, na fase dos testes preliminares, quando se obteve cerca de 80% de germinação de sementes de *I. affinis* mantidas por 60 dias na jarra anaeróbica. Outro aspecto interessante a ser observado na Figura V.1.E é a longevidade das sementes, isto é, após 30 dias de anoxia as sementes mantiveram a capacidade de germinar por mais 40 dias no experimento pós-anoxia, enquanto que no experimento de armazenagem 10 dias foram suficientes para afetar o potencial germinativo das sementes (Figura I.5).

O padrão de acúmulo de etanol nas sementes variou de espécie para espécie, mas há uma semelhança entre os padrões observados nas sementes de *I. affinis*, *I. fagifolia* e *I. luschnathiana*, que apresentaram, progressivamente, níveis cada vez mais elevados deste metabólito. Por outro lado o padrão apresentado por *I. affinis* é muito diferente (Figura V.2).

I. luschnathiana e *I. affinis* apresentaram um progressivo acúmulo de etanol que parece estar associado à manutenção da viabilidade das sementes, que sobrevivem bem à 10 dias de anoxia. Uma prolongação deste período e da

manutenção de níveis superiores a 300 μ moles por grama de semente parece ser fatal para as sementes de *I. luschnathiana* mas não para as de *I. affinis* (Figuras V.1 e V.2). É provável que a perda parcial, após 20 dias, e a perda total, após 30 dias na jarra anaeróbica, da viabilidade das sementes de *I. luschnathiana* se deva a uma exaustão de substrato para respiração e geração de energia.

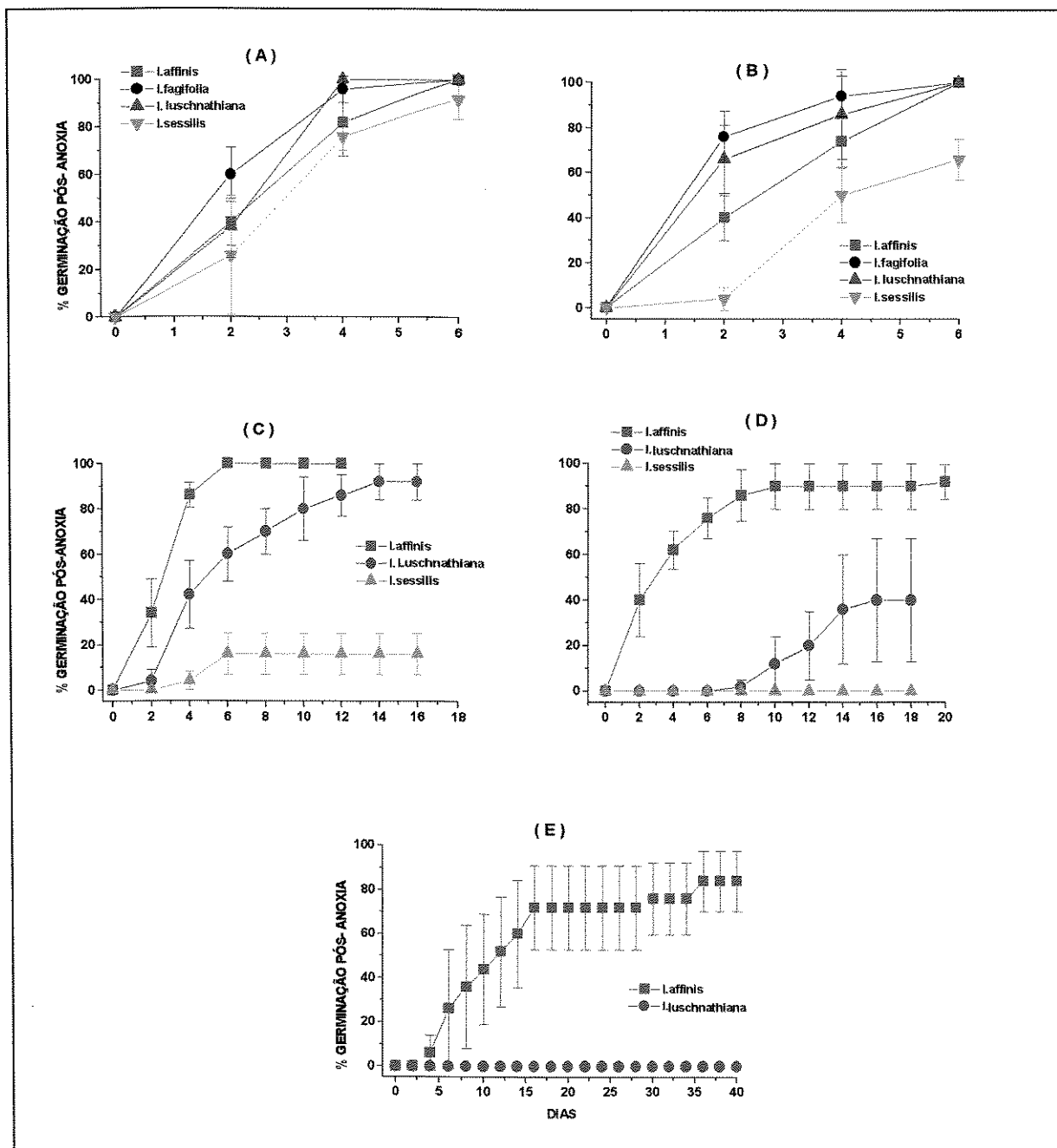


Figura V.1 - Germinação pós-anoxia de *Inga affinis*, *I. fagifolia*, *I. luschnathiana* e *I. sessilis*, onde (A) representa 3 dias em anoxia, (B) 4 dias, (C) 10 dias, (D) 20 dias e (E) 30 dias. As barras representam o desvio padrão.

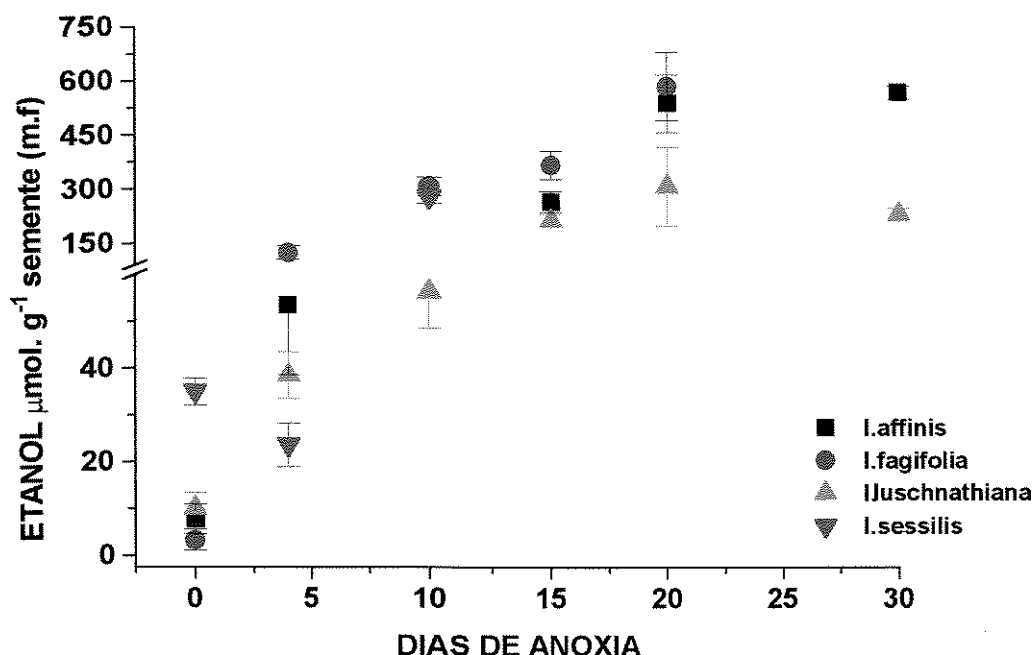


Figura V.2 - Concentração de ETANOL durante a germinação de sementes de *Inga affinis*, *I. fagifolia*, *I. luschnathiana* e *I. sessilis* submetidas à anoxia. As barras representam o desvio padrão (n=5) e (m.f.) significa massa fresca.

No caso de *I. fagifolia* o nível de etanol presente nas sementes, cerca de 600 μ moles por grama, sugere que, sob anoxia, a via fermentativa é acelerada a ponto de compensar sua baixa eficiência em termos de produção de ATP e gerar energia suficiente para as sementes germinarem na ausência de oxigênio (Figuras V.1 e V.2).

O padrão apresentado por *I. sessilis* é muito distinto, pois após 4 dias sob anoxia o nível de etanol é inferior ao observado no controle e, neste momento, cerca de 40% das sementes já haviam perdido a viabilidade. Possivelmente o alto teor de etanol encontrado nas sementes incubadas por 10 dias se deva muito mais à putrefação das sementes já mortas, todas se mostraram inviáveis ao término deste tratamento, do que ao metabolismo associado ao processo de germinação das mesmas (Figuras V.1 e V.2).

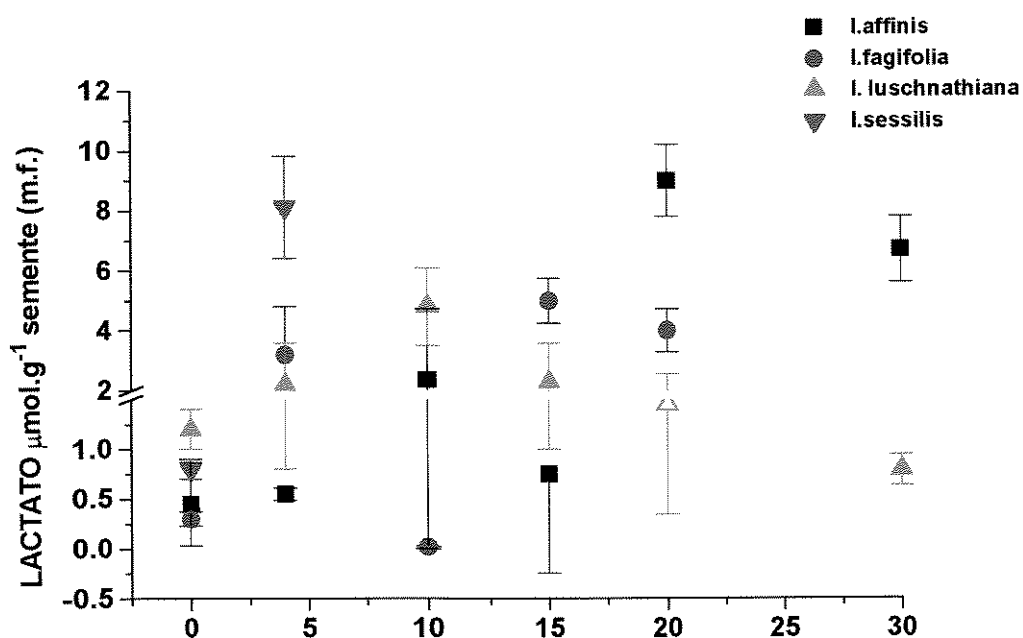


Figura V.3 - Concentração de LACTATO durante a germinação de sementes de *Inga affinis*, *I. fagifolia*, *I. luschnathiana* e *I. sessilis* submetidas à anoxia. As barras representam o desvio padrão (n=5) e (m.f.) significa massa fresca.

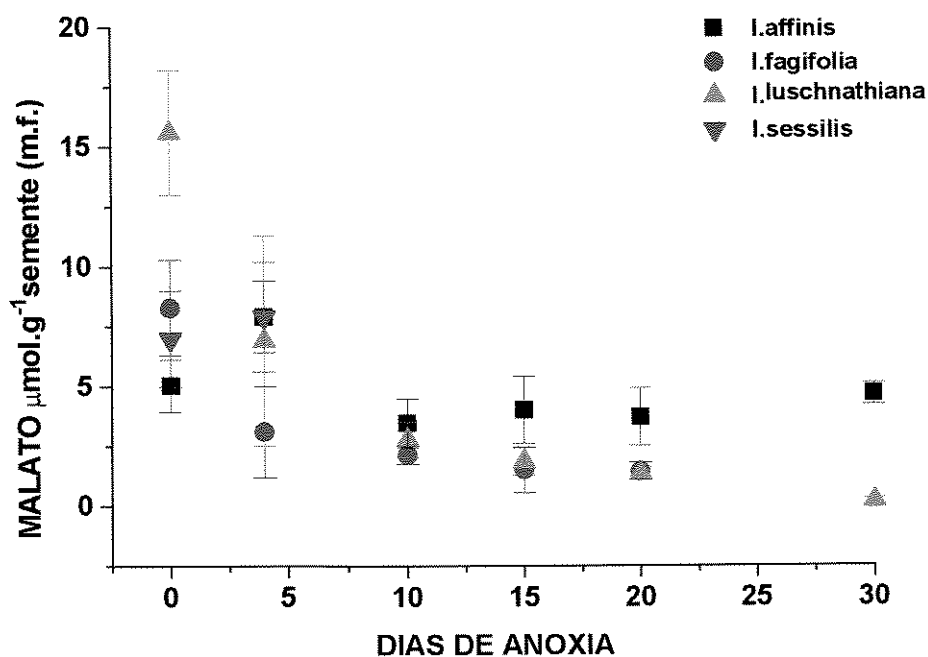


Figura V.4 - Concentração de MALATO durante a germinação de sementes de *Inga affinis*, *I. fagifolia*, *I. luschnathiana* e *I. sessilis* submetidas à anoxia. As barras representam o desvio padrão (n=5) e (m.f.) significa massa fresca.

A figura V.3 mostra que após 4 dias de anoxia apenas as sementes de *I. sessilis* apresentaram um aumento significativo no nível de lactato. No caso de *I. affinis* os níveis mais elevados de lactato são alcançados, e mantidos, somente após 20 dias de incubação.

O aumento da concentração de malato conforme Figura V.4 não foi verificada para nenhuma das espécies, muito pelo contrário, o que ocorre na realidade é a diminuição deste metabólito no decorrer do experimento, sendo que a diminuição mais acentuada ocorre nas sementes de *I. luschnathiana*.

A contagem cromossômica de *I. sessilis* e *I. affinis* (Figura V.5A) confirmou os dados de SHIBATA (1962) mostrando que o número de cromossomos típico do gênero é de $2n=26$.

A contagem evidenciou também a existência de duas espécies poliplóides, com $2n=52$, *I. fagifolia* (Figura V.5B; Tabela V.1) e *I. luschnathiana* (Tabela V.1), dentre as quatro espécies estudadas.

Tabela V.1 - Contagem do número cromossômico de espécies do gênero *Inga* incluídas no presente estudo e seus respectivos ambientes.

ESPÉCIE	NÚMERO CROMOSSÔMICO (2n)	TIPO DE AMBIENTE
<i>Inga affinis</i>	26	Mata Ciliar
<i>Inga fagifolia</i>	52	Duna, Restinga, Floresta Ombrófila Densa, Mata Mesófila Semidecídua e Mata Paludícola
<i>Inga luschnathiana</i>	52	Mata Paludícola
<i>Inga sessilis</i>	26	Floresta Ombrófila Densa, Mata Mesófila Semidecídua e Mata Mesófila Semidecídua de Altitude

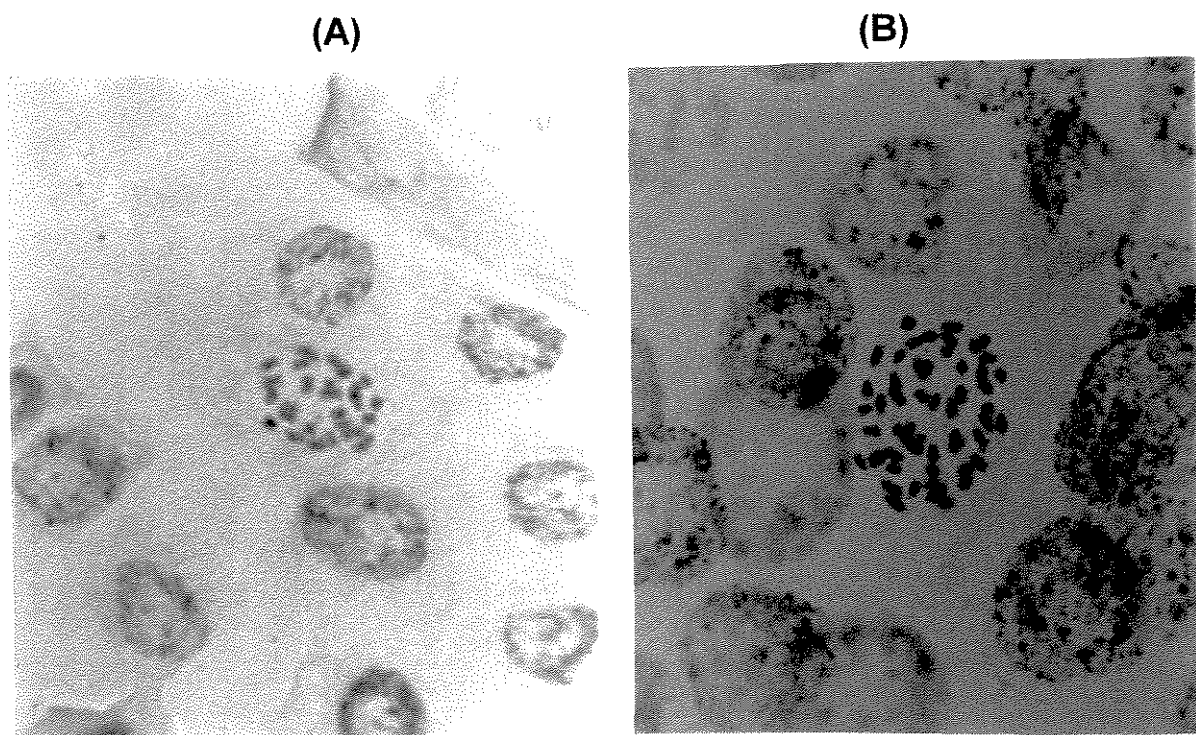


Figura V.5 - Cromossomos em metáfase mitótica de espécies de *Inga*: (A) *I. sessilis* 2n=26 e (B) *Inga fagifolia* 2n=52

V.4 - Discussão

A capacidade de manutenção da viabilidade durante um longo período de anoxia observada em sementes de *I. affinis* mostra que esta espécie é extremamente tolerante à falta de oxigênio, e esta característica certamente lhe confere uma grande vantagem sobre as demais espécies que habitam o mesmo ambiente.

Além disso LIEBERG & JOLY (1993) demonstraram que as sementes de *I. affinis*, procedentes das matas ciliares do município de Brotas/SP, germinam submersas e que as plântulas crescem nesta condição por 60 dias. OKAMOTO & JOLY (em preparação) verificaram que, apesar de ser muito mais lento do que em plantas controle, as plantas submersas de *I. affinis* germinam e crescem totalmente submersas por mais de dois anos e se apresentam morfológicamente muito distintas do que quando crescidas em condições normais.

Considerando que o amido é a principal reserva das sementes de *I. affinis* (ANGELO CORTELAZZO, com.pess.) o fato desta espécie manter as sementes viáveis por longos períodos em baixas concentrações de oxigênio, corrobora a hipótese de AL-ANI *et al.* (1985) e RAYMOND *et al.* (1985) de que o tipo de reserva das sementes que confere maior tolerância à falta de oxigênio é o amido.

Esta maior tolerância decorreria do fato do amido ser um excelente substrato para a glicólise e, conseqüentemente, para que a via fermentativa continue funcional e produza o ATP necessário para a manutenção da viabilidade.

Conforme observado, as sementes de *I. affinis* possuem uma elevada tolerância a altas concentrações de etanol, pois mesmo após longos períodos em anoxia com altas concentrações deste metabólito, 84% das sementes ainda estavam viáveis (Figuras V.1 e V.2). Essa tolerância a tão altas concentrações de etanol pode ser classificada como inédita, pois não há na literatura referência a uma outra espécie que possua tal comportamento.

O aparecimento de altas concentrações de lactato somente após 20 dias de jarra anaeróbica, e a manutenção da viabilidade das sementes apesar delas apresentarem níveis superiores a 7 μ moles por grama, permite o questionamento da hipótese de Davies & Roberts (KENNEDY *et al.*, 1992) que postula que a tolerância a anoxia está associada aos mecanismos de controle de produção do lactato para evitar o aumento do pH citoplasmático.

Este conjunto de características torna *I. affinis* uma espécie altamente adaptada à imprevisibilidade característica da gênese das planícies aluviais. Estas áreas têm uma dinâmica peculiar de inundações de duração e amplitude imprevisíveis e, junto com as inundações há a inexorável deposição de sedimentos que, pouco a pouco, formam os novos contornos dos rios do interior do estado.

Os frutos de *I. affinis* apresentam uma hidrocoria secundária (LIEBERG, 1990) que faz com que sejam depositados nestas áreas em formação junto com os sedimentos, ficando muitas vezes soterrados por horas, dias ou semanas. A alta tolerância à anoxia, a capacidade de germinar submersa aliadas ao fato da germinação pós-anoxia não ocorrer simultaneamente, mas sim em pulsos descontínuos, aumentam a possibilidade de sucesso no estabelecimento de um maior número de indivíduos.

Entretanto, muito possivelmente, o alto custo metabólico e a especificidade das vantagens conferidas por estas características restringem a competitividade desta espécie em outros ambientes, como a mata paludícola, onde raramente as sementes são soterradas ou ficam submersas por longos períodos, ou as matas mesófilas semidecíduas, nas quais a rápida perda de viabilidade das sementes

expostas ao ar é (Capítulo I), sem dúvida, altamente desvantajosa para *I. affinis*. Portanto é compreensível a alta abundância de adultos e de plântulas desta espécie nas margens sazonalmente inundáveis dos rios (LIEBERG, 1990; DAMASCENO JR, 1997), a existência de adultos em áreas lindeiras mais antigas e inundadas apenas esporadicamente (SALIS *et al.*, 1994) e a ausência da espécie nas matas paludícolas e nas matas mesófilas semidecíduas.

No outro extremo do gradiente de saturação hídrica do solo vamos encontrar *I. sessilis* que, coerentemente, foi a espécie que apresentou a menor tolerância de sementes à anoxia. Não deixa de ser surpreendente, entretanto, o fato de cerca de 40% das sementes desta espécie conseguirem germinar submersas (Figura IV.3) e 60% das sementes tolerarem um período de 4 dias na completa ausência de oxigênio (Figura V.1). Como já foi discutido anteriormente é difícil determinar se estas características são relictuais ou foi esta capacidade que permitiu que o gênero viesse a habitar zonas sazonais ou permanentemente encharcadas. Por outro lado torna-se fácil compreender porque esta espécie ocorre apenas no extremo mais seco do gradiente de saturação hídrica do solo, pois dificilmente suas sementes teriam condições de germinar e as plântulas de se estabelecerem em áreas onde a disponibilidade de oxigênio no solo possa ser baixa por longos períodos.

Sumarizando os resultados obtidos com o estudo do potencial germinativo pós-anoxia verificamos que, das quatro espécies estudadas, *I. sessilis* pode ser considerada como sendo a menos tolerante à falta de oxigênio pois apenas 3 dias de anoxia já são suficientes para que a perda da viabilidade das sementes se inicie. Esta perda rápida da viabilidade pode estar relacionada com a baixa tolerância ao etanol ou a rápida exaustão de substrato respiratório. Contudo, ao relacionarmos as respostas observadas sobre o potencial germinativo e as respostas metabólicas com o seu ambiente natural, conclui-se que a capacidade de tolerar baixos níveis de disponibilidade de oxigênio não é fundamental para o seu estabelecimento.

Nas observações de campo, na Serra do Japi, notou-se que alguns dias de chuva aceleravam o processo de maturação dos frutos, de tal forma que as sementes, jogadas geralmente no interior da mata pelos macacos que removiam apenas a sarcotesta, encontrassem um ambiente úmido e favorável para uma

rápida germinação. No interior da mata a presença de uma densa camada de serapilheira (MORELLATO, 1992) ajuda a manter esta alta umidade por mais tempo, favorecendo também o crescimento da radícula, que no Gerbox chegava a crescer até 1 cm por dia (dados não apresentados) e o estabelecimento de novos indivíduos.

Inga fagifolia é, das quatro espécies estudadas, a que ocorre na maior amplitude de ambientes ao longo do gradiente de saturação hídrica. A rara capacidade de germinar na completa ausência de oxigênio permite que ela explore tanto ambientes hipóxicos, como as áreas alagáveis das dunas e restingas litorâneas e as matas paludícolas do interior, como aqueles que esporadicamente podem sujeitar as sementes à períodos de anoxia, como as planícies aluviais. Nestas, entretanto, aparentemente não é tão frequente como *I. affinis* (METZGER *et al.*, 1997) o que sugere que, em termos de competitividade, perde para esta espécie neste ambiente.

A impossibilidade das sementes, que germinaram na jarra anaeróbica, de continuarem o seu desenvolvimento após o retorno a uma atmosfera rica em oxigênio pode ser explicada de duas formas.

A primeira seria a possível morte das células do embrião em função da destruição da membrana celular (JACKSON *et al.*, 1982) como consequência do alto acúmulo de etanol produzido, 600 μ moles por grama, uma vez que nas condições experimentais a possibilidade de ocorrer difusão de etanol para o meio era limitada. A difusão de etanol para o meio parece ser um parâmetro importante para a manutenção da viabilidade de sementes germinadas sob anoxia. No caso de arroz, por exemplo, cerca de 98% do etanol produzido pela germinação em condições anóxicas é difundido para o meio (BERTANI *et al.*, 1980).

A segunda possibilidade seria a injúria pós-anoxia provocada pela rápida conversão de etanol em acetaldeído, que é muito mais tóxico e prejudicial à membrana plasmática do que o próprio etanol (ALBRECHT & WIENDEROTH, 1994; PFISTER-SIEBER & BRÄNDLE, 1994; CRAWFORD & BRÄNDLE, 1996). Esta conversão é o resultado de um complexo de reações que, mediadas por enzimas como a superóxido dismutase, levam a geração de oxigênio livre e, posteriormente, de peróxido de hidrogênio. Sob ação da catalase o etanol acumulado sob anoxia é oxidado pelo peróxido de hidrogênio gerando

rapidamente grandes quantidades de acetaldeído (CRAWFORD & BRÄNDLE, 1996).

Se aceitarmos a hipótese de que sementes de *I. fagifolia* sofrem danos pós-anoxia devido à rápida conversão de etanol em acetaldeído, então surge a pergunta do porque sementes de *I. affinis* não sofrem este mesmo dano. A resposta poderia estar no fato das sementes de *I. affinis* não germinarem, portanto o eixo embrionário não seria exposto diretamente às altas concentrações de oxigênio no momento que as sementes são retiradas da jarra. A proteção através dos cotilédones poderia fazer com que a exposição do eixo embrionário ao oxigênio seja lenta, o que evitaria um aumento rápido e fulminante da concentração de acetaldeído.

Cabe ressaltar que em condições naturais as sementes recém germinadas de *I. fagifolia* também não seriam subitamente expostas à normoxia, muito provavelmente haveria uma transição lenta e gradual de um ambiente anóxico para um ambiente com níveis de oxigênio cada vez mais próximos da normalidade.

A ocorrência desta espécie nas matas mesófilas semidecíduas e na floresta ombrófila densa sugere que a poliploidia lhe confere a capacidade de competir com outras espécies mesmo em ambientes nos quais as adaptações à baixa disponibilidade de oxigênio não representam, obrigatoriamente, vantagens.

No ambiente típico de *I. luschnathiana*, as matas paludícolas, a saturação hídrica decorre da subida do lençol freático e os frutos e sementes são, frequentemente, expostos à baixa disponibilidade de oxigênio, mas raramente à anoxia. Ao contrário do que acontece nas margens de rio, ambiente típico de *I. affinis*, nas matas de brejo dificilmente as sementes seriam carregadas e soterradas por sedimentos, criando um ambiente onde a disponibilidade de oxigênio é baixíssima ou nula.

Portanto não deixa de ser surpreendente que as praticamente 100% das sementes tolerem 10 dias e cerca de 40% delas tolerem até 20 dias nas jarras anaeróbicas.

Ao contrário de *I. fagifolia* que ocupa um amplo espectro de ambientes ao longo do gradiente de saturação hídrica, a ocorrência de *I. luschnathiana* restringe-se as matas paludícolas. Entretanto, dentre os diferentes ambientes

determinados pela saturação hídrica do solo este é o que sofre a maior amplitude de variação em relação a água no solo. Apesar de passar a maior parte do ano com o solo saturado onde a água chega mesmo a aflorar as matas paludícolas podem secar por completo nas longas estiagens. Nestes episódios a vegetação é exposta a um período de forte restrição hídrica que, ao longo do tempo evolutivo, deve ter exercido uma forte pressão de seleção. O fato de ser um poliplóide pode ter sido decisivo para *I. luschnathiana* se tornar uma espécie importante na estrutura destas comunidades de mata paludícolas.

Outro aspecto que precisa ser ressaltado é o fato das matas paludícolas se localizarem sempre em baixadas no junção de vertentes de drenagem, locais expostos a baixas temperaturas e geadas no decorrer do inverno. Além disso, frequentemente, os indivíduos de *I. luschnathiana* estão sujeitos à saturação hídrica no inverno, quando as condições são menos favoráveis para a manutenção de uma alta taxa fotossintética. A limitação na fotossíntese pode significar uma menor disponibilidade de carboidratos para atender a demanda metabólica do sistema radicular que, nestas condições, deve ser pelo menos parcialmente anaeróbico e altamente dependente de uma alta disponibilidade de substrato (LOBO & JOLY, 1998).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos reforçam a hipótese de que ao longo do processo evolutivo a seleção teria atuado sobre um conjunto de características, de tal forma que hoje encontramos espécies com estratégias afinadas com a multiplicidade de estresses, incluindo a competição, que caracteriza cada ambiente.

Consequentemente, apesar de podermos afirmar que uma dada espécie é mais tolerante à baixa disponibilidade de oxigênio ou a altas concentrações de etanol do que uma outra, a análise de fatores isolados não permite inferirmos em que tipo de ambiente ela terá mais sucesso. É necessário que se analise o conjunto de respostas de cada espécie para compreender a razão do maior sucesso de uma em relação a outra num dado ambiente.

As quatro espécies apresentaram estratégias tão diversificadas quanto a diversidade de ambientes que ocupam e, indiscutivelmente, há uma alta correlação entre as pressões que conseguimos identificar em cada ambiente e a estratégia observada na espécie de *Inga* que tem maior sucesso naquelas condições.

O sucesso na germinação, apesar de ser fundamental, é apenas uma etapa na vida da planta. O estabelecimento das plantas jovens vai depender de um outro conjunto de características de tolerância à saturação hídrica do solo bem como de estratégias de aquisição de recursos como água, nutrientes e energia que lhes confira uma vantagem competitiva. O estudo desta próxima fase representa um enorme desafio, pois obrigatoriamente deverá abordar vários aspectos que vão desde o estudo de populações até a caracterização da capacidade fotossintética das plantas jovens em diversas situações de saturação hídrica do solo e luminosidade.

Os resultados obtidos com a contagem cromossômica reforçam a hipótese de que espécies poliplóides têm a capacidade de ocupar uma maior gama de ambientes e/ou ambientes altamente heterogêneos ao longo do tempo, com uma alternância de estresses. Este estudo precisa, sem dúvida, ser ampliado incluindo não só outras espécies como também populações distintas de uma mesma espécie.

PERSPECTIVAS

Para cada uma das espécies os resultados quanto ao potencial germinativo, quanto às respostas dos mecanismos adaptativos e quanto ao grau de tolerância às baixas concentrações de oxigênio, foram diferentes, mesmo sendo estas espécies, filogeneticamente, tão próximas.

Neste trabalho, muitas questões foram levantadas e as conclusões são, as vezes, meramente especulativas. Contudo, os resultados abrem novas perspectivas de trabalho e para responder as questões abaixo apresentadas é imprescindível um estudo integrando diversas áreas do conhecimento.

A capacidade de sementes de *Inga affinis* manterem a viabilidade após longos períodos de anoxia se deve ao fato de terem o amido como reserva principal ? O amido está sendo utilizado para manter a viabilidade nestas condições ? Então nesta espécie a enzima α -amilase é funcional na total ausência de oxigênio ?

Porque *Inga fagifolia* consegue germinar na total ausência de oxigênio e as demais espécies não possuem esta capacidade? A sua reserva estaria sendo utilizada com maior eficiência (permitindo uma alta produção de energia para a germinação, como sugere a alta concentração de etanol), a quantidade de reserva é maior ou a α -amilase nesta espécie possui maior atividade? Porque ao retornar a uma atmosfera normal, as sementes recém germinadas não conseguem se desenvolver e morrem? A morte decorre da alta concentração de etanol produzida ou do dano peroxidativo (estresse causado pelo oxigênio) devido ao retorno súbito a uma atmosfera oxigenada ? A capacidade de germinar em anoxia estaria relacionada com a poliploidia?

Em relação as duas espécies acima, a quantidade de etanol produzida durante a germinação anóxica de *Inga luschnathiana* foi, significativamente, menor. A rápida perda da viabilidade é uma consequência da baixa quantidade de energia gerada pela via fermentativa; de uma baixa tolerância ao etanol; de uma menor quantidade de reserva nos cotilédones ou da incapacidade de ativação da enzima α -amilase na ausência de oxigênio ? Estaria a poliploidia relacionada com a capacidade desta espécie ocorrer em um ambiente, mata palidícola, que,

aparentemente, é o que sofre com maior rigor a falta de oxigênio ?

A capacidade, apesar de baixa, de germinarem submersas apresentada pelas sementes de *Inga sessilis* indica que esta espécie está desenvolvendo mecanismos que possibilitarão a ocupação de zonas alagáveis ou estamos observando os resquícios de mecanismos desenvolvidos por uma espécie que hoje ocupa áreas secas e bem drenadas mas que é originária de ambientes sujeitos à saturação hídrica do solo ?

Para as quatro espécies as sementes utilizadas eram provenientes de uma única população. As respostas obtidas seriam específicas daquela população ou são características da espécie. Existem variações entre populações de uma mesma espécie ? Estas variações estariam correlacionadas com o ambiente onde cada população ocorre ? Estas espécies possuem uma ampla plasticidade fenotípica ou o processo de especiação já evoluiu ao ponto de existirem ecótipos?

As populações de *Inga fagifolia* e *Inga luschnathiana* estudadas são citótipos ou todas as populações destas espécies são tetraploides ?

Para responder estas questões seria necessário estudar outras populações do ponto de vista ecofisiológico e citogenético, ampliando o escopo do enfoque para incluir questões como a natureza, a quantidade e o padrão de alocação das reservas; as respostas metabólicas no período post-anoxia; os mecanismos adaptativos desenvolvidos pelas plântulas para viabilizar seu estabelecimento nestes ambientes sazonal ou permanentemente encharcados.

Um estudo envolvendo mais de uma população de uma espécie deveria tentar elucidar também a questão da plasticidade fenotípica versus diferenciação ecotípica, relacionando as características de cada população com seu ambiente específico. Evidentemente, torna-se imprescindível também um conhecimento mais detalhado sobre o ambiente ocupado por cada população, acompanhando, por exemplo, o regime de saturação hídrica do local. Estas informações permitiriam avaliar o grau de pressão que a baixa disponibilidade de oxigênio no substrato exerce sobre a germinação e sobre o estabelecimento das plântulas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER, A.N. 1992. A Serra do Japi, sua origem geomorfológica e a teoria dos refúgios. In: História natural da Serra do Japi: Ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil. (L.P.D. Morellato ed.) Ed. UNICAMP/FAPESP. Campinas, p. 12-23.
- AIDAR, M. P. M. 1992. Ecologia do Araribá (*Centrolobium tomentosum* Guill. ex Benth - Fabaceae) e o ecótono Mata Ciliar da Bacia do rio Jacaré-Pepira, São Paulo. Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP. Dissertação de mestrado.
- AL-ANI, A.; BRUZAU, F.; RAYMOND, P. SAINT-GES, V. & LEBLANC, J. M. 1985. Germination, respiration, and adenylate energy charge of seeds at various oxygen partial pressures. *Plant Physiol.* 79:885-890.
- ALBRECHT, G; WIEDENROTH, E. M. 1994. Protection against activated oxygen following re-aeration of hypoxically pre-treated wheat roots. The response of the glutathione system. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 45 n. 273, pp. 449-445.
- ANDREWS, D. L.; COBB, B. G.; JOHNSON, J. R. & DREW, M. C. 1993. Hypoxic and anoxic induction of alcohol dehydrogenase in roots and shoots of seedling of *Zea mays adh* transcripts and enzyme activity. *Plant Physiol.* 101:407-414.
- ANDREWS, D.L.; DREW, M. C.; JOHNSON, J. R. & COBB, B. G. 1994. The response of maize seedlings of different ages to hypoxic and anoxic stress. *Plant Physiol.* 105:53-60
- ANDREWS, C. J. 1997. A comparison of glycolytic activity in winter wheat and two forage grasses in relation to their tolerance to ice encasement. *Annals of Botany* (supplement A) 79:87-91.
- AP REES, T. 1980. Assessment of the contributions of metabolic pathways to plant respiration. *The Biochemistry of Plants*. Vol 2. Academic Press. Inc.
- AP REES, T.; JENKIN, L.E.T.; SMITH, AM. & WILSON, P.M. 1987. The metabolism of flood-tolerant plants. In: *Plant life in aquatic and amphibious habitats*. (R.M.M. Crawford, ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 227-238.

- ARMSTRONG, W.; BRANDLE, R. & JACKSON, M. B. 1994. Mechanism of flood tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica*. 43(4):307-358.
- BASKIN, J.M. & BASKIN, C. C. 1976. Evidence for metabolic adaptation to flooding in *Laevenworthia uniflora*. *J. Chem. Ecol.* 2(4):441-447.
- BENTHAM, G. 1876. Leguminosae II. *In* Flora Brasiliensis. C. F. P. Martius, A.G. Eichler eds. Munique, Lipsae apud Frid. Fleicher, v. XV, pt. 2. p. 471.
- BENVENUTTI, S. & MACCHIA, M. 1995. Effect of hypoxia on buried weed seed germination. *Weed Research* 35:343-351
- BERTANI, A.; BRAMBILLA, I. & MENEGUS, F. 1980. Effect of anaerobiosis on rice seedlings: growth, metabolic rate, and fate of fermentation products. *Journal of Experimental Botany*
- BIEHLER, K.; MIGGE, A. & FOCK, H. P. 1996. The role of malate dehydrogenase in dissipating excess energy under water stress in two wheat species. *Photosynthetica*, 32(3):431-438.
- BLOM, C. W. P. M.; BOGEMANN, G. M.; LAAN, P.; SMANN, A. J. M.; STEEG, VAN DER H. M. & VOESENEK, L. A. C. J. 1990. Adaptations to flooding in plants from the river areas. *Aquatic Botany*, 38:29-47.
- BLOM, C. W. P.; VOESENEK, L. A. C. J. 1996. Flooding: the survival strategies of plants. *Trends in Ecology & Evolutions*. V. IV pp. 290-295.
- BURKART, A. 1979. Leguminosae-Mimosoideae. *In*: Flora Ilustrada Catarinense. (P. R. Reitz ed.) I parte. Pp. 66-70 e 77-78.
- CHRISTOPHER, M. E. & GOOD, A. G. 1996. Characterization of hypoxically inducible lactate dehydrogenase in maize. *Plant Physiol.*, 112:1015-1022.
- CRAWFORD, R.M.M. 1977. Tolerance of anoxia and ethanol metabolism in germinating seeds. *New Phytol.*, 79: 511-517.
- CRAWFORD, R. M. M. 1978. Metabolic adaptations to anoxia. *In* Plant life in anaerobic environments.(D. D. Hook & R. M. M. Crawford eds.). Science Publisher. Ann Arbor. Pp 119-154.
- CRAWFORD, R.M.M. 1992. Oxygen availability as an ecological limit to plant distribution. *Adv. Ecol. Res.*, 23: 93-185.
- CRAWFORD, R.M.M. & BRANDLE, R. 1996. Oxygen deprivation stress in a changing environment. *J. Exp. Bot.*, 47:145-159.

- DAMACENO JR. 1997. Estudo florístico e fitossociológico de um trecho de mata ciliar do rio Paraguai, Pantanal-MS e suas relações com o regime de inundação. Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP. Dissertação de mestrado..
- DAVIES, D. D. 1980. Anaerobic metabolism and the production of organic acids. In: The biochemistry of plants - a comprehensive treatise (P. K. Stumpf & E. E. Conn, eds). Vol 2: Metabolism and respiration. Academic Press, New York, p. 581-611.
- DOLFERUS, R.; ELLIS, M.; BRUXELLES, G.; DE TREVASKIS, B.; HOEREN, F.; DENNIS, E. S. & PEACOCK, W. J. 1997. Strategies of gene action in *Arabidopsis* during hypoxia. *Annals of Botany* 79 (Supplement A) 21-31.
- ENGELAAR, W. M. H.; VAN BRUGEN, M. W.; VAN DEN HOEK, W. P. M.; HUYSER, M. A. H. & BLOM, C. W. P. M. 1993. Roots porosities and radial oxygen losses of *Rumex* and *Plantago* species as influenced by soil pore diameter and soil aeration. *New Phytol.*, 125:565-574.
- ERNST, W. H. O. 1990. Ecophysiology of plants in waterlogged and flooded environments. *Aquatic Bot.* 38:73-90.
- FOX, T. & KENNEDY, R. A. 1991. Mitochondrial enzymes in aerobically and anaerobically germinated seedling of *Echinochloa* and rice. *Planta* 184:510-514.
- GUERN, M.; BOURDU, R. & ROUX, M. 1975. Poliploidie et appareil photosynthétique chez *Hippocrepis comosa* L. *Photosynthetica*. 9 (1): 40-51.
- GUERRA, M. S. 1983. O uso do corante Giemsa na citogenética vegetal-comparação simples e o bandeamento. *Ciênc. Cult.* 35: 190-193.
- GUGLIELMINETTI, L.; WU, Y.; BOSCHI, E.; YAMAGUCHI, J.; PERATA, P. & ALPI, A. 1997. Effects of anoxia on sucrose degrading enzymes in cereal seeds. *J. Plant Physiol.*, vol. 150, pp. 251:258.
- HIESEY, W. M. & MILNER, H. W. 1965. Physiology of ecological races and species. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 16: 203-216.
- HOLM, R. E. 1972. Volatile metabolites controlling germination in buried weeds seeds. *Plant Physiol.*, 50:293-297.

- JACKSON, M. B.; HERMAN, B. & GOODENOUGH, A. 1982. An examination of the importance of ethanol in causing injury to flooded plants. *Plant Cell and Environmental*, 5:163-172.
- JOLY, C. A. 1986. Heterogeneidade ambiental e diversidade de estratégias adaptativas de espécies arbóreas de mata de galeria. *Anais X Simpósio ACIESP- Perspectivas de ecologia teórica*, pp. 19-38.
- JOLY, C. A. 1991. Flooding tolerance in tropical trees. *In* *Plant life under oxygen deprivation: ecology, physiology and biochemistry* (M.B.Jackson, D.D. Davies, H. Lambers, eds.). SBP Academic Publishing, The Hague, p. 23-34.
- JOLY, C.A. 1994b. Flooding Tolerance: reinterpretation of Crawford's Metabolic Theory. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*. 102b: 343-354
- JOLY, C.A. & FELIPPE, G.M. 1979. Germinação e fenologia de *Zeyhera digitalis*: estudo preliminar. *Hoehnea*. 8: 35-40.
- JOLY, C. A. & CRAWFORD, R.M.M. 1982. Variation in tolerance and metabolic responses to flooding in some tropical trees. *J. Exp. Bot.* 33: 799-809.
- JOLY, C. A. & CRAWFORD, R.M.M. 1983. Germination and some aspects of the metabolism of *Chorisia speciosa* St. Hil. seeds under anoxia. *Revta. brasil. Bot.* 6:85-90.
- JOLY, C. A. & BRÄNDLE, R. 1995. Fermentation and adenylate metabolism of *Hedychium coronarium* J. G. Koenig (Zingiberaceae) and *Acorus calamus* L. (Araceae) under hypoxia and anoxia. *Functional Ecology* 9:505-510.
- JOHNSON, J. R.; COBB, B. G. & DREW, M. C. 1994. Hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of *Adh1* Null *Zea mays* L. *Plant Physiol.*, 105:61-67.
- KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, C. F. A. & CAPANEZZI, A. A. 1989. Implantação de matas ciliares: estratégias para auxiliar a sucessão secundária. *In*: *Simpósio sobre Mata Ciliar*. (L. M. Barbosa, ed.). Fundação Cargill.
- KEELEY, J.E. 1979. Population differentiation along a flood frequency gradient: physiological adaptations to flooding in *Nyssa Sylvatica*. *Ecological Monographs* 49:89-108
- KENNEDY, R. A.; RUMPHO, M. E. & VANDER ZEE, P. 1983. Germination of *Echinochloa crus-galli* (Barnyard grass) seeds under anaerobic conditions. *Plant Physiol.*, 72:787-794.

- KENNEDY, R. A.; RUMPHO, M. E. & FOX, T. C. 1987. Germination physiology of rice and rice weeds: metabolic adaptations to anoxia. In Plant life in aquatic and amphibious habitats (R.M.M. Crawford, ed.) Blackwell Scientific, Oxford, UK, pp 193-203.
- KENNEDY, R. A.; FOX, T. C.; EVERARD, J. D. & RUMPHO, M. E. 1991. Biochemical adaptations to anoxia: potential role of mitochondrial metabolism to flood tolerance in *Echinochloa phyllopogon* (Barnyard grass). In: Plant life under oxygen deprivation: ecology, physiology and biochemistry. (M. B. Jackson, D. D. Davies & H. Lambers, eds.).SBP Academic Publishing, The Hague, p. 217-227
- KENNEDY R.A & RUMPHO, M.E. & FOX, T.C. 1992. Anaerobic metabolism in plants. Plant Physiol., 100: 1-6.
- KOLB, R.M. 1998. Respostas metabólicas e morfo-anatômicas de sementes e plantas de *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC (Bignoniaceae) à hipoxia. Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP. Dissertação de mestrado.
- KOZLOWSKI, T.T. 1984. Responses of wood plants to flooding. In: Flooding and plant growth (T. T. Kozlowski ed.) Academic Press, London, p. 129-163.
- LEITÃO FILHO, H. F. 1982 Aspectos taxonômicos das florestas do estado de São Paulo. Silvicultura em São Paulo. 16 (A): 197- 206.
- LEITÃO FILHO, H. F. 1995. A vegetação da Reserva de Santa Genebra. In: Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana: Reserva de Santa Genebra (P. C. Morellato e H. Leitão Filho, eds). UNICAMP, Campinas, pp. 19-29.
- LIEBERG, S. A. 1990. Tolerância à inundação e aspectos demográficos de *Inga affinis* DC. Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP. Dissertação de mestrado.
- LIEBERG, S.A. & JOLY, C. A. 1993. *Inga affinis* DC (Mimosaceae): germinação e tolerância de plântulas à submersão. Revta. brasil.Bot. 16(2):175-179
- LIMA, W. P. 1989. Função hidrológica da Mata Ciliar. In: Simpósio sobre Mata Ciliar.Fundação Cargill. Pp. 25-42.

- LOBO, P. C. 1993. Tolerância à inundação de plantas de *Talauma ovata* St. Hil. (Magnoliaceae) e aspectos do seu comportamento em uma Mata Ciliar da bacia do rio Jacaré-Pepira, Brotas, SP. Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP.
- LOBO, P. C. 1998. Estratégias adaptativas de espécies arbóreas típicas de ambientes de solo hidricamente saturado: uma abordagem morfológica, bioquímica e ecofisiológica. Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP. Dissertação de doutorado.
- LOBO, P.C. & JOLY, C.A. 1996. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Talauma ovata* St. Hil. (Magnoliaceae) uma espécie típica de Matas de Brejo. Revta. brasil.Bot. 19(1):35-40.
- LOBO, P.C. & JOLY, C. A. 1998. Aspectos ecofisiológicos da vegetação de mata ciliar do Sudeste do Brasil. In: Rodrigues, r. r. coord. Matas Ciliares: estado atual do conhecimento, Ed. UNICAMP (no prelo)
- LUMARET, R.; GUILLERM, J. L.; DELAY, J. ; LOUTF, A. A. L.; IZCO, J. & MAY, M. 1987. Polyploidy and habitat differentiation in *Dactylis glomerata* L. from Galicia (Spain). Oecologia 73:436-446.
- MARQUES, M.C.M. 1994. Estudos auto-ecológicos do guanandi (*Calophyllum brasiliense* Camb. Clusiaceae) em Mata Ciliar do município de Brotas, S.P.Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP. Dissertação de mestrado.
- MARTINOIA, E. & RENTSCH, D. 1994. Malate compartmentation - responses to a complex metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol., 45:447-467.
- MAUER, J.; MAYO, J. M. & DENFORD, K. 1978. Comparative ecophysiology of the cromossomes races in *Viola adunca* J. E. Smith. Oecologia 35: 91-104.
- MCMANMOM, M. & CRAWFORD, R.M.M. 1971. A metabolic theory of flooding tolerance: the significance of enzyme distribution and behavior. New Phytol., 70: 299-306.
- MENEGUS, F.; CATTARUZZA, L.; SCAGLIONI, L. & RAGG, E. 1992. Effects of oxygen level on metabolism and development of seedling of *Trapa natans* and two ecologically related species. Physiologia Plantarum, 86: 168-172.
- METZGER, J. P.; BERNACCI, L. C. & GOLDENBERG, R. 1997. Pattern of tree species diversity in riparian forest fragments of different widths (SE Brazil). Plant Ecology, 133:135-152.

- MIYOSHI, K & SATO, T. 1997. The effects of ethanol on the germination of seeds of Japonica and Indica rice (*Oryza sativa* L) under anaerobic and aerobic conditions. *Annals of Botany*, 79: 391-395.
- MOCQUOT, B.; MOUCHES, C. & PRADET, A. 1981. Effect of anoxia on energy charge and proteins synthesis in rice embryo. *Plant Physiol.* 68: 636-640.
- MORELLATO, L.P.C. 1992. Sazonalidade e dinâmica de ecossistemas florestais na Serra do Japi. In Morellato L.P.C. (org). *História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil*. Editora da UNICAMP & FAPESP, p 98-111.
- MUJER, C. V.; RUMPHO, M. E.; LIN, J. J. & KENNEDY, R. A. 1993. Constitutive and inducible aerobic and anaerobic stress protein in the *Echinochloa* complex and rice.
- OKAMOTO, J. M. 1995 Germinação e alguns aspectos do metabolismo de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers Fabaceae. Departamento de Biologia Animal e Vegetal, UEL. Monografia de Bacharelado,
- PINTO, H. S. 1992. Clima da Serra do Japi. In: *História natural da Serra do Japi: Ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil*. (L.P.D. Morellato ed.) Ed. UNICAMP/FAPESP. Campinas, p. 30-39.
- OLIVEIRA, D. M. T. & BELTRATI, C. M. 1996. Morfologia e anatomia dos frutos e sementes de *Inga fagifolia* Willd. (Fabaceae: Mimosoideae). *Rev. Bras. Biol.*, 54 (1):91-100.
- PFISTER-SIEBER, M. & BRÄNDLE, R. 1994. Aspects of plant behavior under anoxia and post-anoxia. *Proceedings of the royal society of Edimburgh*. 102B:313-324.
- PONNAMPERUMA, F. N. 1984. Effects of flooding on soil. In: *Flooding and plant growth* (T. T. Kozlowski ed.) Academic Press, London, p. 195-209.
- PRANCE, G. T. & SILVA, M. F. 1975. *Árvores de Manaus*. INPA, Manaus, AM., 312 pag.
- RAYMOND, P.; AL-ANI, A & PRADET, A 1985. ATP production by respiration and fermentation, and energy charge during aerobiosis and anaerobiosis in twelve fatty and starchy germinating seeds. *Plant Physiol.*, 79: 879-884.
- REICHARDT, K. 1989. Relações água-solo-planta em Mata Ciliar. In; *Simpósio sobre Mata Ciliar*. (L. M. Barbosa ed.). Fundação Cargil, Campinas, p. 20-24.

- RICARD, B.; COUEÉ, I.; RAYMOND, P.; SAGLIO, P. H.; SAINT-GES, V. & PRADET, A. 1994. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. *Plant Physiol.Biochem.* 32(1):1-10.
- ROBERTS, J. K. M.; ANDRADE, F. H. & ANDERSON, I. C. 1985. Further evidence that cytoplasmic acidosis is a determinant of flooding intolerance in plants. *Plant Physiol.*, 77:492-494.
- ROBERTS, J. K. M.; CHANG, K.; WEBSTER, C.; CALLIS, J. & WALBOT, V. 1989. Dependence of ethanolic fermentation, cytoplasmic pH regulation, and viability on the activity of alcohol dehydrogenase in hypoxic maize root tips. *Plant Physiol.*, 89: 1275-1279.
- RODRIGUES, R. R. 1989. Análise estrutural das formações ripárias. In: Simpósio sobre Mata Ciliar. (L. M. Barbosa ed.). Fundação Cargill. Pp. 99-119.
- RODRIGUES, R. R.; MORELLATO, L. P. C.; JOLY, C. A.; LEITÃO-FILHO, H. F. 1989. Estudo florístico e fitossociológico em um gradiente altitudinal de mata estacional mesófila semidecídua, na Serra do Japi, Jundiaí, SP. *Rev. Bras. Bot.* 12:71-84.
- RUMPHO, M. E. & KENNEDY, R. A. 1981. Anaerobic metabolism in germinating seeds of *Echinochloa crus-galli* (barnyard grass). *Plant Physiol.* 68: 165-168.
- RUMPHO, M.E. & KENNEDY, R.A. 1983. Activity of the pentose phosphate and glycolytic pathways during anaerobic germination of *Echinochloa crus-galli* (barnyard grass) seeds. *J. Exp. Bot.*, 34: 893-902.
- SALIS, S.M. de; TAMASHIRO, J. & JOLY, C.A. 1994. Florística e fitossociologia do estrato arbóreo de um remanescente de Mata Ciliar do rio Jacaré-Pepira, Brotas, SP. *Revta. brasil. Bot.* 17(2): 93-103.
- SCARANO, F. R.; CATTÂNIO, J. H. & CRAWFORD, R. M. M. 1994. Root carbohydrate storage in young saplings of an Amazonian tidal Várzea forest before the onset of the wet season. *Acta Bot. Bras.* 8(2):129-139.
- SETTER, T. L.; ELLA, E. S. & VALDEZ, A. P. 1994. Relationship between coleoptile elongation and alcoholic fermentation in rice exposed to anoxia: IV Cultivar differences. *Annals of Botany*, 74(3):273-279.
- SHIBATA, K. 1962 - Estudios citologicos de plantas colombianas silvestres y cultivadas. *J. Agric.Sci.* 8: 49-62.

- SMALL, J. G. C.; POTGIER, G. P. & BOTHA, F. C.; 1989. Anoxic seed germination of *Erythrina caffra* etanol fermenteation and response to metabolic inhibitors. *Journal of Experimental Botany*. 40 (212): 375-381.
- SMITH, A. M. & AP REES, T. 1979. Pathways of carbohydrate fermentation in the roots of marsh plants. *Planta*, 146, 327-334.
- SMOLDERS, A. J. P., den HARTOG, C. & ROELOFS, J. G. M. 1995. Germination and seedling development in *Stratiotes aloides* L. *Aquatic Botany*, 51:269-279
- SOKAL, R. R. & ROHLF, F. 1979. *Biometria: Principios y metodos estadisticos en la investigacion biologica*. H Blume Ediciones, Madrid, 832 pp.
- STEADMAN, K. J.; PRITCHARD, H. W. & DEY, P. 1996. Tissue specific soluble sugar in seeds as indicators of storage category. *Annals of Botany*, 77:667-674.
- THOMPSON, J. D. & LUMARET, R. 1992. The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *TREE*, (7), 9:302-307.
- TONIATO, M. T. Z. 1996. Estudo fitossociológico de um remanescente de Mata de Brejo em Campinas, SP. Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP. Dissertação de mestrado.
- VAN DER , P. 1982. *Principles of dispersal in higher plants*. 2 ed. Berlin. Springer-Verlag.
- VARTAPETIAN, B.B. 1991. Flood-sensitive plants under primary and secondary anoxia: ultrastructure na metabolic responses. In: *Plant life under oxygen deprivation: ecology, physiology and biochemistry*. (M. B. Jackson, D. D. Davies & H. Lambers, eds.).SBP Academic Publishing, The Hague, p. 201-216.
- VAZQUEZ-YANES, C. & OROZCO-SEGOVIA, A. 1993. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rianforest. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 24: 69-87.
- WATERS, I.; KUIPER, P. J. C.; WATKIN, E. & GREENWAY, H. 1991. Effects of anoxia on wheat seedlings. I. Iteration between anoxia and other environmental factors. *Journal of Experimental Botany*. 42:1427-1435.
- WESSON, G. & WAREING, P. F. 1969. The induction of light sensitivity in weed seeds by burial. *Journal of Experimental Botany*, vol. 20, n 63, pp. 414-425.