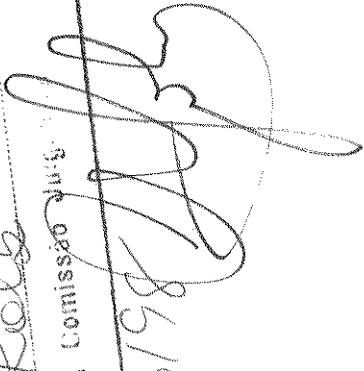


RESPOSTAS METABÓLICAS E MORFO-ANATÔMICAS DE SEMENTES E PLANTAS DE *TABEBUIA CASSINOIDES* (LAM.) DC (BIGNONIACEAE) À HIPOXIA.

Rosana Marta Kolb
Orientador: Dr. Carlos Alfredo Joly

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de mestre em biologia vegetal.

Este exemplar corresponde à resposta
da tese defendida pelo (s) autor (es)
Rosana Marta Kolb
e aprovada pela Comissão Julgadora
29/06/98



Campinas
1998

082201

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	K83r
V. Ex.	
TOMBO BC/	35737
PROC.	395/98
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/12/98
N.º CPD	

CM-00118047-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Kolb, Rosana Marta

K83r Respostas metabólicas e morfo-anatômicas de sementes e plantas de *Tabebuia Cassinoides* (Lam.) DC (Bignoniaceae) à hipoxia / Rosana Marta Kolb. -- Campinas, SP: [s.n.],1998.
86f.: ilus.

Orientador: Carlos Alfredo Joly

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ecofisiologia. 2. Sementes. 3. Germinação. 4. Plantas.
I. Joly, Carlos Alfredo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

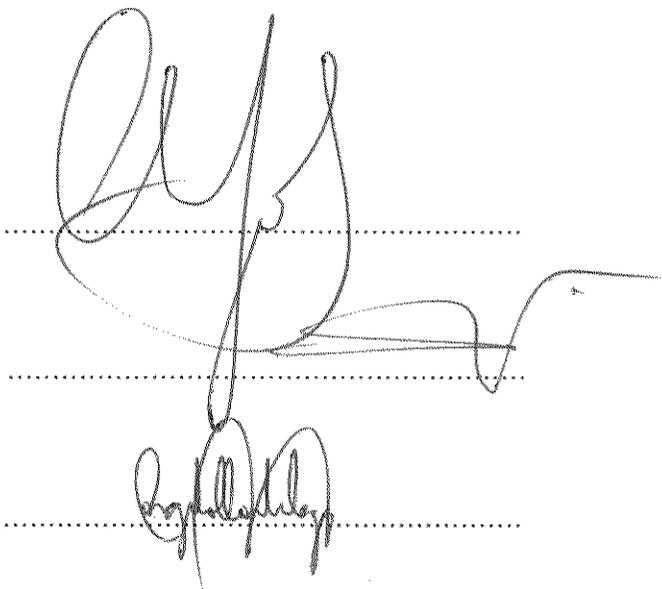
BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

PROF.DR. CARLOS A. JOLY

PROF. DR. MOACYR E. MEDRI

PROF. DR. ANGELO L. CORTELAZZO



Handwritten signatures of Prof. Dr. Carlos A. Joly, Prof. Dr. Moacyr E. Medri, and Prof. Dr. Angelo L. Cortelazzo, each written over a horizontal dotted line.

SUPLENTES:

PROF. DR. IVANY F. M. VALIO

.....

AGRADECIMENTOS:

Em todas as fases da realização deste trabalho, pude contar com o apoio de muitas pessoas. Desta forma, agradeço a todos que colaboraram comigo, direta ou indiretamente, ao longo destes dois anos de trabalho, e especialmente:

- Ao Dr. Carlos A. Joly, pela sua orientação, apoio e incentivo;
- Aos professores Dr. Angelo L. Cortelazzo, Dr. Moacyr E. Medri e Dr. Ivany F. M. Valio, pela leitura crítica e sugestões durante a pré-banca;
- À Dra. Heidi A. M. Dolder, por ter me iniciado na Microscopia Eletrônica de Varredura e pela boa vontade durante o processo da realização das fotos;
- Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da ESALQ, na pessoa do professor Ekitajima, pela permissão do uso do Microscópio Eletrônico de Varredura;
- À Patrícia C. Lobo, pelo auxílio constante durante o desenvolvimento do trabalho no laboratório, pela leitura do manuscrito e sugestões e sobretudo pelo apoio e amizade sincera;
- Ao João M. de Araújo, pela ajuda com as fotos na Microscopia de Luz e pela amizade;
- À Isabel e Ana Lúcia, técnicas do Laboratório de Ecologia, pela dedicação tanto no laboratório como na casa de vegetação;
- Aos funcionários do Departamento de Botânica, pela prontidão em ajudar, sempre que solicitados;
- Aos meus pais, pelo amor e apoio irrestritos;
- Ao CNPq e à FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado, processos 138697/96-5 e 96/12390-0.
- Ao apoio do FAEP/UNICAMP, processo 1123/96.

ÍNDICE

Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Introdução Geral.....	1
CAPÍTULO 1: Caracterização das Reservas, Germinação e Metabolismo Respiratório das Sementes de <i>Tabebuia cassinoides</i>.....	7
1. Introdução.....	8
2. Material e Métodos.....	11
2.1. Caracterização das Reservas.....	11
2.1.1. Análise Citoquímica.....	11
2.1.2. Extração e Quantificação das Reservas.....	12
2.2. Germinação.....	13
2.2.1. Efeito da Luz.....	14
2.2.2. Efeito da Submersão (Hipoxia).....	14
2.2.3. Efeito da Anoxia.....	14
2.3. Quantificação dos Metabólitos: Etanol, Malato e Lactato.....	15
2.4. Delineamento Estatístico.....	16
3. Resultados e Discussão.....	17
3.1. Caracterização das Reservas.....	17
3.2. Germinação.....	20
3.2.1. Efeito da Luz.....	20
3.2.2. Efeito da Hipoxia / Anoxia.....	20
3.3. Quantificação dos Metabólitos: Etanol, Malato e Lactato.....	23
CAPÍTULO 2: Metabolismo Respiratório do Sistema de Raízes de <i>Tabebuia cassinoides</i> sob Hipoxia.....	31
1. Introdução.....	32
2. Material e Métodos.....	33
2.1. Obtenção das Plantas e Delineamento Experimental.....	33
2.2. Quantificação dos Metabólitos: Etanol, Malato e Lactato.....	33

2.3. Delineamento Estatístico	34
3. Resultados e Discussão	35
CAPÍTULO 3: Adaptações Morfo-Anatômicas e Crescimento das Plantas de	
<i>Tabebuia cassinoides</i>	39
1. Introdução	40
2. Material e Métodos	42
2.1. Porosidade das Raízes	42
2.2. Estudo Anatômico	43
2.3. Difusão de O ₂	43
2.4. Avaliação do Crescimento e Respostas Morfológicas	44
2.5. Delineamento Estatístico	44
3. Resultados e Discussão	45
3.1. Porosidade das Raízes	45
3.2. Estudo Anatômico	47
3.3. Difusão de O ₂	49
3.4. Avaliação do Crescimento e Respostas Morfológicas	52
Discussão Geral	59
Considerações Finais	63
Referências Bibliográficas	65

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 -	Desenho de um ramo reprodutivo e da semente de <i>T. cassinoides</i>	18
Figura 2 -	Análise citoquímica das reservas cotiledonares de <i>T. cassinoides</i>	19
Figura 3 -	Efeito da luz na germinação de sementes de <i>T. cassinoides</i>	21
Figura 4 -	Efeito da submersão(hipoxia) e da anoxia na germinação de sementes de <i>T. cassinoides</i>	21
Figura 5 -	Perda da viabilidade das sementes de <i>T. cassinoides</i> após diferentes períodos de submersão total e de anoxia.....	22
Figura 6 -	Efeito da normoxia sobre o conteúdo de metabólitos em sementes de <i>T. cassinoides</i>	24
Figura 7 -	Efeito da submersão parcial sobre o conteúdo de metabólitos em sementes de <i>T. cassinoides</i>	24
Figura 8 -	Efeito da submersão total sobre o conteúdo de metabólitos em sementes de <i>T. cassinoides</i>	26
Figura 9 -	Efeito da anoxia sobre o conteúdo de metabólitos em sementes de <i>T. cassinoides</i>	26

CAPÍTULO 2

Figura 1 -	Efeito do alagamento sobre o conteúdo de metabólitos em raízes de <i>T. cassinoides</i>	36
------------	---	----

CAPÍTULO 3

Figura 1-	Micrografia da raiz lateral de uma planta controle de <i>T. cassinoides</i>	48
Figura 2 -	Micrografia da raiz lateral de uma planta de <i>T. cassinoides</i> alagada por 30 dias.	48
Figura 3 -	Micrografia da raiz lateral de uma planta de <i>T. cassinoides</i> alagada por 30 dias.	49
Figura 4 -	Micrografia da raiz lateral de uma planta de <i>T. cassinoides</i> alagada por 8 meses.....	50
Figura 5 -	Micrografia da raiz lateral (em detalhe) de uma planta de <i>T. cassinoides</i> alagada por 8 meses.....	50
Figura 6 -	Difusão de O ₂ das raízes de <i>T. cassinoides</i> após 2 meses de alagamento.....	51
Figura 7 -	Efeito do alagamento sobre o comprimento da parte aérea de plantas de <i>T. cassinoides</i>	52
Figura 8 -	Efeito do alagamento sobre a iniciação foliar em plantas de <i>T. cassinoides</i>	54
Figura 9 -	Efeito do alagamento sobre a massa seca da raiz e da parte aérea de plantas de <i>T. cassinoides</i>	54
Figura 10-	Plantas de <i>T. cassinoides</i> após 120 dias de alagamento.....	56
Figura 11-	Planta de <i>T. cassinoides</i> após 120 dias de alagamento, com hipertrofia de lenticelas e formação de raiz adventícia.....	57

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Porcentagem dos componentes de reserva extraídos dos cotilédones de <i>T. cassinoides</i>	20
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Porcentagem de espaços de ar na raiz principal e nas raízes laterais de <i>T. cassinoides</i>	46
--	----

RESUMO

Tabebuia cassinoides (Lam.) DC (Bignoniaceae) é uma espécie arbórea que ocorre nas restingas alagadas da planície litorânea. Para elucidar as estratégias adaptativas que possibilitam o estabelecimento da espécie e a ocupação de áreas de solo permanentemente encharcado, foram avaliadas características da sua germinação, as respostas metabólicas e morfo-anatômicas das plantas e o desenvolvimento vegetativo sob condições que limitam o acesso ao oxigênio. As sementes desta espécie não germinaram em anoxia ou quando totalmente submersas, permanecendo viáveis sob estas condições por 15 e 20 dias respectivamente. As sementes aladas alcançaram 100% de germinação enquanto flutuavam na superfície d'água, capacidade essencial para suplantar este estágio inicial em um ambiente alagado. Quanto ao metabolismo das sementes, foi observada uma ativação da via glicolítica, com elevada produção de etanol e lactato, bem como do malato, sendo o primeiro produzido em maior quantidade. Plantas de *T. cassinoides* apresentaram níveis mais altos de etanol apenas nos primeiros dias de saturação hídrica do solo. A presença de espaços intercelulares e a formação de aerênquima sob alagamento, permitiram o transporte de oxigênio da parte aérea para as raízes de forma a manter a respiração aeróbica. Estas características e a capacidade de oxidar a rizosfera, são os fatores responsáveis pela sobrevivência e crescimento vigoroso das plantas enquanto alagadas, garantindo seu sucesso em um ambiente que é restritivo à maioria das espécies.

ABSTRACT

Tabebuia cassinoides (Lam.) DC (Bignoniaceae) is an arboreal species that occurs in swampy areas of the seacoast “restinga”. To elucidate the adaptive strategies which enable the establishment of this species and the occupation of areas of waterlogged soil by it the following characteristics were studied: metabolic and morpho-anatomic responses of seeds during germination and of plants under conditions that limited oxygen access. Seeds of this species did not germinate under anoxia or when under total submersion, remaining viable under these conditions for 15 and 20 days respectively. Wing seeds reached 100% of germination while floating on the water surface, an essential capacity to overcome this initial stage in flooded environments. In relation to the metabolism of the seeds we observed an acceleration of glycolysis with high production of ethanol, lactate and malate, the first one produced in higher amount. The root system of *T. cassinoides* plants presented higher levels of ethanol only in the first days of flooding. The presence of intercellular spaces and the induction of aerenchyma formation under flooding allow oxygen transport from the shoot to the roots maintaining an aerobic respiration. These characteristics and the capacity to oxidise the rizosphere are responsible for the survival and vigorous growth of plants while flooded and for their success in an environment which restricts the presence of the majority of the species.

INTRODUÇÃO GERAL

Os estudos na área de tolerância ao alagamento e deficiência de O_2 nas plantas, tiveram origem nos países temperados e desde então têm sido motivados principalmente por problemas de cultivo em espécies agrícolas, que na maioria dos casos não toleram o encharcamento do solo (Crawford & Brändle, 1996). Tais investigações vêm sendo conduzidas com o objetivo de elucidar as causas primárias da injúria nas espécies agrícolas sensíveis (Jackson et al., 1991). Logo, muito da literatura disponível diz respeito às respostas apresentadas por espécies agrícolas e espécies herbáceas de regiões temperadas.

Nas regiões tropicais, onde existe a maior diversidade de ecossistemas sujeitos a inundações (Joly, 1991), esta linha de pesquisa é mais recente e apresenta um grande potencial para estudos. Nos últimos anos vem crescendo o número de trabalhos motivados a elucidar os mecanismos adaptativos, que permitem a ocorrência de vegetação em locais sazonal ou permanentemente alagados, buscando suprir a grande carência de conhecimento nesta área com espécies arbóreas tropicais.

O alagamento altera muitos processos físico-químicos e biológicos, que influenciam profundamente na qualidade do solo, como meio para o desenvolvimento das plantas. Dentre as modificações que ocorrem destacam-se: a diminuição das trocas gasosas entre solo e ar; acúmulo de gases como N_2 , CO_2 e CH_4 ; produção de muitos hidrocarbonetos, compostos fenólicos, álcoois e ácidos graxos voláteis, devido à anaerobiose; aumento do pH em solos ácidos e diminuição em solos alcalinos e decréscimo considerável do potencial redox (Ponnamperuma, 1984; Gambrell et al., 1991).

As raízes das plantas são particularmente sensíveis à deficiência de O_2 , mostrando um declínio nos níveis de energia (Saglio et al., 1980; Davies et al., 1987), rápido esgotamento das reservas de carboidrato (Saglio et al., 1980) e mudanças no pH citoplasmático (Davies et al., 1987), em consequência destes e de outros fatores, a manutenção das células e a aquisição de nutrientes pode ser impedida (Drew, 1988; Atwell & Steer, 1990) e alterações hormonais induzidas (Reid & Bradford, 1984).

Junto com a observação de que a deficiência de O₂, completa (anoxia) ou parcial (hipoxia) é prejudicial para a maioria das espécies de plantas superiores, surgiu o questionamento se há diferenças fisiológicas fundamentais entre as plantas sob anaerobiose (Crawford & Brändle, 1996). Tentativas surgiram para classificar as plantas em tolerantes ou intolerantes (sensíveis) ao alagamento, a partir das respostas metabólicas que estas apresentavam.

A primeira tentativa de explicar a tolerância ao alagamento em termos metabólicos foi proposta por McManmon & Crawford (1971) na chamada “Teoria metabólica de tolerância ao alagamento”. De acordo com esta teoria, a tolerância das plantas ao alagamento era conferida pela baixa atividade da desidrogenase alcoólica (ADH) e baixa produção de etanol, evitando a toxicidade deste, ao lado do acúmulo do malato, que não é fitotóxico. Embora tenha sido mostrado que os princípios desta hipótese são incorretos (Smith & Ap Rees, 1979; Davies, 1980; Rumpho & Kennedy, 1981 e 1983a; Jackson et al., 1982) , esta incluiu muitos dos fatores (etanol, atividade da ADH e diversificação de produtos fermentativos) que continuam a ser amplamente estudados como fatores importantes na tolerância ao alagamento (Kennedy et al., 1992).

Uma outra hipótese para explicar a tolerância ao alagamento em plantas, envolve a regulação do pH para impedir a acidose citoplasmática. Dados obtidos *in vitro* (Davies et al., 1974) e *in vivo* (Roberts et al., 1984a) levaram à hipótese de que a glicólise láctica em plantas é um fenômeno que controla a transição do metabolismo aeróbico para a fermentação alcoólica. A hipótese de Davies-Roberts considera que durante a transição de normoxia para hipoxia ou anoxia, a lactato desidrogenase (LDH), a qual está presente em níveis baixos sob condições aeróbicas, é a primeira enzima que oxida o NADH gerado pela glicólise. Portanto, o lactato se acumula e diminui o pH citoplasmático. A LDH, que tem um pH ótimo alcalino é inibida conforme o lactato se acumula. Em contraste, as condições de pH mais ácido ativam a piruvato descarboxilase (PDC), a primeira enzima da fermentação alcoólica.

Nas plantas tolerantes ao alagamento a produção de lactato é apenas transiente e o etanol é o principal produto formado, enquanto que nas intolerantes o lactato continuaria sendo produzido, levando à acidose do citoplasma e à morte das células (Roberts et al., 1984a).

Embora evidências a favor desta teoria tenham sido encontradas em várias plantas, esta não serve como uma teoria unificadora para tolerância ao alagamento, já que não opera da mesma maneira em plantas que são reconhecidamente tolerantes ao alagamento (Kennedy et al., 1992).

Para uma revisão maior sobre o impacto da ausência de O_2 sobre a ecologia, fisiologia e bioquímica das plantas, consultar Drew (1990), Jackson et al., (1991), Crawford (1992), Kennedy et al., (1992), Perata & Alpi (1993) e Ricard et al., (1994).

Ao lado das teorias que postulam a ativação de rotas metabólicas para controlar a respiração das plantas quando alagadas, surgiu a teoria do transporte de O_2 (Armstrong, 1967), que pressupõe que as plantas tolerantes apresentam alterações morfo-anatômicas (formação de aerênquima), que possibilitam a difusão do O_2 da parte aérea para as raízes e rizosfera, diminuindo desta maneira o estresse anaeróbico.

Boas revisões sobre o desenvolvimento de aerênquima e as relações hormonais também estão disponíveis na literatura (ver Jackson, 1994 e Armstrong et al., 1994).

Em resumo, não foi encontrada uma resposta única, metabólica ou anatômica, que permitisse classificar as espécies em tolerantes ou não ao alagamento e diante da diversidade das respostas apresentadas pelas plantas, Joly (1991) e Crawford & Brändle (1996) sugerem que dependendo da estratégia de vida e do habitat da espécie, muitos mecanismos diferentes podem estar envolvidos para que as plantas possam sobreviver a períodos de inundação e que nenhum mecanismo sozinho é adequado para garantir a sobrevivência.

Isto reforça a necessidade de um maior número de estudos na área de tolerância ao alagamento, bem como a idéia de que para compreender os fatores

que possibilitam à espécie a ser bem sucedida em uma área sujeita ao alagamento, é necessário estudá-la como um todo, olhando para as respostas morfológicas, anatômicas e metabólicas que são induzidas por esta variável abiótica (Joly, 1994), que podem estar ligadas ao ciclo de crescimento e a estratégias reprodutivas (Blom et al., 1990).

Dentro deste contexto, o presente estudo visa contribuir com informações integradas, sobre as estratégias adaptativas que permitem à *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC se estabelecer e colonizar ambientes sujeitos ao alagamento. *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC (Bignoniaceae) é uma espécie arbórea comumente conhecida como caxeta, tabebuia-do-brejo, pau-de-tamanco e malacaxeta, que ocorre desde Pernambuco até o norte de Santa Catarina, sendo sua frequência descontínua ao longo de sua área de dispersão, ocorrendo apenas nas áreas alagáveis da planície litorânea (Lorenzi, 1992). Nestes locais, o lençol freático se encontra no nível do solo ou acima dele, praticamente ao longo do ano todo, criando uma condição extremamente seletiva, onde apenas espécies bem adaptadas conseguem sobreviver a este estresse.

T. cassinoides apresenta ainda uma importância econômica, uma vez que dentre as espécies brasileiras, possui a melhor madeira para a confecção de lápis, principalmente para a exportação. A nível mundial, perde em qualidade apenas para o cedro americano *Libocedrus decurrens* (Kuniyoshi, 1993).

Este estudo teve por objetivos:

- a) Estudar a fisiologia da germinação das sementes de *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC sob condições distintas de O₂ e correlacioná-la com as possibilidades de germinação e estabelecimento no seu ambiente;
- b) Identificar as principais reservas presentes nas sementes para buscar possíveis relações com as respostas metabólicas durante a germinação;

c) Determinar as estratégias adaptativas que a espécie apresenta para ocupar áreas de solo permanentemente encharcado, avaliando vários aspectos do seu metabolismo, assim como alterações morfo-anatômicas.

**CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DAS RESERVAS,
GERMINAÇÃO E METABOLISMO RESPIRATÓRIO
DAS SEMENTES DE *TABEBUIA CASSINOIDES***

1. INTRODUÇÃO

As sementes da maioria das plantas superiores são incapazes de germinar na ausência de O₂ (Alpi & Beevers, 1983). A germinação anóxica entre as monocotiledôneas foi observada apenas em *Oriza sativa* (Davies, 1980 e Alpi & Beevers, 1983) e *Echinochloa crus-galli* (Kennedy et al., 1980) e entre as dicotiledôneas, em *Chorisia speciosa* (Joly & Crawford, 1983) e *Erythrina caffra* (Small et al, 1977 e 1989). Em todos os casos constatou-se que o crescimento subsequente da plântula requer oxigênio.

Em condições hipóxicas, sementes de espécies de mata ciliar como *Sesbania virgata* (Okamoto, 1995) e *Inga affinis* (Lieberg & Joly, 1993) germinam e dão origem a plântulas que se desenvolvem enquanto submersas, resposta pouco observada em espécies tropicais. Já *Parkia discolor* (Coutinho & Struffaldi, 1971) e *P. pendula* (Scarano & Crawford, 1992), leguminosas que ocorrem nas florestas de igapó e de terra-firme na Amazônia, não germinam enquanto submersas, mas permanecem viáveis nesta condição, por 6 e 7 meses, respectivamente. *Calophyllum brasiliense* (Marques, 1994), espécie típica de locais de solo encharcado, também apresenta sementes que não germinam enquanto submersas, mas se mantem viáveis por 10 semanas nesta condição e germinam quando posteriormente transferidas para condições aeradas. A estratégia que possibilita a presença de *Talauma ovata* (Lobo & Joly, 1996) em ambiente de solo encharcado é a disponibilidade de frutos maduros durante a estação mais seca (quando há micro-sítios favoráveis para a germinação das sementes) e o estabelecimento de plântulas tolerantes à inundação. Estas espécies exemplificam diferentes estratégias de regeneração encontradas e que possibilitam o estabelecimento de plantas em um ambiente que é restritivo à maioria das espécies arbóreas.

Pouco é conhecido sobre os mecanismos adaptativos e sobre a regulação da produção de energia anaeróbica em sementes germinando e muito

do que se conhece vem de estudos com *Oriza sativa* (Perata et al., 1992 e 1993) e *Echinochloa* (Rumpho & Kennedy, 1981 e 1983b).

O estresse anaeróbico em plantas resulta em uma rápida mudança no padrão de expressão dos genes (Sachs et al., 1980). Sob tais condições, a indução do metabolismo fermentativo (Davies, 1980) pode ser considerada como um fenômeno adaptativo para a manutenção da capacidade de síntese de ATP na ausência da respiração aeróbica.

O produto principal da fermentação em plantas é o etanol (Davies, 1980). As duas enzimas da via biossintética do etanol, a piruvato descarboxilase e a desidrogenase alcoólica, são induzidas pelo estresse anóxico (Laszlo & StLawrence, 1983 e Ricard et al., 1986). Porém, a ocorrência de fermentação láctica também tem sido observada em raízes anaeróbicas (Smith & Ap Rees, 1979; Rivoal & Hanson, 1993) e em sementes germinando (King, 1970 e Aldosoro & Nicolas, 1980). Dados obtidos *in vitro* (Davies et al., 1974) e *in vivo* (Roberts et al., 1984a) levaram à hipótese de que nos primeiros minutos de hipoxia, o lactato produzido pela enzima lactato desidrogenase constitutiva, acidifica o citoplasma, induzindo assim a produção de etanol. Qualquer falha na regulação desta via pode levar a acidose e morte celular (Roberts et al., 1984a e 1985).

As evidências experimentais sobre a produção transiente de lactato, precedendo o acúmulo de etanol, são contraditórias. Andreev & Vartapetian (1992) observaram que em algumas espécies de plantas a produção de etanol não foi precedida por lactato e Rivoal & Hanson (1993) verificaram que a fermentação láctica foi mantida por várias horas em algumas espécies do gênero *Limonium*.

Embora haja evidências consideráveis a favor da teoria de Davies-Roberts para a resposta anóxica nas plantas, o papel da produção do lactato durante anoxia e o papel do pH citoplasmático em mediar a transição para o metabolismo anaeróbico não são ainda completamente compreendidos.

Tendo em vista que as sementes de *T. cassinoides* são dispersas na época chuvosa, período em que o solo da restinga se encontra alagado, tornou-se indispensável estudar as características da germinação sob condições limitantes de O₂, para entender a estratégia de regeneração apresentada pela espécie para suplantar este estágio inicial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de *T. cassinoides* foram coletados de diferentes indivíduos no Vale do Ribeira (km 434 da BR 116) e nos municípios de Iguape e Ubatuba (no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Picinguaba, no km 10 da Rodovia Rio-Santos). Os frutos foram coletados antes da sua deiscência a fim de facilitar a coleta das sementes aladas.

2.1. Caracterização das Reservas

2.1.1. Análise Citoquímica

Para a confecção de lâminas permanentes de sementes, as mesmas foram fixadas em FAA 70, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina (Johansen, 1940 e Sass, 1951). Os cortes com espessura de 8 μ m foram obtidos em micrótomo rotativo e foram corados com Azul de Toluidina pH 4,0 (Vidal, 1977) para a visualização das paredes celulares e com Xylidine Ponceau pH 2,5 (Cortelazzo & Vidal, 1991) para a visualização das proteínas. Para detecção dos polissacarídeos neutros, foi utilizado o método de oxidação com ácido periódico e coloração com Reagente de Schiff - Método do PAS (Cortelazzo, 1992). As lâminas foram montadas em resina sintética.

Os grãos de amido foram observados no microscópio de polarização (com analisador e polarizador cruzados), em lâminas coradas pelo Azul de Toluidina. Com este procedimento, os grãos de amido aparecem como corpos brilhantes contra um fundo escuro e apresentam uma cruz escura no centro (Cruz de Malta), devido à interação da estrutura do grão com o sistema de polarizadores.

Para a observação dos lipídios, foi utilizado o Sudam Black B (Jensen, 1962) em cortes de material fresco, feitos a mão livre.

2.1.2. Extração e Quantificação das Reservas

Para as extrações, as sementes foram destituídas da testa e secas em estufa a 80°C por 48 horas e depois moídas em um moinho de facas, sendo reduzidas a pó (farinha).

a) Lipídios: os lipídios foram extraídos a partir de 1g da farinha em hexano-etanol (2:1) no SOHXLET por 6 horas. Após este período de extração, o que restou do pó das sementes foi seco em estufa e pesado. A diferença na massa representa a quantidade de lipídios extraídos da farinha, após descontar a quantidade de açúcares livres que também são extraídos pelo etanol.

b) Proteínas: as proteínas foram extraídas em tubos de ensaio a partir de 50mg de farinha, em 2 amostras. O pó das sementes foi posto primeiramente em metanol-clorofórmio (12:5) durante uma noite para remoção do excesso de lipídios. Após centrifugação a 3000g por 10 minutos, foram adicionados 4ml de NaOH 0,1N ao material insolúvel para a extração das proteínas. Após incubação por 2 horas, os tubos foram novamente centrifugados e o sobrenadante foi coletado. O precipitado foi incubado mais uma vez por 2 horas em 4ml de NaOH 0,1N. Após centrifugação, os sobrenadantes das 2 extrações foram unidos. As dosagens de proteínas foram feitas em duplicata, utilizando-se o Coomassie Blue G-250 (Bradford, 1976), com leituras das absorbâncias em 595nm. Os cálculos para as dosagens foram feitos utilizando-se a curva padrão de BSA de 25 a 100µm.

c) Amido: para a quantificação do amido foram utilizadas 3 amostras com 50mg cada. A farinha foi colocada em metanol, clorofórmio e água (12:5:3) durante uma noite. Após centrifugação a 3000g por 10 minutos, foi adicionado ao precipitado 5ml de ácido perclórico 30%, realizando-se 2 extrações de 2 horas. As dosagens foram feitas em duplicata, utilizando-se o reagente de Antrona (Scott & Melvin, 1953), com leituras das absorbâncias em 620nm e a

quantificação foi realizada pela comparação dos valores obtidos com os de uma reta padrão de glicose de 10 a 70 μ g. Os valores encontrados nas amostras foram multiplicados pelo fator 0,9 para a conversão a amido (McCready et al., 1950).

d) Açúcares livres: a extração dos açúcares livres foi feita em 3 amostras, em tubos eppendorf, onde foram colocados 25mg da farinha e 750 μ l de etanol 80%. A extração foi feita a 80°C por 15 minutos. Após incubação os tubos foram centrifugados a 7800g por 3 minutos e o sobrenadante foi coletado. Mais 750 μ l de etanol 80% foram adicionados ao material insolúvel e a extração foi repetida outras 3 vezes. Os sobrenadantes das extrações foram unidos e secos a baixa pressão com centrifugação (SPEDVAC-HETOVAC VR1-HETO) e ressolubilizados em 1ml de água destilada. As dosagens foram feitas em duplicata pelo método Fenol-Sulfúrico (Dubois et al., 1956), com leituras das absorbâncias em 490nm. A quantificação de açúcares foi feita comparando os valores obtidos com os da reta padrão de glicose de 10 a 70 μ g.

2.2. Germinação

Antes de iniciar os tratamentos, as sementes foram esterilizadas com solução de Micostatin 1000 unidades/ml. Os experimentos foram conduzidos em placas Gerbox (10x10cm) sobre papel de filtro umedecido e mantidos em germinador FANEM sob luz branca, com fotoperíodo de 12 horas e à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A protrusão da radícula foi considerada como critério de germinação.

Foram efetuados diversos testes para avaliar o efeito da luz e o efeito da submersão (hipoxia) e da anoxia na germinação das sementes de *T. cassinoides*. Para tanto, foram montadas 5 repetições com 20 sementes cada.

2.2.1. Efeito da Luz

Para determinar a influência da luz na germinação, foram efetuados os seguintes tratamentos:

- Sementes na presença de luz
- Sementes no escuro

Os ensaios de luz e escuro foram conduzidos segundo a metodologia descrita por Joly & Felipe (1979).

2.2.2. Efeito da Submersão (Hipoxia)

Para verificar o efeito da submersão sobre a germinação, as sementes foram colocadas em placas Gerbox com papel de filtro, contendo 200 ml de água destilada, constando os seguintes tratamentos:

- Sementes controle (mantidas em condições úmidas)
- Sementes parcialmente submersas
- Sementes totalmente submersas

Na condição de submersão parcial, as sementes aladas permaneceram flutuando na água, enquanto que na submersão total, as sementes foram mantidas sob a água, com o auxílio de uma tela de nylon, tipo clarite, dentro das caixas Gerbox.

2.2.3. Efeito da Anoxia

Para a avaliação da capacidade germinativa sob anoxia, sementes foram postas para germinar em jarras anaeróbicas "OXOID", com a utilização de 2 sachets, um proporcionando uma atmosfera anaeróbica e o outro indicando a ausência de oxigênio (após aproximadamente 2 horas) através da mudança de cor rósea para branca. Foram efetuadas 6 repetições contendo 10 sementes em placas de Petri com papel de filtro umedecido.

Para avaliar a capacidade de recuperação das sementes ao final de cada tempo de tratamento, 3 placas contendo 10 sementes parcialmente e totalmente submersas e sob anoxia, foram transferidas para condições normais de oxigênio, para que o desenvolvimento fosse acompanhado.

2.3. Quantificação dos Metabólitos: Etanol, Malato e Lactato

A avaliação do conteúdo de etanol, malato e lactato após 0,5; 1; 2; 3; 5; 10; 15 e 20 dias, foi realizada nos seguintes tratamentos:

- Sementes mantidas em condições úmidas (controle)
- Sementes parcialmente submersas
- Sementes totalmente submersas
- Sementes mantidas em anoxia

Cada tratamento constou de 6 repetições contendo 5 sementes cada.

Ao final de cada tratamento, as sementes foram colocadas em nitrogênio líquido, homogeneizadas em triturador TECNAL modelo TE 138 com a adição de 10ml de ácido perclórico (6%), para obtenção do extrato. Em seguida, este foi centrifugado a 3000g por 20 minutos a 0°C. O sobrenadante foi neutralizado com K_2CO_3 5M, acompanhado pela adição prévia do corante alaranjado de metila (0,5mg/ml), levando à precipitação de um sal, o perclorato de potássio, que após 1 hora em geladeira é decantado. O sobrenadante foi retirado, o volume final aferido e o extrato foi então congelado.

Antes de serem analisados, os extratos foram descongelados e centrifugados para a eliminação de partículas em suspensão, em microcentrífuga HERMLE modelo Z 230 por 1 minuto em alta velocidade, o pH foi avaliado e, quando necessário, corrigido para pH 7,0.

A quantificação de etanol, lactato e malato, foi determinada pelo registro da redução de NAD a NADH a 340nm em espectrofotômetro BECKMAN DU-65, com a utilização de kits de ensaio (Boehringer, Mannheim, Germany) conforme descrito por Joly & Brändle (1995). No caso

do etanol, ele foi avaliado nas sementes e também no meio onde estas estavam parcial ou totalmente submersas.

2.4. Delineamento Estatístico

A análise dos resultados da quantificação de metabólitos (etanol, malato e lactato), foram baseados na ANOVA e a DMS foi determinada pelo teste de Tukey (5%) (Sokal & Rohlf, 1979).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A semente de *T. cassinoides* possui uma ala de consistência membranácea (Figura 1), podendo ser dispersa tanto pelo vento quanto pela água. Apresenta um endosperma escasso, estando a grande parte das reservas presente nos cotilédones.

3.1. Caracterização das Reservas

A Figura 2 mostra a análise citoquímica das reservas cotiledonares. O Azul de Toluidina (Figura 2A) foi utilizado para a detecção de radicais aniônicos (substâncias pécticas das paredes celulares principalmente). As paredes coradas são finas, não apresentando papel de reserva. No detalhe desta figura observa-se a presença de pequenos grãos de amido, visualizados por polarização. Xylidine Ponceau (Figura 2B) foi utilizado para a detecção de radicais catiônicos (grupos amina do material protéico) e o PAS (Figura 2C) para polissacarídeos neutros. Os grânulos de reserva coraram-se fortemente pelo Xylidine Ponceau e fracamente pelo PAS, o que sugere que a natureza destes seja provavelmente glicoprotéica. Para a visualização de lipídios (Figura 2D) foi empregado o Sudam Black B, que cora os lipídios de marrom-escuro a preto. A análise das reservas cotiledonares nas sementes de *T. cassinoides* mostrou que estas são constituídas principalmente por glicoproteínas e lipídios.

As extrações feitas a partir da farinha das sementes de *T. cassinoides* mostraram que os lipídios representam 26% da massa seca dos cotilédones, enquanto que as proteínas representam 8,58% (Tabela 1). Provavelmente, somente uma fração das proteínas foi extraída, subestimando o total, já que a citoquímica mostrou a riqueza dos grânulos de proteína nas células de reserva (Figura 2B). O total das reservas extraídas (52,3%) foi baixo provavelmente em função da pequena quantidade de proteína que foi extraída.



Figura 1 - Desenho de um ramo reprodutivo e da semente de *T. cassinoides*.

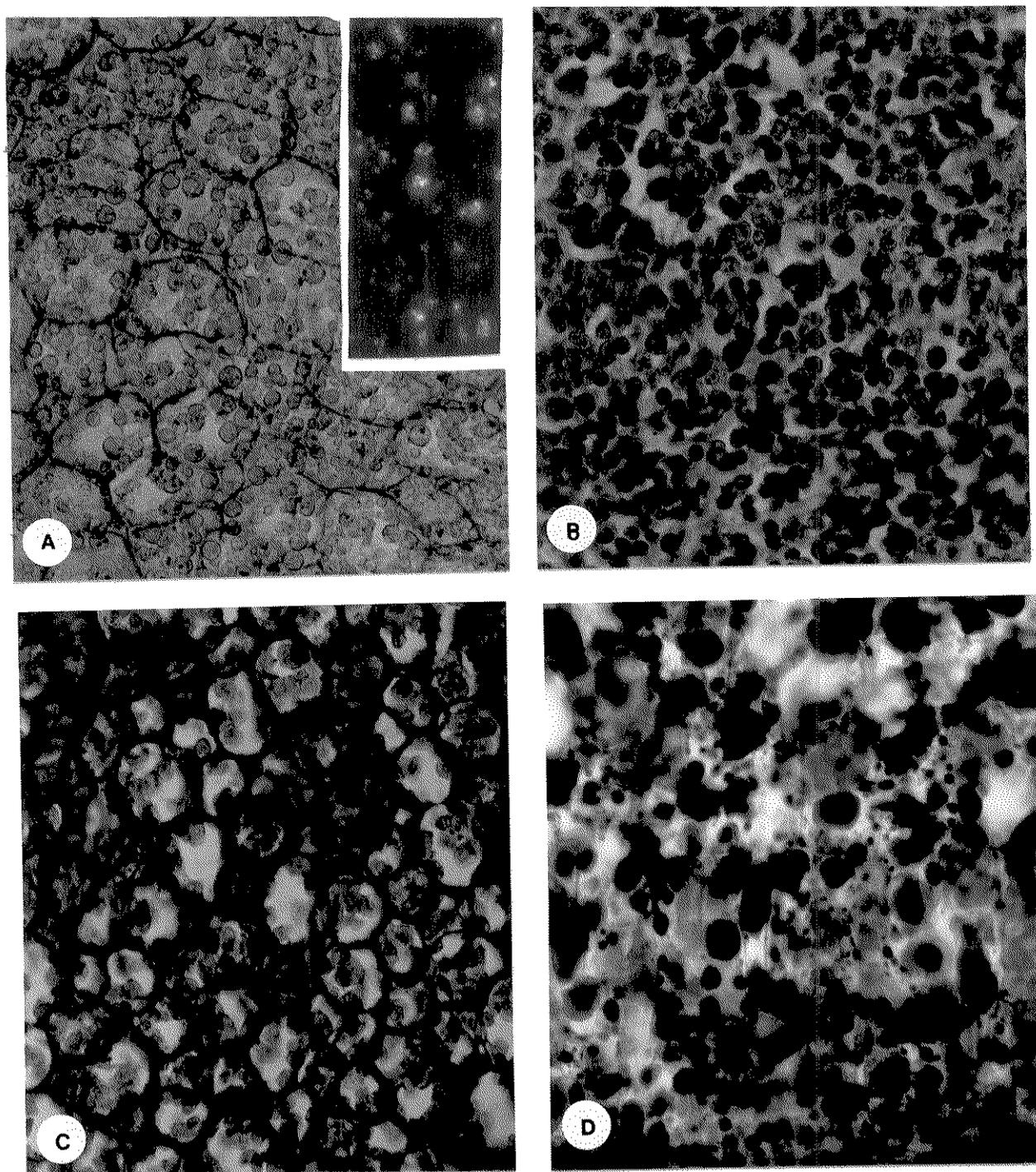


Figura 2 - Análise citoquímica das reservas cotiledonares de *T. cassinoides*. A: Azul de Toluidina (luz polarizada no detalhe), B: Xylidine Ponceau, C: PAS, D: Sudam Black B. 400x.

Quanto aos carboidratos (Tabela 1), as extrações mostraram uma pequena quantidade de amido (0,7%) e uma presença considerável de açúcares livres (17,3%).

Tabela 1 - Porcentagem dos componentes de reserva extraídos dos cotilédones de *T. cassinoides*.

Componente	(%)
Lipídios	26,0
Proteínas	8,6
Açúcares livres	17,3
Amido	0,7
Total	52,3

3.2. Germinação

3.2.1. Efeito da Luz

As sementes de *T. cassinoides* não são fotoblásticas, atingindo 100% de germinação com 7 dias na luz e com 10 dias no escuro (Figura 3). Na luz, as sementes começaram a germinar com 2 dias de embebição. Já no escuro, verificou-se um pequeno atraso, com as sementes iniciando a germinação no terceiro dia de tratamento (Figura 3).

3.2.2. Efeito da Hipoxia / Anoxia

Sementes de *T. cassinoides* não germinaram em submersão total e em anoxia (Figura 4). A ausência de germinação em submersão total foi acompanhada por 20 dias e em anoxia por 15 dias, períodos nos quais todas as sementes perderam a viabilidade (Figura 5).

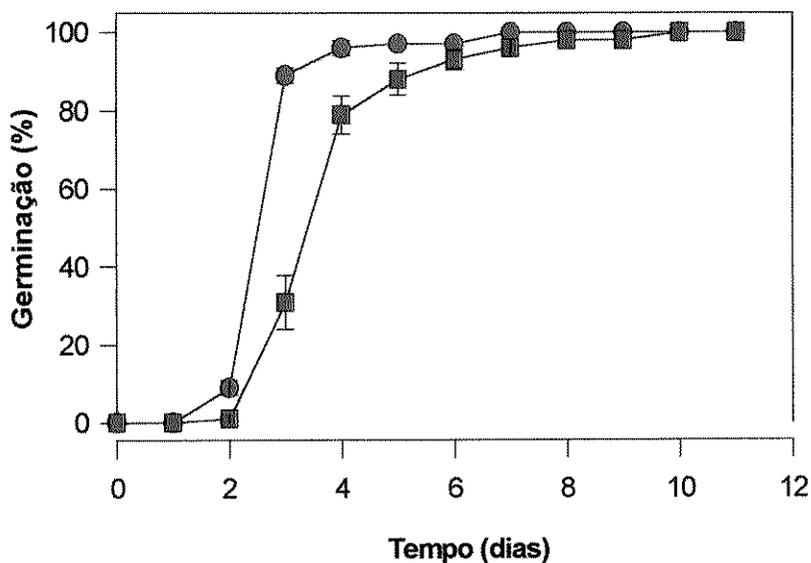


Figura 3 - Efeito da luz na germinação de sementes de *T. cassinoides*. Dados representam média \pm erro padrão, $n=5$ repetições com 20 sementes cada. (●) Luz (■) Escuro.

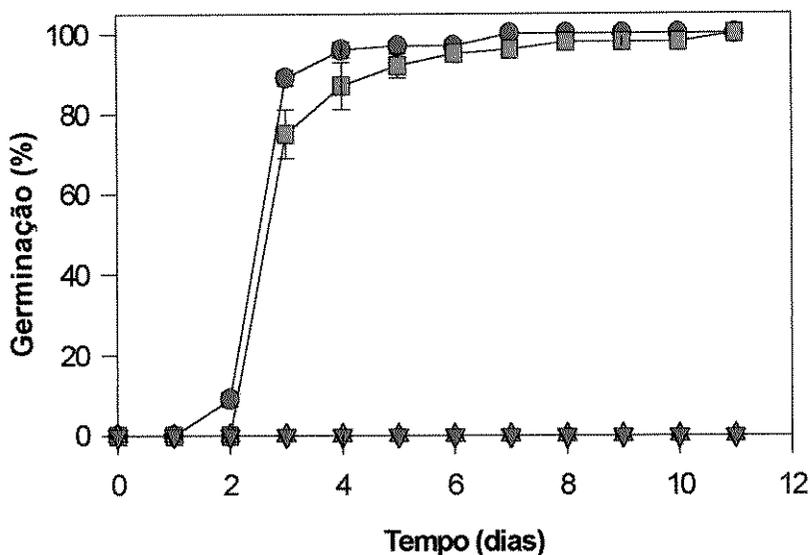


Figura 4 - Efeito da submersão (hipoxia) e da anoxia na germinação de sementes de *T. cassinoides*. Dados representam média \pm erro padrão, $n=5$ repetições com 20 sementes cada. (●) Normoxia (■) Submersão parcial (▲) Submersão total (▼) Anoxia.

A perda da viabilidade das sementes mantidas em submersão total ou em anoxia, indica o efeito prejudicial da anaerobiose. O mesmo resultado foi

observado em sementes de *Parapiptadenia rigida* e *Cedrela fissilis* após 10 e 20 dias de submersão, respectivamente (Marques et al., 1992) e em *Talauma ovata* (espécie higrófito) após 30 dias de submersão (Lobo & Joly, 1996).

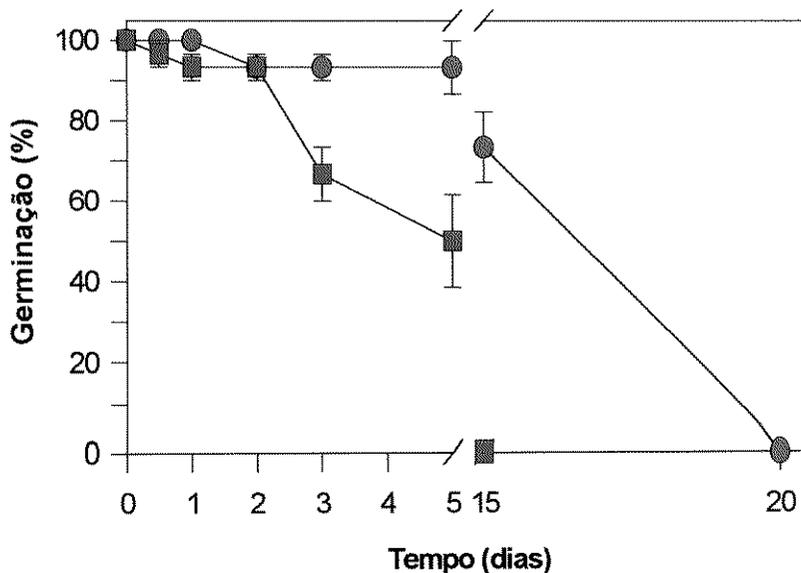


Figura 5 - Perda da viabilidade das sementes de *T. cassinoides* após diferentes períodos de submersão total e de anoxia. Dados representam média \pm erro padrão, n=3 repetições com 10 sementes cada. (●) Submersão total (■) Anoxia.

Sementes em normoxia e parcialmente submersas atingiram 100% de germinação (Figura 4).

Sementes parcialmente submersas iniciaram a germinação com um dia de atraso, que no entanto, parece ser irrelevante, já que sementes parcialmente submersas germinaram em grande número (75%) já no primeiro dia de germinação quando comparadas às sementes em normoxia, que iniciaram a germinação com 9% (Figura 4).

Além da capacidade de protrair a radícula em condições de submersão parcial, foi observado também o crescimento desta sob a água. Após alguns dias, os cotilédones também protraíam e tornavam-se fotossintetizantes, originando plântulas que permaneciam flutuando com essas estruturas na superfície d'água ou abaixo dela. As plântulas sobreviveram a um mês nestas condições. Como na natureza as sementes de *T. cassinoides* são dispersas na época chuvosa, período em que o solo se encontra alagado, esta característica

de germinar flutuando na água e de desenvolver a radícula sob a água, possibilita o estabelecimento, desde que estas tenham condição de se fixar a um substrato. Scarano et al. (1997) observaram plântulas de *T. cassinoides* crescendo dentro dos tanques de bromélias terrestres e sugerem que o liter aprisionado nestas cavidades formem um “solo suspenso”, fornecendo um sítio seguro para a germinação. *T. cassinoides* também apresenta reprodução vegetativa (Kuniyoshi, 1993), parecendo ser vantajoso para a espécie manter as características genéticas que permitem a colonização de um ambiente tão inóspito para a maioria das espécies.

3.3. Quantificação dos Metabólitos: Etanol, Lactato e Malato

Sementes postas para germinar em condições de normoxia (Figura 6) e em submersão parcial (Figura 7) apresentaram um comportamento semelhante quanto a produção dos metabólitos analisados.

As figuras mostram já no tempo zero, uma alta concentração de etanol nas sementes. Uma possível explicação para isso seria uma condição hipóxica criada pela compactação das sementes (Figura 1) e pela própria casca do fruto. Este fato, aliado à alta umidade das sementes dentro do fruto fechado, poderia justificar a presença do etanol, que é um produto do metabolismo fermentativo, em grande quantidade já no tempo zero.

Durante a embebição das sementes ocorreu a ativação da via glicolítica, levando a uma grande produção de etanol, lactato, bem como de malato, sendo o primeiro produzido em maior quantidade (Figuras 6 e 7).

É importante lembrar que, a quantidade de etanol detectada nas sementes não reflete a quantidade total produzida, uma vez que este pode ser facilmente eliminado (Bertani et al., 1980; Rumpho & Kennedy, 1981). Nas sementes parcialmente submersas, foi observado que 50% do etanol produzido

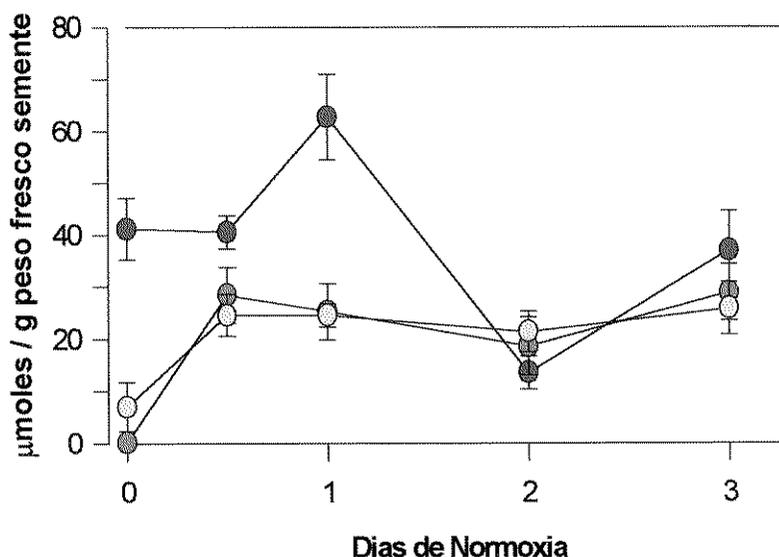


Figura 6 - Efeito da normoxia sobre o conteúdo de metabólitos em sementes de *T. cassinoides*. Dados representam média \pm erro padrão, n=6. (●) Etanol (○) Lactato (◐) Malato.

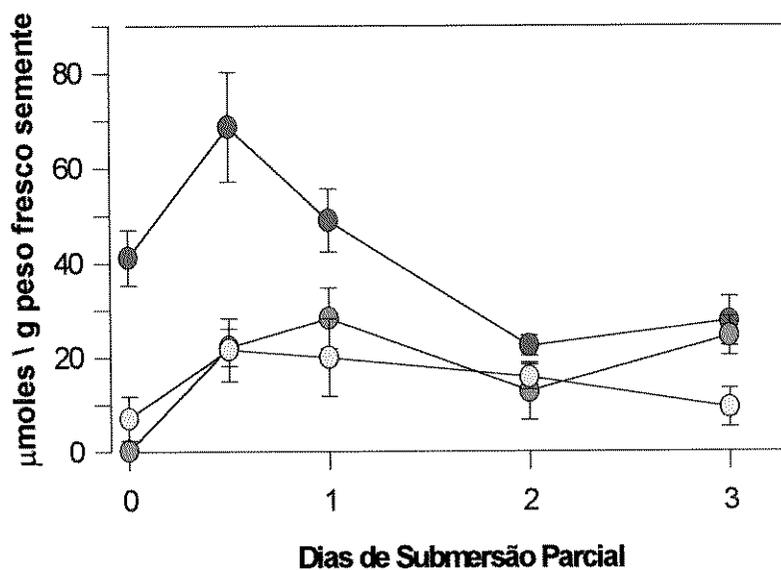


Figura 7 - Efeito da submersão parcial sobre o conteúdo de metabólitos em sementes de *T. cassinoides*. Dados representam média \pm erro padrão, n=6. (●) Etanol (○) Lactato (◐) Malato.

estava no meio (na verdade, a quantidade de etanol que se difundiu para o meio pode ser ainda maior, já que o etanol é volátil e parte dele pode ter evaporado e não ter sido quantificado).

Mesmo sob condições bem aeradas, é comum a ocorrência do acúmulo de etanol e/ou lactato nas sementes que estão embebendo. Tanto em *Erythrina caffra* (Small et al., 1989) quanto em *Echinochloa crus-galli* (Rumpho & Kennedy, 1981) foi encontrada uma grande quantidade de etanol durante o período de embebição das sementes em aerobiose.

As sementes após embebição e antes da ruptura da testa, passam por um período de anaerobiose natural, uma vez que com a embebição ocorre a aceleração do metabolismo, aumentando a demanda por O₂ (Crawford, 1977 e 1992). Este fenômeno se acentua no caso de haver uma pequena penetração de O₂ através da casca da semente intacta. Após a ruptura da casca, devido à hidratação dos cotilédones ou protrusão da radícula, a reposição de O₂ é facilitada (Cossins, 1978; Côme et al., 1991). Em algumas espécies, qualquer prolongamento do período de anaerobiose natural, seja porque a semente está submersa ou porque está enterrada em solo encharcado, pode resultar em morte (Crawford, 1977).

A partir do segundo dia de embebição (Figuras 6 e 7), a quantidade de etanol presente nas sementes tende a diminuir. Com a protrusão da radícula e posteriormente a protrusão dos cotilédones, o nível dos produtos da fermentação provavelmente diminui e o metabolismo aeróbico deve ser então totalmente retomado.

Sementes totalmente submersas (Figura 8) e em anoxia (Figura 9) também apresentaram uma ativação da via glicolítica, com um dia de embebição. Novamente o etanol foi o principal produto formado, mas ao lado da produção expressiva do lactato e do malato.

Há indicações cada vez maiores de que o etanol é o principal produto da fermentação em plantas (Smith & Ap Rees, 1979; Raymond et al., 1983 e Hoffman et al., 1986). O acúmulo de outros produtos sob anoxia, tais como alanina (Smith & Ap Rees, 1979; Reggiani et al., 1988), succinato (Vanlerberghe et al., 1990), chiquimato (Crawford & Tyler, 1969), malato (Crawford & Tyler, 1969; McManmon & Crawford, 1971) e lactato (Vanlerberghe et al., 1990 e Rivoal & Hanson, 1993), também foram

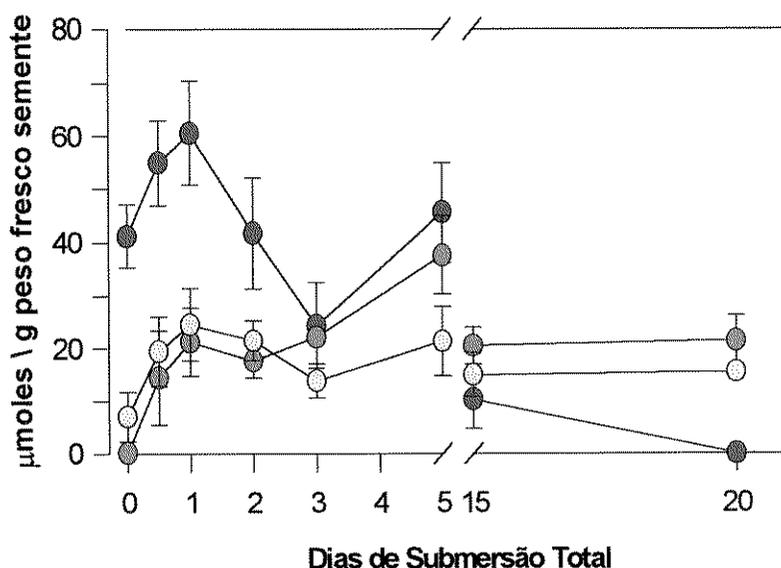


Figura 8 - Efeito da submersão total sobre o conteúdo de metabólitos em sementes de *T. cassinoides*. Dados representam média \pm erro padrão, $n=6$. (●) Etanol (◐) Lactato (○) Malato.

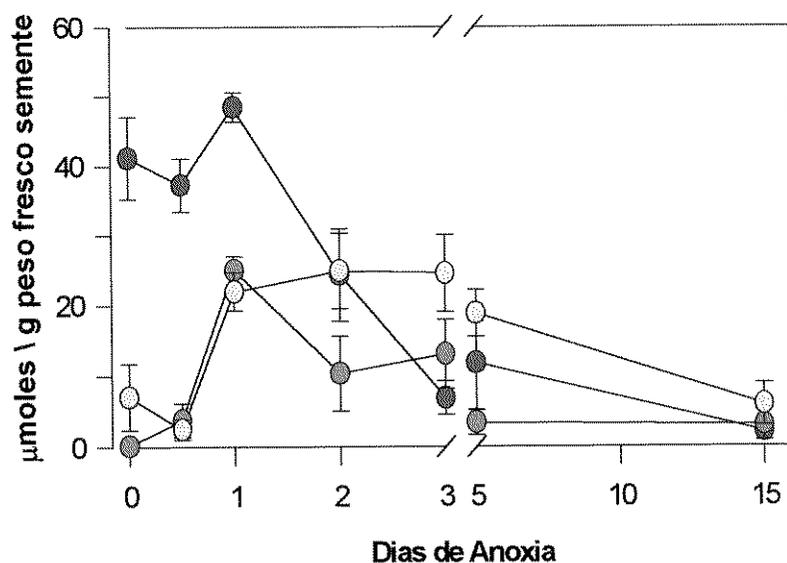


Figura 9 - Efeito da anoxia sobre o conteúdo de metabólitos em sementes de *T. cassinoides*. Dados representam média \pm erro padrão, $n=6$. (●) Etanol (◐) Lactato (○) Malato.

observados, mas com exceção do lactato, a quantidade destas substâncias é geralmente negligenciável, quando comparado ao etanol (Raymond et al., 1985). O acúmulo de quantidades significativas de lactato, em comparação ao etanol, foi encontrado sob anoxia em sementes de *Raphanus sativus*

(Raymond et al., 1985) e, em raízes de algumas espécies do gênero *Limonium*, o lactato chega a ser o maior produto da fermentação, formado sob um período longo de anoxia (Rivoal & Hanson, 1993), refletindo possivelmente a operação de um sistema eficiente de regulação do pH, impedindo a acidificação. Rivoal & Hanson (1993) sugerem que a produção de lactato sob um período longo de anoxia serviria para conservar o carbono fixado, uma vez que este é menos volátil do que o etanol.

Nas sementes totalmente submersas de *T. cassinoides*, foi observado mais uma vez que o etanol se difunde facilmente para o meio (50% ou mais do etanol produzido pelas sementes foi encontrado no meio).

Rumpho & Kennedy (1981) observaram que 85% do etanol produzido por sementes de *Echinochloa cruz-gali* var. *oryzicola*, foram eliminados para o meio externo e sugeriram que isto poderia ser importante para evitar o acúmulo num nível tóxico deste metabólito. Bertani et al. (1980) propuseram que um dos mecanismos mais importantes para a tolerância da anaerobiose em plântulas de arroz, é o acoplamento de um forte sistema de fermentação alcoólica com a capacidade de liberar o etanol produzido. Em seus experimentos, 98% do etanol produzido estava presente no meio externo.

A quantidade dos produtos do metabolismo anaeróbico, durante o período de embebição das sementes de *T. cassinoides*, foi semelhante nos 4 tratamentos (Figuras 6-9). Houve uma ativação da via glicolítica em todos os tratamentos e provavelmente o que possibilitou que sementes em normoxia e parcialmente submersas germinassem, foi o maior acesso ao O₂. Com isso, sementes em normoxia e parcialmente submersas puderam contar com o funcionamento de um metabolismo parcialmente aeróbico durante a embebição, o que deve ter resultado em maior produção de energia para a germinação. Em anoxia e em submersão total, as sementes contaram somente ou praticamente com a energia produzida pelo metabolismo anaeróbico que, neste caso, parece ser suficiente apenas para manter a viabilidade das sementes por 15 e 20 dias, respectivamente.

A perda da viabilidade das sementes pode ser o resultado do gasto excessivo de substrato respiratório com o funcionamento da via fermentativa e/ou do efeito tóxico dos metabólitos produzidos (etanol \ lactato).

Al-Ani et al. (1985) e Raymond et al. (1985), relacionaram a capacidade de germinar sob baixa pressão de O_2 com a natureza das reservas das sementes e mostraram que sementes oleaginosas são incapazes de germinar em pressões parciais de O_2 que dificilmente afetam a germinação de sementes ricas em carboidratos de reserva.

A degradação de lipídios requer mais O_2 em comparação aos carboidratos (Armstrong et al., 1994), fato que poderia explicar as diferenças observadas na capacidade germinativa sob anoxia entre sementes que são ricas em lipídios e aquelas que são ricas em carboidratos.

Independente da ocorrência da germinação, parece correto pensar que a disponibilidade de carboidratos seja necessária para o sustento da fermentação ativa, que irá produzir a energia para a manutenção do metabolismo celular durante uma incubação longa sob anaerobiose.

Vale ressaltar que além da presença de grandes reservas de amido é necessário também, que as enzimas responsáveis pela sua degradação estejam ativas. Grandes diferenças na capacidade para germinar em anoxia, são também observadas entre sementes que armazenam carboidratos.

Perata et al. (1992) observaram que enquanto sementes de arroz apresentam indução da α -amilase sob anoxia, concomitante com a degradação de amido e a germinação anaeróbica, as sementes de trigo são incapazes de produzir α -amilase e conseqüentemente não degradam amido e não germinam sob estas condições. Os autores mostraram ainda que sementes de trigo podem germinar sob anoxia quando glicose ou sacarose são fornecidos exogenamente, sugerindo que a quantidade de açúcares solúveis presentes na semente não é suficiente para permitir um metabolismo anaeróbico eficiente que leve a germinação.

Em um estudo posterior, Perata et al. (1993) mostraram que somente arroz é capaz de sintetizar α -amilase sob anoxia, enquanto outras sementes de cereais (trigo, cevada, aveia e centeio) não o são e não germinam.

As sementes de *T. cassinoides* apresentam glicoproteínas e lipídios como reservas principais (Figura 2). Possuem ainda, uma quantidade menor mas apreciável de açúcares livres (Tabela 1), que podem ser prontamente fermentados e uma quantidade pequena de amido (Tabela 1). Assim, parece coerente que sob anaerobiose, as sementes desta espécie não germinem e que os carboidratos (presentes em menor proporção), tenham sido utilizados para produção de energia suficiente apenas para a manutenção da viabilidade.

No entanto, em muitos casos, a morte celular ocorre antes da exaustão do substrato fermentável. Logo, os estudos metabólicos da sobrevivência de tecidos de plantas na ausência de O_2 , têm se concentrado na possível toxicidade dos produtos finais da fermentação (Ricard et al., 1994). Hoje se sabe, que a toxicidade do etanol é menor do que previamente relatado (Jackson et al., 1982). Contudo, alguns efeitos tóxicos da fermentação alcoólica têm sido atribuídos ao acetaldeído (Monk et al., 1987; Perata & Alpi, 1991).

A regulação do pH citossólico é também considerada como um fator determinante da sobrevivência dos tecidos das plantas em anoxia (Roberts et al. 1984a e 1985). A acidificação do citossol tem sido relacionada ao lactato (Roberts et al., 1984b e 1992) e à diminuição nos níveis de ATP (Saint-Ges et al., 1991). Acidificação podendo ser o resultado tanto da inibição do bombeamento de prótons, na baixa concentração de ATP como da liberação de prótons através da hidrólise do ATP (Ricard et al., 1994).

A maior capacidade de sobreviver em anoxia, tem sido relacionada com a menor produção de lactato nos materiais vegetais (Rivoal et al., 1991). Em tecidos de aleurona de cevada (os quais produzem grandes quantidades de lactato), a capacidade de sobreviver em hipoxia foi relacionada com a excreção de lactato para o meio (Hanson & Jacobsen, 1984). Similarmente, foi encontrado uma excreção grande e sustentada de lactato por raízes anóxicas de

algumas espécies do gênero *Limonium*, tolerantes à anaerobiose (Rivoal & Hanson, 1993) e também por raízes hipóxicas de cevada (Hoffman et al., 1986).

Quanto ao malato, seu papel ainda não é claro em relação a tolerância à anaerobiose (veja Crawford, 1978; Keeley, 1978; Smith & Ap Rees, 1979; Davies, 1980; Ap Rees et al., 1987 e Joly, 1994).

A produção significativa de malato e lactato juntamente com a produção de etanol em sementes de *T. cassinoides*, parece ser uma estratégia para impedir o acúmulo de níveis muito altos de qualquer um dos metabólitos em questão. O mesmo foi observado e sugerido por Joly (1994) para raízes de *Chorisia speciosa* no início do alagamento. Crawford (1978) cita a diversificação dos produtos finais glicolíticos como sendo uma estratégia de sobrevivência na ausência de O₂.

Os resultados obtidos a partir do estudo da germinação das sementes de *T. cassinoides*, sob condições distintas de disponibilidade de O₂, mostraram que a capacidade de germinar flutuando na água pode ser essencial para o estabelecimento da espécie em condições de solo alagado. Diante deste quadro, tornou-se necessário para compreender a ampla dominância da caxeta em áreas que passam a maior parte do ano encharcadas, um estudo das respostas metabólicas do sistema de raízes das plantas, quando submetidas ao alagamento. O próximo capítulo é dedicado a este estudo.

**CAPÍTULO 2: METABOLISMO RESPIRATÓRIO
DO SISTEMA DE RAÍZES DE *TABEBUIA*
CASSINOIDES SOB HIPOXIA**

1. INTRODUÇÃO

O alagamento altera muitos processos físico-químicos e biológicos, que influenciam profundamente na qualidade do solo, como meio para o desenvolvimento das plantas (Ponnamperuma, 1984). Estas modificações influenciam diretamente o metabolismo do sistema de raízes de diferentes espécies.

Quando o solo alaga e as temperaturas são relativamente altas, o que estimula a respiração, o O_2 dissolvido na água ou preso nas cavidades de ar, é rapidamente consumido pela respiração das raízes das plantas e pelos microrganismos do solo (Purvis & Williamson, 1972). Como a difusão de O_2 é muito menor na água do que no ar, a reposição desse gás no solo alagado é muito ineficiente, forçando a mudança do metabolismo aeróbico das plantas para o anaeróbico (Kawase, 1981).

Etanol e lactato (Bertani et al., 1980), bem como alanina (Bertani & Brambilla, 1982a; Reggiani et al., 1988), são freqüentemente detectados nas raízes de plantas alagadas e a formação destes, através do metabolismo anaeróbico da glicose, é responsável pela produção de energia no sistema de raízes dessas plantas. A produção de ATP pelo metabolismo anaeróbico é baixa quando comparada àquela do metabolismo aeróbico e Joly & Crawford (1982) sugeriram que esta baixa energia produzida poderia ser compensada por uma aceleração da glicólise. Concentrações elevadas de malato também são frequentemente encontradas nas raízes de plantas, quando submetidas a condições que restringem o acesso ao O_2 (Keeley, 1978; Bertani & Brambilla, 1982b; Joly & Crawford, 1982; Schlüter et al., 1993).

Objetivando estudar o metabolismo anaeróbico nas raízes de plantas de *T. cassinoides*, estas foram então alagadas e os níveis de etanol, malato e lactato quantificados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das Plantas e Delineamento Experimental

Em abril de 1996, vários frutos de *T. cassinoides* foram coletados no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Picinguaba. As sementes foram postas para germinar em placas Gerbox sobre papel de filtro umedecido e mantidas em germinador. As plântulas assim obtidas foram transplantadas para areia grossa, contida em sacos confeccionados com tela de nylon, com malha de 1mm e capacidade de 2 litros.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, recebendo água duas vezes ao dia e solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1938) a 10% a cada 15 dias, até o início dos experimentos.

Na segunda quinzena de novembro foi montado o experimento para avaliação da tolerância das plantas ao alagamento e os possíveis mecanismos de resposta envolvidos.

O experimento constou de 2 tratamentos:

- Plantas controle: regadas duas vezes ao dia;
- Plantas alagadas: mantidas em tanques, com a lâmina d'água permanecendo a 3 cm acima da superfície do solo. A água dos tanques foi coberta com plástico preto para minimizar o crescimento de algas e uma possível oxigenação da água. Sobre o plástico foi colocada uma camada de papel alumínio para evitar seu aquecimento. A água dos tanques foi trocada a cada 20 dias aproximadamente.

2.2. Quantificação dos Metabólitos: Etanol, Malato e Lactato

A avaliação do conteúdo de etanol, malato e lactato, foi realizada em raízes de 6 plantas controle após 30 e 60 dias e em raízes de 6 plantas submetidas a 1, 5, 15, 30, 60 e 120 dias de alagamento.



As plantas foram rápida e cuidadosamente removidas dos sacos, as raízes lavadas, cortadas, postas em N₂ líquido para bloquear a atividade metabólica e evitar a evaporação do etanol, se presente e pesadas, obtendo-se cerca de 0,3 a 0,5g de material para a extração. O procedimento para extração e análise foi o mesmo já descrito para sementes no Capítulo 1 (item 2.3.).

Como as plantas jovens não apresentavam um grande número de raízes laterais, praticamente todas as raízes foram utilizadas para a extração, não sendo possível a utilização apenas das regiões apicais, tidas como as de maior atividade metabólica.

Como o conteúdo dos metabólitos foi semelhante nas raízes de plantas controle, nos 2 tempos de tratamento, optou-se por apresentar graficamente, a média obtida nas duas extrações realizadas.

2.3. Delineamento Estatístico

As análises estatísticas basearam-se na ANOVA e determinou-se a DMS pelo teste de Tukey (5%) (Sokal & Rohlf, 1979).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1A mostra que plantas controle apresentaram uma concentração média de etanol de 5,2 $\mu\text{mol/g}$ de peso fresco de raiz, enquanto que plantas alagadas por 5 dias apresentaram uma concentração de 10,6 $\mu\text{mol/g}$ de peso fresco de raiz, indicando um aumento significativo de 2,04 vezes em plantas alagadas. Com 15 dias de alagamento a concentração de etanol diminuiu, chegando ao nível das plantas controle. A presença de etanol, mesmo que em pequena quantidade nas plantas controle, indica que também nestas, a via fermentativa é funcional. Isto pode ocorrer porque certas regiões da raiz, principalmente meristemas apicais, representam áreas onde existe uma maior compactação das células, dificultando o acesso ao O_2 ou porque são metabolicamente muito ativas e o O_2 disponível pode não atender a demanda, fazendo com que nestas regiões, o metabolismo seja desviado para rotas anaeróbicas.

Com relação ao lactato (Figura 1B), não foi observado nenhum acúmulo significativo deste em plantas alagadas, evitando assim uma possível acidificação do citoplasma celular, o que leva algumas plantas à morte (Roberts et al., 1984a).

Quanto ao malato (Figura 1C) foi observado um acúmulo significativo deste com 15 e 120 dias de alagamento. A menor produção de malato com 30 e 60 dias pode ter ocorrido em função da necessidade de se trabalhar com grupos diferentes de plantas, já que a quantificação dos metabólitos é uma medida destrutiva.

Nyssa silvatica (Keeley, 1978) e *Astrocaryum jauari* (Schlüter et al., 1993), ambas espécies tolerantes ao alagamento, mostraram um aumento considerável de malato em suas raízes quando inundadas. A razão para este acúmulo não está relacionada à produção de energia anaeróbica pela planta, se levado em consideração que esta via é mediada pela fosfoenolpiruvato

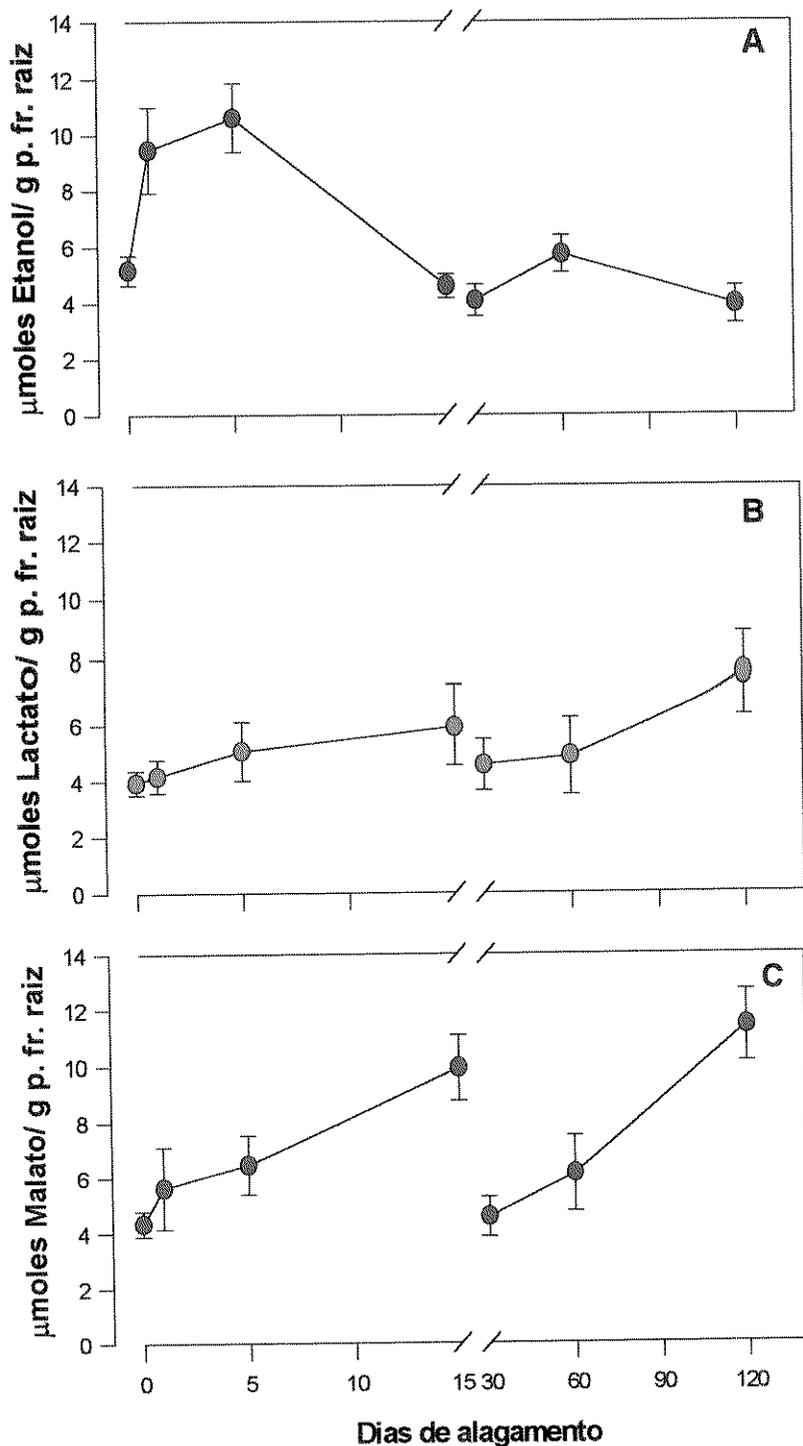


Figura 1 - Efeito do alagamento sobre o conteúdo de metabólitos em raízes de *T. cassinoides*. A: etanol, B: lactato e C: malato. Dados representam média \pm erro padrão, n=6.

carboxilase (Smith & Ap Rees, 1979; Davies, 1980). Se a fosfoenolpiruvato carboxiquinase estivesse envolvida na produção de malato, ocorreria a formação de 2 moles de ATP por mol de glicose (Davies, 1980). Esta enzima,

no entanto, foi encontrada apenas em uma planta tolerante ao alagamento - *Carex arenaria* (McManmon & Crawford, 1971) e suas propriedades não têm sido descritas, de forma que o seu papel na produção de malato é difícil de avaliar (Davies, 1980).

Uma hipótese já sugerida foi a de que o malato pode se acumular em resposta a um desequilíbrio iônico nas raízes (Keeley, 1978). Numerosos estudos mostram que o conteúdo de malato aumenta nas raízes, quando cátions são absorvidos em excesso em relação aos ânions, devido a um aumento na concentração de cátions no meio (Jacobson & Ordín, 1954; Hiatt, 1967 e Jacoby & Laties, 1971), já que com o alagamento várias características do solo são radicalmente alteradas. Para Ernst (1990), o acúmulo de malato é mais do que um modo de balancear um desequilíbrio iônico e sugere que este pode funcionar como lançadeira, transferindo cátions como ferro e manganês do citoplasma para o vacúolo.

Já que o acúmulo de malato nas raízes de *T. cassinoides*, possivelmente não está relacionado com a produção de energia, que não houve alteração nos níveis de lactato e que a quantidade de etanol diminuiu com 15 dias de alagamento, igualando-se àquela de plantas controle, parece provável que uma estratégia metabólica de tolerância ao alagamento nesta espécie, assuma um papel menor.

Na literatura há controvérsias sobre qual resposta, se a anatômica ou a metabólica, é a mais importante para a sobrevivência das plantas e para a capacidade competitiva em condições alagadas (Armstrong, 1979; Tripepi & Mitchell, 1984).

Alguns autores como Joly & Crawford (1982), Joly (1994) e Crawford & Brändle (1996), sugerem que a importância destas adaptações metabólicas e anatômicas varia de espécie para espécie. Conseqüentemente, a compreensão da estratégia que permite à uma determinada espécie ocupar áreas sazonal ou permanentemente alagadas, exige o estudo integrado das respostas metabólicas e anatômicas de indivíduos submetidos à saturação hídrica do solo. No próximo capítulo são apresentados e discutidos os resultados relativos aos aspectos anatômicos.

**CAPÍTULO 3 : ADAPTAÇÕES MORFO-
ANATÔMICAS E CRESCIMENTO DAS PLANTAS
DE *TABEBUIA CASSINOIDES***

1. INTRODUÇÃO

A taxa de crescimento e produção de biomassa de plantas terrestres sob alagamento são normalmente reduzidas (Drew, 1983; Jackson & Drew, 1984; Medri, 1985; Pimenta et al., 1996; Kolb et al., 1998 e Medri et al., 1998). No entanto, espécies higrófitas são capazes de evitar tais condições devido a formação de aerênquima, que fornece um meio eficiente para manter o sistema de raízes em condições aeróbicas (Armstrong, 1979; Laan et al., 1990) e como consequência, o crescimento pode ser mantido ou retomado (Laan & Blom, 1990).

Em espécies de *Rumex*, o desenvolvimento de aerênquima determina o grau de tolerância ao alagamento (Laan et al., 1989), e Perata & Alpi (1993) atribuíram a sobrevivência do arroz em solos alagados a sua capacidade de evitar a anaerobiose, através da boa capacidade de aeração das raízes pelo aerênquima.

Muitas mudanças na morfologia e na anatomia de plantas lenhosas alagadas são atribuídas aos hormônios, já que o alagamento altera substancialmente as relações hormonais endógenas em plantas (Reid & Bradford, 1984). Em raízes anaeróbicas de plantas alagadas, o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC, um precursor do etileno) é sintetizado e transportado para a parte aérea (Yang & Hoffman, 1984; Yamamoto et al., 1987) ou mesmo para a região cortical mais aerada da própria raiz (Jackson, 1994), onde é convertido em etileno. Hipertrofia de lenticelas (Angeles et al., 1986), formação de aerênquima (Hook, 1984) e de raízes adventícias (Yamamoto & Kozlowski, 1987a) têm sido relacionadas aos efeitos regulatórios do etileno induzido pelo alagamento.

As auxinas também têm seus níveis aumentados devido à queda da atividade do sistema AIA-oxidase, pela falta de aeração nas raízes. É sugerido que a hipoxia causa estagnação do transporte de auxinas para as raízes, o que pode levar a um acúmulo destas na base do caule, resultando na formação de

raízes adventícias (Visser et al., 1995). Os níveis de citocininas e giberelinas são diminuídos pelo alagamento (Burrows & Carr, 1969; Reid & Crozier, 1971), enquanto que os níveis de ácido abscísico são aumentados (Zhang & Davies, 1986).

Tendo em vista que as respostas metabólicas parecem assumir um papel menor em plantas alagadas de *T. cassinoides* (Capítulo 2), tornou-se imprescindível estudar as respostas anatômicas e o seu envolvimento em capacitar esta espécie a colonizar áreas alagadas durante praticamente o ano todo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para efeito comparativo das respostas apresentadas, as plantas utilizadas nos experimentos descritos a seguir, foram obtidas e cultivadas do mesmo modo que aquelas destinadas à extração de metabólitos (Capítulo 2).

2.1. Porosidade das Raízes

A porosidade foi quantificada na raiz principal (nos 5cm apicais, descontando-se 1cm do ápice) e nas raízes laterais de 5 plantas controle e 5 plantas alagadas por 15, 30 e 60 dias, pelo método do Picnômetro (Jensen et al., 1969). Esta medida baseia-se no volume de água deslocado pelos espaços de ar na raiz intacta e depois homogeneizada.

Para a medida de porosidade, as plantas foram removidas dos sacos e tiveram suas raízes cuidadosamente lavadas em água corrente, para remoção dos grãos de areia. Para a realização das medidas, um picnômetro com capacidade para 50ml foi preenchido com água e pesado (P_A). Aproximadamente 0,2g para a raiz principal e entre 0,4-0,7g para raízes laterais, foram cortados e secos em papel absorvente e pesados (R), sendo as amostras então introduzidas no picnômetro cheio de água e novamente pesadas (P_{AR}). Depois estas foram retiradas, homogeneizadas em um graal com auxílio de um pestilo (para remoção do ar de dentro das raízes) e re-introduzidas no picnômetro para nova pesagem (P_{ARH}).

A porosidade das raízes foi determinada com o uso da fórmula:

$$\% \text{ POR} = \frac{P_{ARH} - P_{AR}}{P_A + R - P_{AR}} \times 100$$

2.2. Estudo Anatômico

Objetivando verificar se houve ou não a formação de aerênquima, foram coletados segmentos das raízes laterais de plantas controle e plantas que foram alagadas por 1 e 8 meses. Os segmentos foram fixados em Glutaraldeído 3% e Paraformaldeído 2% em Tampão Fosfato pH 7,0 0,05M por 3 dias e em Tetróxido de ósmio 1% por uma noite, desidratados em série crescente de etanol, secados ao ponto crítico e metalizados com ouro. As raízes assim processadas foram observadas e fotografadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (Zeiss, DSM 940A).

2.3. Difusão de O₂

Para observar a ocorrência da difusão de oxigênio das raízes das plantas para o meio, foi utilizada a técnica do Azul de Metileno (Armstrong & Armstrong, 1988).

O experimento foi montado com 3 plantas controle e 3 plantas alagadas por 1 e 2 meses. As plantas foram retiradas dos vasos e as raízes lavadas em água corrente para a remoção da areia. Após a esterilização superficial das raízes em cloreto de mercúrio 0,02%, estas foram colocadas em recipientes contendo ágar 1,5%, Azul de Metileno e ditionito de sódio. O corante é azul quando oxidado e incolor quando reduzido pelo ditionito de sódio. Havendo difusão de oxigênio para o meio, o corante se oxida, formando halos azuis ao redor das raízes.

Para certificar o bom funcionamento do sistema, foi montado um experimento onde a planta tinha a parte aérea seccionada, sendo a área da secção coberta com lanolina. As raízes foram submersas em uma solução contendo ditionito de sódio por 2 horas antes da sua transferência para o ágar, para forçar a remoção do oxigênio que poderia estar armazenado nas raízes.

2.4. Avaliação do Crescimento e Respostas Morfológicas

No início dos tratamentos, 5 plantas foram utilizadas para as medidas de comprimento e massa seca das partes aéreas e das raízes de cada planta, servindo as mesmas como referências. Novas medidas foram realizadas nas plantas após 30, 60 e 120 dias (60 alagado e 60 na capacidade de campo ou 120 dias para a condição controle ou alagada).

As medidas de matéria seca foram obtidas após as plantas permanecerem em estufa a 80°C por 48 horas.

Para o grupo de plantas controle e alagadas por 120 dias, também foi registrado mensalmente o número de folhas novas produzidas.

Ao longo do experimento foram observadas e analisadas as modificações morfológicas, tais como a produção de lenticelas hipertróficas e o desenvolvimento de raízes adventícias.

2.5. Delineamento estatístico

A análise dos dados de porosidade (transformados para arcoseno da raiz quadrada da porcentagem) e dos parâmetros de crescimento, foram baseados na ANOVA e a DMS foi determinada pelo teste de Tukey (5%) (Sokal & Rohlf, 1979).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Porosidade das Raízes

A porosidade da raiz principal e das raízes laterais não diferiu estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 1), porém nas raízes laterais parece haver uma tendência de aumento na porosidade, que fica clara em plantas com maior tempo de alagamento (12% em plantas alagadas por 8 meses - dados não apresentados). Convém esclarecer que em plantas alagadas por 15 e 30 dias não havia ainda a formação de novas raízes induzidas pelo tratamento, foi observado apenas o crescimento dos ápices das raízes originais. Com 60 dias de alagamento, raízes com morfologia diferenciada, mais espessas, retilíneas e menos ramificadas, foram facilmente reconhecidas como raízes induzidas pelo alagamento, mas não havia ainda um número suficiente destas para que fossem amostradas separadamente. Estas, provavelmente apresentam maior porosidade e refletem a tendência de aumento desse parâmetro nas raízes laterais amostradas nestas plantas (Tabela 1). As plantas utilizadas para estas medidas, eram jovens e não apresentavam um número grande de raízes laterais, da mesma maneira que as plantas utilizadas para o estudo dos metabólitos (Capítulo 2). Aqui também foram utilizadas praticamente todas as raízes presentes na planta, e assim, as medidas representam a média da porosidade encontrada nas raízes como um todo, incluindo desde aquelas menos porosas até as mais porosas (induzidas pelo alagamento). Já as plantas com 8 meses de alagamento, mostraram uma modificação acentuada do sistema de raízes original, apresentando um grande número de raízes induzidas, que eram continuamente formadas em substituição àquelas que morriam.

As medidas de porosidade mostraram que as plantas controle apresentam uma porcentagem constitutiva de espaços de ar nas raízes e que a porosidade aumenta em resposta a períodos mais longos de alagamento, naquelas raízes que foram induzidas pelo tratamento.

Tabela 1 - Porcentagem de espaços de ar na raiz principal e nas raízes laterais de *T. cassinoides*.

Tratamento	Raiz Principal	Raízes Laterais
Controle	19,27 ± 1,65	4,3 ± 0,65
Alagado 15 dias	16,73 ± 1,16	4,8 ± 0,80
Alagado 30 dias	19,80 ± 0,96	3,9 ± 0,91
Alagado 60 dias	19,34 ± 0,74	6,1 ± 0,90

Dados representam a média ± erro padrão, n=5. Não há diferença significativa entre os tratamentos.

A ocorrência de aeração interna não depende necessariamente da formação de um extenso aerênquima (Laan et al., 1990). Armstrong et al. (1982 e 1983) verificaram que raízes de ervilha com porosidade de 2-4% mostravam aeração interna e Armstrong (1979) e Willigen & Noordwijk (1984) calcularam que mesmo porosidades de 1-4% podem contribuir significativamente para a respiração da raiz sob hipoxia, desde que os espaços intercelulares formem um sistema contínuo.

No Capítulo 2 foi mostrada uma diminuição na produção de etanol nas raízes de *T. cassinoides* com 15 dias de alagamento e que esta não voltava a aumentar nos tempos maiores de tratamento, ficando a quantidade deste metabólito no mesmo nível daquela encontrada nas plantas controle. A partir destes resultados, seria lógico atribuir esta queda na produção de etanol a um aumento na porosidade das raízes, o que possibilitaria o transporte de O₂ da parte aérea para as raízes e a retomada do metabolismo aeróbico. No entanto, os dados de porosidade (Tabela 1) mostraram que a diminuição do etanol não coincide com um aumento da porosidade.

Como as plantas de *T. cassinoides* apresentam uma quantidade de espaços de ar constitutiva, parece provável que o aumento na produção de etanol no início do alagamento ocorra num período de acomodação do metabolismo das raízes e que após este período, ocorra uma retomada total, ou pelo menos parcial da respiração aeróbica nas raízes.

3.2. Estudo Anatômico

O estudo da anatomia das raízes laterais de *T. cassinoides*, mostrou a presença de espaços intercelulares tanto nas plantas controle (Figura 1) quanto nas plantas que foram alagadas por 30 dias (Figura 2).

Dentre as plantas que ficaram alagadas por 30 dias, observa-se que pode haver uma diferenciação no desenvolvimento de aerênquima entre diferentes raízes (a Figura 2 mostra uma raiz onde são encontrados principalmente espaços intercelulares, enquanto que a Figura 3 mostra uma outra raiz onde já ocorre a formação de lacunas).

As figuras 4 e 5 mostram raízes que foram induzidas pelo alagamento com maior tempo de duração (8 meses). Nestas, observa-se um aerênquima bem desenvolvido, com a presença de grandes lacunas e que estas têm origem esquizogênica, formadas a partir da separação das paredes das células, ao contrário da origem lisogênica, onde também ocorre lise e morte de células.

O aerênquima é composto de espaços intercelulares e/ou lacunas preenchidas com ar (Smirnoff & Crawford, 1983) e quando funcional, facilita o transporte de O_2 da atmosfera e/ou da parte aérea da planta para as raízes e rizosfera. Este tecido possui baixa resistência ao movimento do O_2 (Armstrong, 1979; Drew et al., 1985) e menor quantidade relativa de células respirando, porém mantém suficiente estrutura de suporte (Williams & Barber, 1961).

A formação de aerênquima pode aumentar as chances de sobrevivência de muitas espécies presentes em solos hidromórficos (Kawase, 1981). A presença deste tecido nas raízes de espécies de solos encharcados tem sido freqüentemente observada (Dacey, 1980; Kawase & Whitmoyer, 1980; Medri, 1985; Justin & Armstrong, 1987; Pezeshki et al., 1991; Medri et al., 1998).

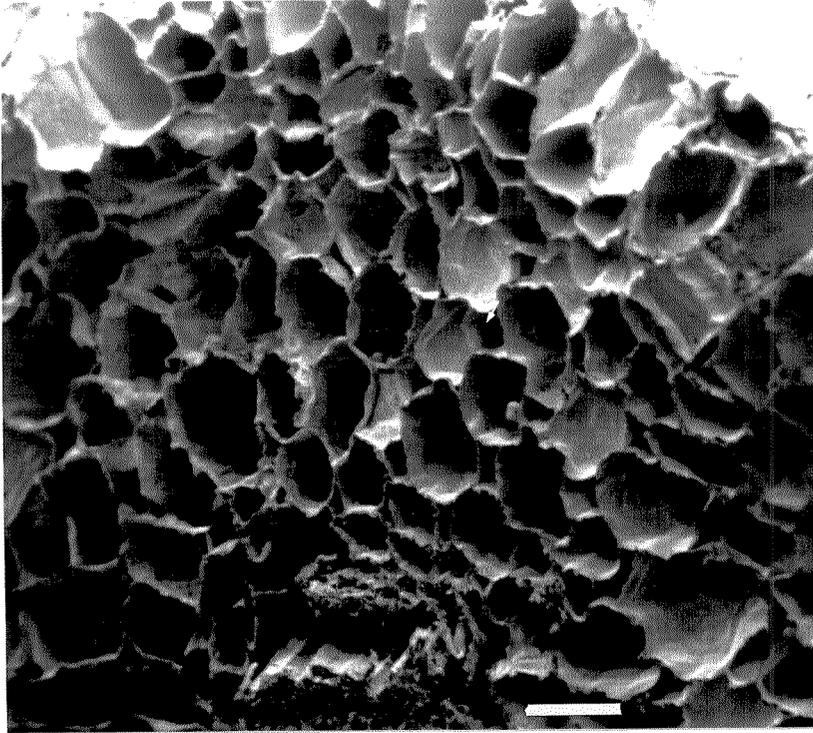


Figura 1- Micrografia da raiz lateral de uma planta controle de *T. cassinoides*. Barra = 25 μ m. A seta indica a presença de espaços intercelulares.

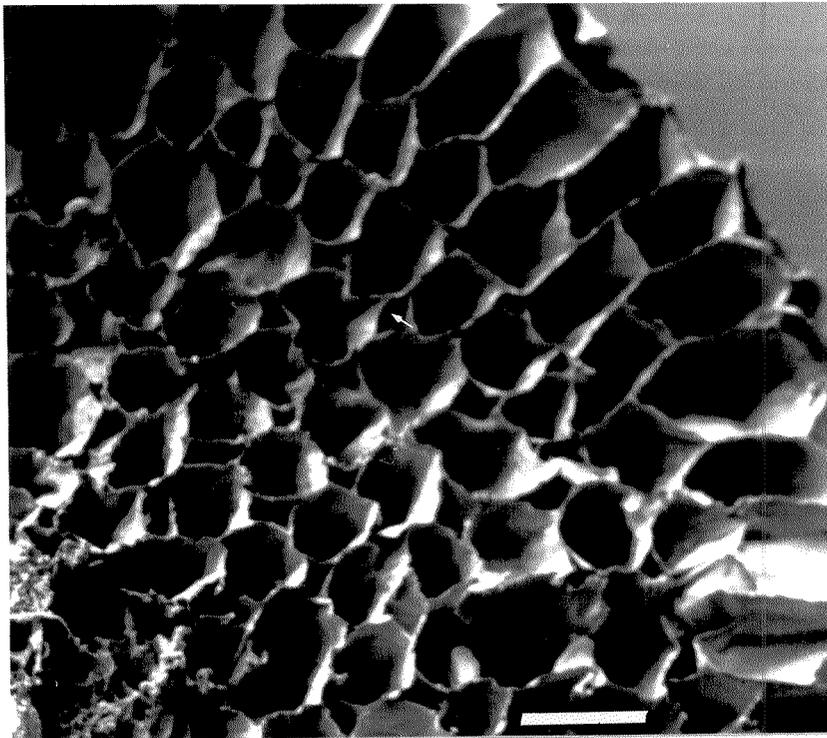


Figura 2- Micrografia da raiz lateral de uma planta de *T. cassinoides* alagada por 30 dias. Barra = 25 μ m. A seta indica a presença de espaços intercelulares.



Figura 3- Micrografia da raiz lateral de uma planta de *T. cassinoides* alagada por 30 dias. Barra = 25 μ m. A seta indica a presença de lacunas.

A formação de aerênquima em algumas espécies parece resultar do desenvolvimento de condições anaeróbicas nas raízes, seguido pelo aumento da síntese e acúmulo de etileno (Drew et al., 1979; 1981). Já, Yamamoto & Kozlowski (1987b) consideraram que as auxinas podem estar diretamente associadas com a formação de espaços intercelulares.

3.3. Difusão de O₂

Tanto plantas controle quanto plantas alagadas por 1 e 2 meses, apresentaram difusão de O₂ para o meio (Figura 6), principalmente nas porções mais apicais das raízes laterais, sugerindo a funcionalidade do tecido poroso no transporte de O₂, o que pode possibilitar a respiração aeróbica e amenizar os efeitos do alagamento.

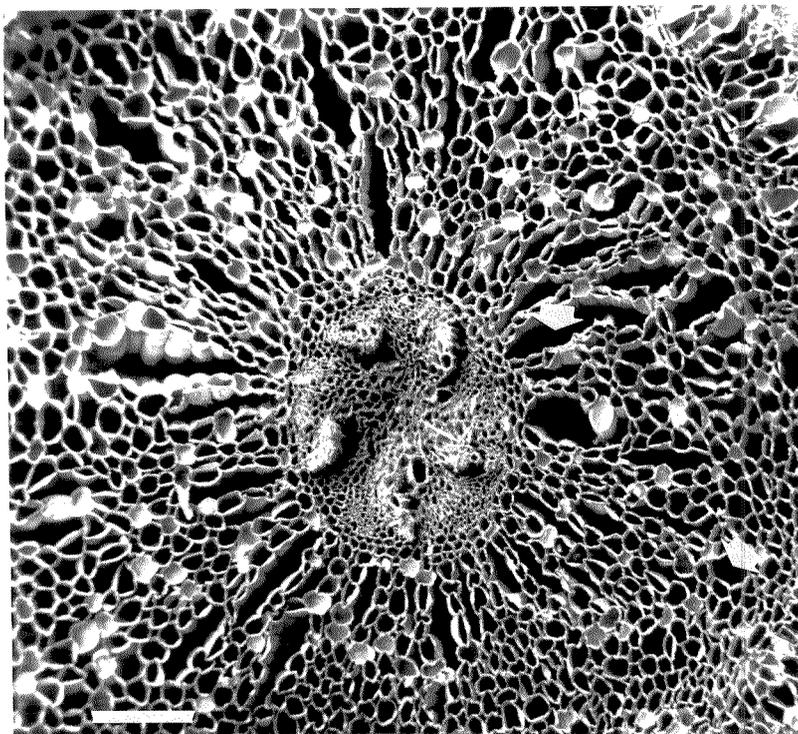


Figura 4- Micrografia da raiz lateral de uma planta de *T. cassinoides* alagada por 8 meses. Barra = 100 μ m. As setas indicam a presença de lacunas.

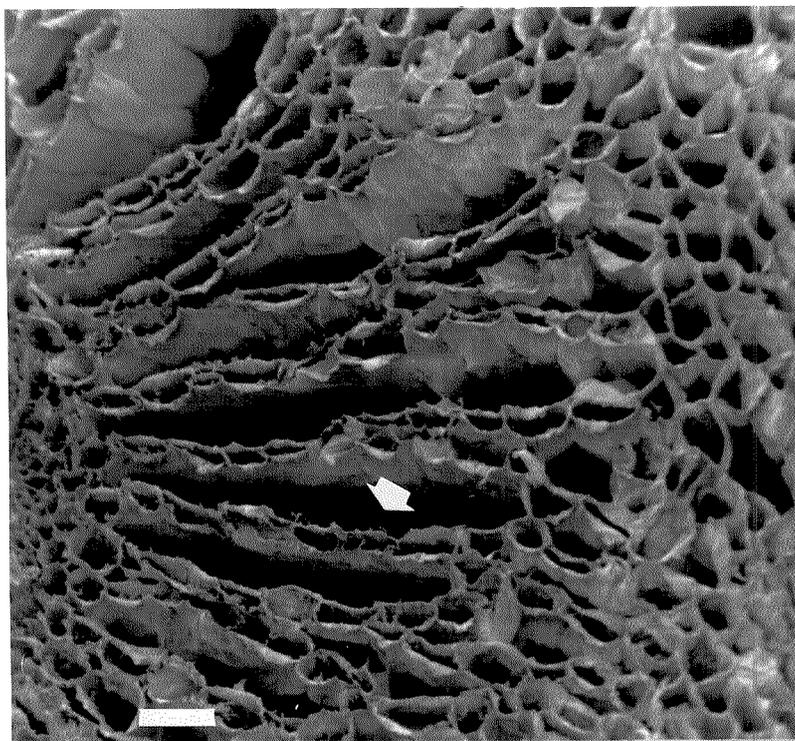


Figura 5- Micrografia da raiz lateral (em detalhe) de uma planta de *T. cassinoides* alagada por 8 meses. Barra = 25 μ m. A seta indica a presença de lacunas.

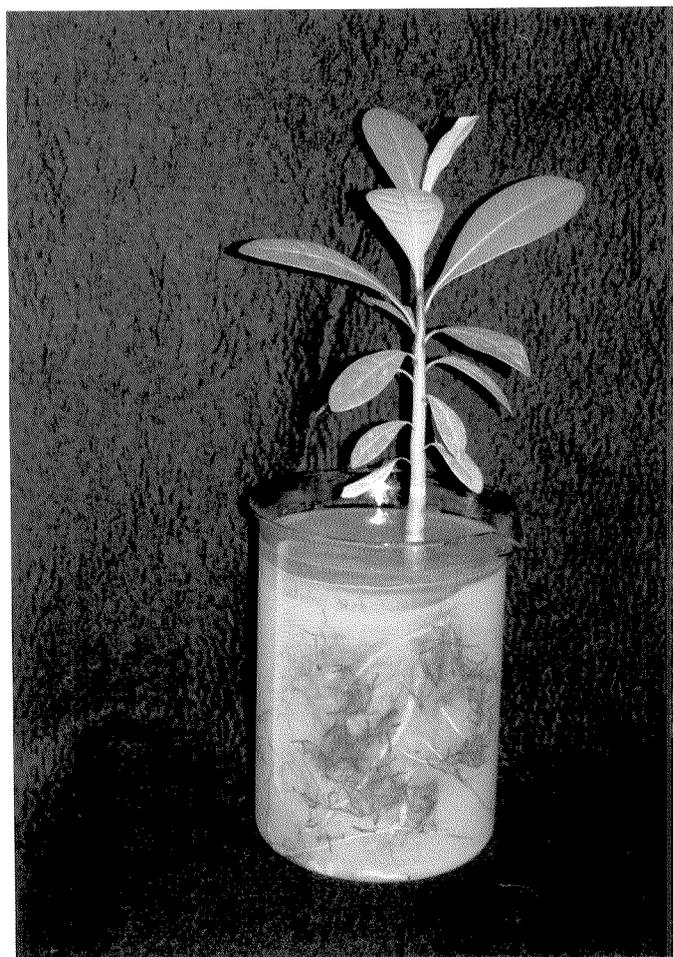


Figura 6 - Difusão de O_2 das raízes de *T. cassinoides* após 2 meses de alagamento.

Oxidação da rizosfera é considerada uma característica importante de tolerância ao alagamento (Ottow et al., 1982), já que por este mecanismo, toxinas potenciais no solo, como formas reduzidas de Fe e Mn, que podem aumentar até níveis tóxicos sob condições anaeróbicas, podem ser imobilizadas (Ottow et al., 1982 e Laan et al., 1991).

3.4. Avaliação do Crescimento e Respostas Morfológicas

A inibição do crescimento da raiz, em resposta à deficiência de O_2 no solo, tem sido relatada para muitas espécies de plantas vasculares, sob uma variedade de condições experimentais (Drew & Lynch, 1980; Cobb & Kennedy, 1987; Pezeshki & Delaune, 1990), bem como a redução no crescimento em altura de espécies lenhosas (Sena-Gomes & Kozlowski, 1980a e b; Tang & Kozlowski, 1982a e b; Joly, 1986; Kludze et al., 1994; Kolb et al., 1998; Medri et al., 1998). No entanto, a Figura 7 mostra que para *T. cassinoides*, o comprimento da parte aérea de plantas que foram alagadas por 60 e 120 dias, foi significativamente maior do que o de plantas controle,

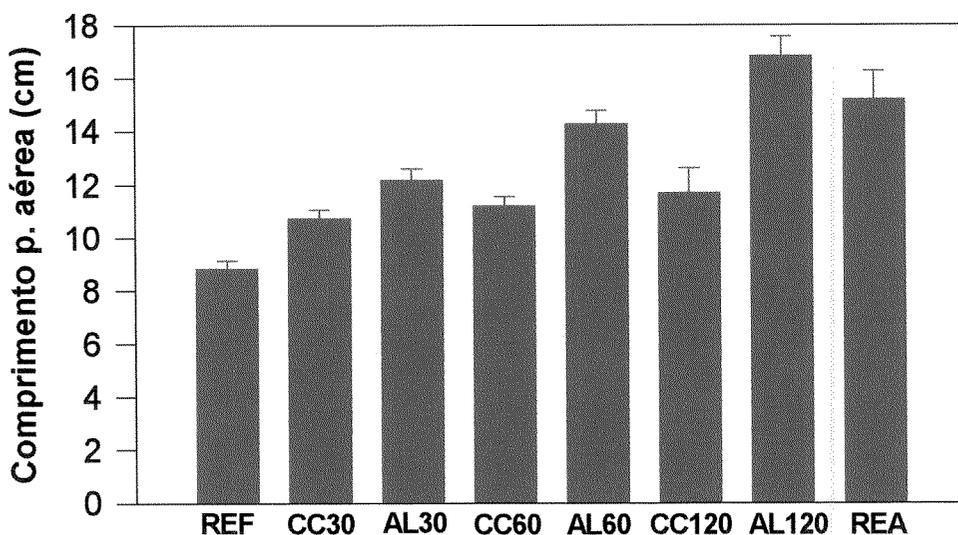


Figura 7 - Efeito do alagamento sobre o comprimento da parte aérea de plantas de *T. cassinoides*. REF: plantas referências; CC: plantas controle; AL: alagadas e REA: plantas reaeradas (60d alagadas e 60d na condição controle). Os dados representam a média \pm erro padrão, n=5.

indicando uma vantagem competitiva das plantas desta espécie em relação àquelas que toleram o alagamento mas que apresentam um menor crescimento durante este período. Plantas que foram alagadas por 60 dias e depois desalagadas (reaeradas) por 60 dias, também mostraram um comprimento

significativamente maior da parte aérea quando comparadas àquelas plantas que permaneceram por 120 dias na situação controle, mostrando mais uma vez que o alagamento favorece o crescimento das plantas.

Readmissão de O₂ após um período de ausência pode causar séria injúria para os tecidos da planta (Crawford, 1992). Assim, nos estudos de susceptibilidade das plantas à baixa tensão de O₂, há necessidade de considerar tanto o evento de anoxia quanto o de pós-anoxia (Monk et al., 1987; Crawford & Wollenweber-Ratzer, 1992). A reexposição dos tecidos ao O₂ pode levar a produção de radicais superóxidos (Halliwell, 1984; Monk et al., 1989) e a uma rápida oxidação de metabólitos que foram acumulados anaerobicamente (principalmente etanol e ACC), levando à formação de acetaldeído e etileno.

De acordo com Asada & Takahashi (1987) e Larson (1988), a oxidação dos componentes celulares é prevenida através de uma variedade de mecanismos não enzimáticos (como a presença de ácido ascórbico reduzido, glutatona e α -tocoferol - antioxidantes naturais) e enzimáticos que fornecem proteção contra os radicais superóxidos.

Albrecht & Wiedenroth (1994) sugeriram que a capacidade de manter o balanço entre a formação e desintoxicação de radicais superóxidos provavelmente aumenta o potencial de sobrevivência e a tolerância das raízes à variação da tensão de O₂.

Plantas de *T. cassinoides* quando reaeradas, não apresentaram nenhum sintoma visível de injúria, o que leva a crer, que estas apresentam mecanismos para evitar possíveis danos que possam vir a ocorrer neste período.

Plantas alagadas de *T. cassinoides*, também apresentaram um investimento significativo na produção de novas folhas quando comparadas às controle (Figura 8).

Quanto ao incremento de massa seca, foi observado que a parte aérea de plantas alagadas foi maior do que a de plantas controle (Figura 9) e isto foi resultado do maior comprimento da parte aérea (Figura 7) e do maior número de folhas novas produzidas em plantas alagadas (Figura 8). A massa seca da raiz (Figura 9) também foi maior em plantas alagadas do que em plan-

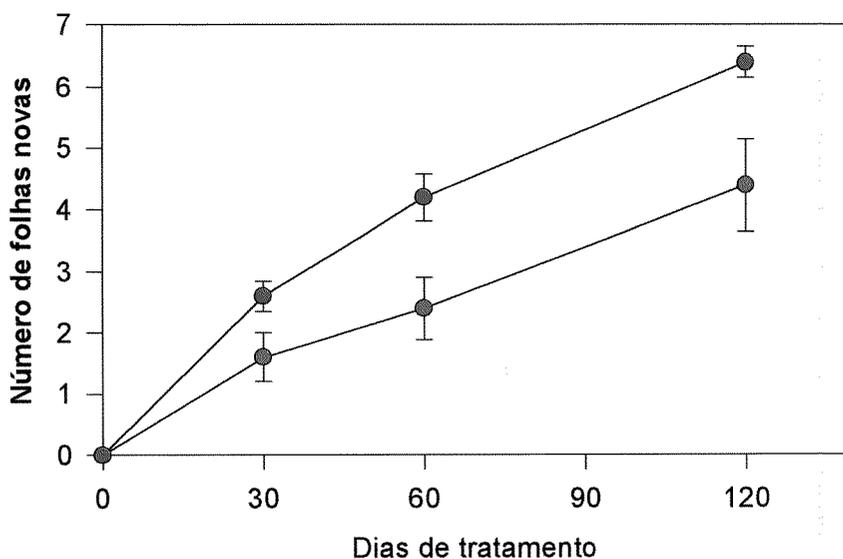


Figura 8 - Efeito do alagamento sobre a iniciação foliar em plantas de *T. cassinoides*. (■) controle (■) alagado. Dados representam a média \pm erro padrão, $n=5$.

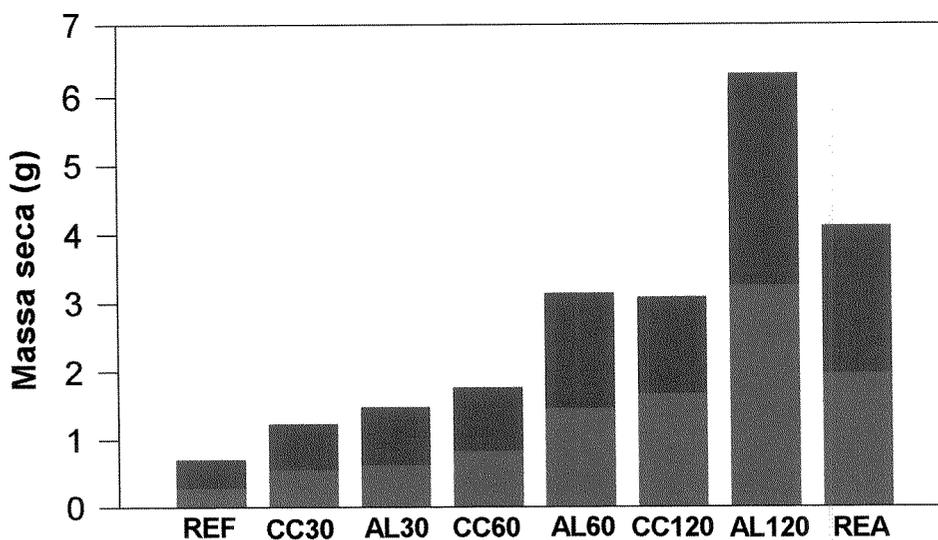


Figura 9- Efeito do alagamento sobre a massa seca da raiz e da parte aérea de plantas de *T. cassinoides*. REF: plantas referências; CC: plantas controle; AL: alagadas e REA: reaeradas (60d alagadas e 60d na condição controle).

■ Raiz ■ Parte aérea

tas controle e isto se deve em parte à maior produção e crescimento de raízes laterais novas em plantas alagadas (Figura 10). A massa seca da parte aérea e

das raízes foi significativamente maior nas plantas alagadas, somente com 120 dias de tratamento.

Davanso (1994) estudando *Sesbania virgata*, espécie arbustiva que freqüentemente ocorre em áreas inundáveis, também observou um aumento na massa seca da raiz e parte aérea das plantas alagadas em relação às controle.

O fato de *T. cassinoides* crescer mais quando alagada, possivelmente favorece a espécie na competição com as demais e explica ao menos em parte a formação de extensos caxetais nos locais brejosos da planície litorânea.

O maior crescimento de uma planta quando alagada é pouco comum.

Espécies de *Rumex* quando submersas, mostram um aumento na produção de etileno e a este fato, foi relacionada a capacidade de crescimento de caules e pecíolos que protraem acima da superfície da água, restabelecendo o contato destas plantas com a atmosfera (Voeselek & Blom, 1989). A submersão resulta em um aprisionamento do etileno na planta, como consequência do coeficiente de difusão desta substância ser 10.000 vezes menor na água do que no ar (Jackson, 1985).

Para plantas de *T. cassinoides*, com as partes aéreas em contato permanente com a atmosfera, o que facilita a difusão, fica mais difícil relacionar o etileno com o maior crescimento que foi observado nas plantas alagadas, mesmo porque nesta espécie, o crescimento em altura foi acompanhado de um aumento na biomassa, de modo que se há envolvimento do etileno, deve ser de maneira indireta.

Além do possível envolvimento hormonal, outra questão a ser abordada é que as plantas desta espécie apresentaram um maior número de folhas quando alagadas, o que resulta numa ampliação da área fotossintética e numa maior fixação de carbono, possibilitando assim o maior crescimento destas em relação as plantas controle.

A Figura 10 mostra uma planta alagada e uma controle, ao final dos 120 dias de tratamento. Nota-se que tanto a parte aérea quanto o sistema de raízes foi melhor desenvolvido na planta alagada. A iniciação e expansão foliar

não foram inibidas com o alagamento e respostas como abscisão, necrose e murchamento das folhas não foram observadas. Ao final do período de alagamento, o sistema de raízes apresentado era saudável, formado por raízes laterais mais numerosas do que aquelas encontradas nas plantas controle (Figura 10).



Figura 10 - Plantas de *T. cassinoides* após 120 dias de tratamento. A: alagada, B: controle.

Quanto às alterações morfológicas, somente algumas plantas apresentaram formação de raízes adventícias (que foram pouco numerosas, 1 a 3 por planta) e/ou alguma hipertrofia de lenticelas (Figura 11). Estas estruturas surgiram em algumas plantas com 10-15 dias de alagamento e em outras somente com 30-45 dias de alagamento.

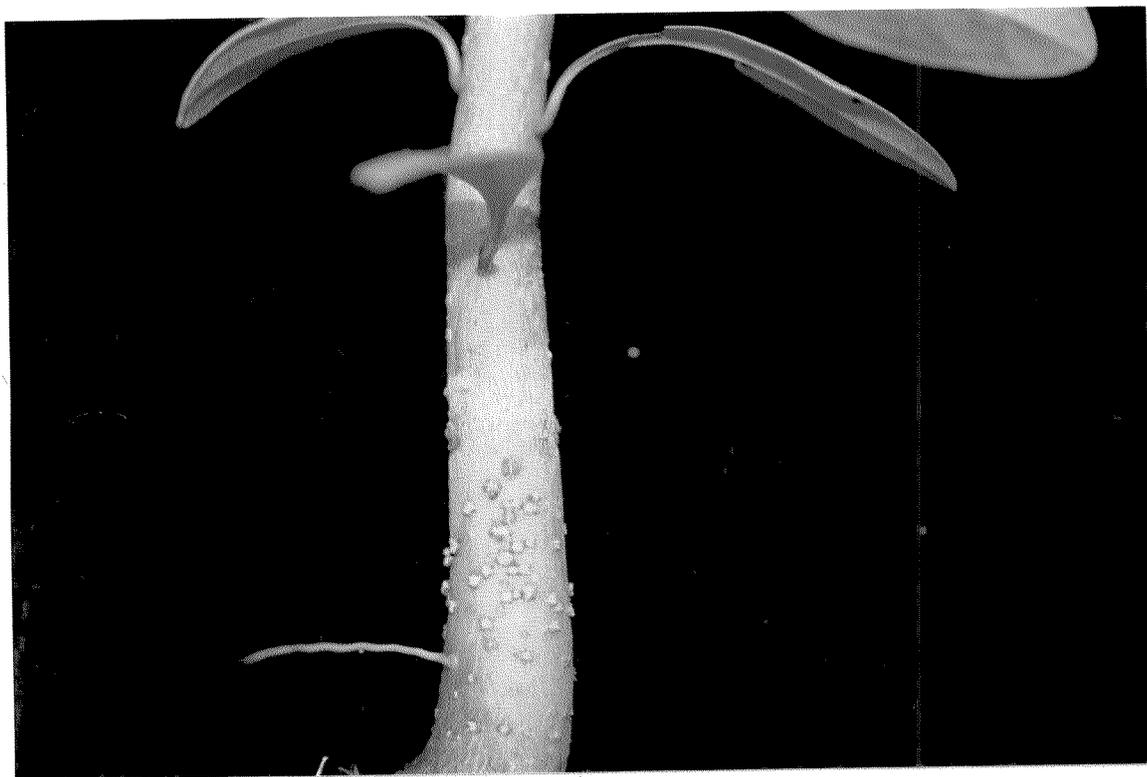


Figura 11 - Planta de *T. cassinoides* após 120 dias de alagamento, com hipertrofia de lenticelas e formação de raiz adventícia.

A ocorrência de lenticelas hipertróficas foi observada em várias espécies lenhosas sujeitas ao alagamento (Andersen et al., 1984; Kozlowski, 1984; Medri, 1985; Pimenta et al., 1996; Kolb et al., 1998; Medri et al., 1998) e é sugerido que as mesmas acentuam a difusão de O_2 para as raízes (Kozlowski,

1984) ou eliminam metabólitos potencialmente tóxicos como etanol, acetaldeído ou etileno (Chirkova & Gutman, 1972).

A formação de raízes adventícias também foi relatada por vários autores, entre eles Jackson et al. (1981), Kawase (1981), Blom et al. (1994), Visser et al. (1995), Yamamoto et al. (1995) e Medri et al. (1998). O papel destas estruturas foi relacionado ao aumento da capacidade de absorção de água e nutrientes (Hook & Scholtens, 1978), favorecimento da oxidação da rizosfera (Hook et al., 1970) e ao aumento da síntese de hormônios, especialmente giberelinas e citocininas (Reid & Bradford, 1984).

Em resumo, os resultados aqui apresentados sugerem que a presença de espaços intercelulares (característica constitutiva da espécie) e a capacidade de formar um aerênquima bem desenvolvido sob condições de alagamento, aumentem a difusão de O_2 da parte aérea para as raízes. Assim a respiração aeróbica seria mantida e, juntamente com a capacidade de oxidação da rizosfera, poderia manter o crescimento das plantas enquanto alagadas, garantindo o seu sucesso no ambiente de restinga onde a saturação hídrica do solo pode perdurar por meses.

DISCUSSÃO GERAL

A germinação das sementes e o subsequente estabelecimento da plântula são fases essenciais do ciclo de vida das plantas e podem representar o período de máxima vulnerabilidade a mudanças físicas no ambiente (Angevine & Chabot, 1979).

Esta afirmação aliada ao fato de que na natureza, a dispersão das sementes de *T. cassinoides* ocorre durante a época chuvosa, período em que o solo se encontra alagado, faz com que a busca dos mecanismos que possibilitam a presença desta espécie neste ambiente, restritivo à maioria das espécies, esbarre na necessidade de estudar tanto o processo germinativo quanto as respostas apresentadas pelas plantas jovens quando submetidas a uma condição de hipoxia.

Sementes de *T. cassinoides* não germinaram quando totalmente submersas ou em anoxia. A morfologia da semente, responsável pela capacidade de flutuar na água, mesmo após a embebição da semente e a alta porcentagem de germinação alcançada nesta condição, podem ser essenciais para que as sementes desta espécie tenham condições de suplantarem este estágio inicial em um ambiente sujeito a períodos de inundação.

O sucesso do estabelecimento de *T. cassinoides* em áreas alagadas possivelmente resulta da combinação de propagação vegetativa com a adaptação tanto das sementes quanto das plântulas ao alagamento.

Durante o processo de germinação, foi observada uma alta atividade da via fermentativa, independente do tratamento, havendo a produção de grandes quantidades de etanol e lactato, bem como do malato. As sementes que tiveram maior acesso ao O_2 , ou seja, aquelas em normoxia e parcialmente submersas, a despeito da ativação da via fermentativa, devem ter garantido maior produção de energia, com menor gasto de substrato, através de um metabolismo parcialmente aeróbico, possibilitando a germinação. Sementes totalmente submersas (com menor acesso ao O_2) ou em anoxia (na ausência de O_2), dependeram praticamente ou totalmente do metabolismo fermentativo, que produz menos energia e requer grandes quantidades de substrato. A ativação da via fermentativa nas sementes sob estas condições, provavelmente não produziu

a energia necessária para a germinação, garantindo apenas a sobrevivência das sementes durante um período relativamente curto, sugerindo que a perda da viabilidade resultou da exaustão do substrato fermentável, tendo em vista que as sementes desta espécie não apresentam grande quantidade de carboidratos ou da toxicidade dos metabólitos produzidos durante este período.

Os estudos sobre a tolerância de plantas jovens ao alagamento quase sempre enfocam as respostas do metabolismo reapiatório ou as respostas morfo-anatômicas, quando na verdade um compromisso entre ambas é o que confere uma estratégia de sucesso em muitas plantas (Joly & Crawford, 1982).

Para compreender a estratégia adotada por plantas de *T. cassinoides* quando alagadas, foram estudados alguns aspectos do metabolismo ao lado de aspectos morfo-anatômicos, que foram obtidos em experimentos conduzidos da mesma forma e em tempos comparáveis.

Desta maneira, verificou-se que nesta espécie a resposta metabólica assume um papel menor. Ocorre um aumento na produção de etanol no início do alagamento mas já com 15 dias o etanol quantificado nas raízes retorna ao nível observado nas plantas controle e não volta a subir.

Tendo em vista que as raízes de *T. cassinoides* apresentam uma quantidade constitutiva de espaços de ar e que a queda na produção de etanol não é acompanhada de um aumento na porosidade das raízes, sugere-se que a aceleração da via fermentativa tenha ocorrido num período de acomodação do metabolismo frente à condição de hipoxia e que após este período, ocorra uma retomada do metabolismo aeróbico.

Deve-se lembrar que a quantidade de etanol produzida pelas raízes pode ser maior do que aquela quantificada, se levado em consideração a possibilidade de difusão deste para o meio, e que o metabolismo anaeróbico pode ter um papel maior do que lhe foi atribuído.

No entanto, a divisão celular em eucariotos requer O_2 . Conseqüentemente, qualquer planta que apresenta crescimento da raiz num solo encharcado ou alagado, deve ser capaz de fornecer a este órgão um suprimento adequado de O_2 , ao menos durante períodos de crescimento que envolvam

divisão de células (Crawford, 1992). Como plantas alagadas de *T. cassinoides* apresentaram um incremento significativo na biomassa, envolvendo a produção de novos órgãos (raízes laterais, folhas) que necessariamente envolvem a divisão de células e não apenas o seu alongamento decorrente da absorção de água (aumento na massa fresca), parece improvável que o metabolismo anaeróbico possa assumir o papel principal.

Logo, a presença constitutiva de espaços intercelulares, a capacidade de formar um aerênquima bem desenvolvido após um período maior de alagamento e a capacidade de oxidar a rizosfera, provavelmente constituem características responsáveis pelo crescimento vigoroso das plantas de *T. cassinoides* quando alagadas, favorecendo a espécie no processo de competição e explicando ao menos em parte a formação de extensos caxetais nos locais brejosos da planície litorânea.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

- As sementes de *T. cassinoides* não apresentaram fotoblastismo;
- Suas sementes alcançaram 100% de germinação enquanto flutuavam na água, mas não germinaram em anoxia ou quando totalmente submersas, permanecendo viáveis sob estas condições por 15 e 20 dias, respectivamente;
- As reservas cotiledonares são constituídas principalmente por glicoproteínas e lipídios, apresentando ainda uma quantidade menor, mas apreciável de açúcares livres;
- Durante a embebição das sementes a via fermentativa foi ativada, levando a uma grande produção de etanol, lactato e de malato, sendo o primeiro produzido em maior quantidade;
- 50% do etanol produzido por sementes parcialmente e totalmente submersas, foi encontrado na solução;
- As plantas desta espécie mostraram um aumento na produção de etanol no início do alagamento, mas com 15 dias a sua quantidade foi a mesma daquela encontrada em plantas controle. A produção de malato também aumentou em plantas alagadas. Quanto ao lactato, não foi observado nenhum acúmulo significativo deste sob alagamento;
- As raízes das plantas apresentaram uma quantidade de espaços de ar constitutiva, que foi aumentada com tempos maiores de alagamento, formando um aerênquima bem desenvolvido;

- Tanto plantas controle quanto alagadas apresentaram difusão de O_2 para o meio;

- A massa seca da parte aérea de plantas alagadas foi maior do que a de plantas controle, como resultado do maior comprimento da parte aérea e do maior número de folhas novas produzidas nestas plantas;

- A massa seca da raiz também foi maior em plantas alagadas e isto deveu-se à maior produção e crescimento de raízes laterais novas nas plantas sob alagamento;

- Plantas alagadas desenvolveram algumas raízes adventícias e também lenticelas hipertróficas;

- A combinação de propagação vegetativa com a adaptação tanto das sementes quanto das plantas ao alagamento, possibilitam o sucesso do estabelecimento de *T. cassinoides* em áreas onde a saturação hídrica do solo pode perdurar durante grande parte do ano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-ANI, A ; BRUZAU, F.; RAYMOND, P.; SAINT-GES, V.; LEBLANE, J.M. & PRADET, A 1985. Germination, respiration, adenylate energy charge of seeds at various oxygen pressures. **Plant Physiol.**, 79: 885-980.
- ALBRECHT, G. & WIEDENROTH, E.M. 1994. Protection against activated oxygen following re-aeration of hypoxically pretreated wheat roots. The response of the glutathione system. **J. Exp. Bot.**, 45: 449-455.
- ALDOSORO, J. & NICOLAS, G. 1980. Fermentative products and dark CO₂ fixation during germination of seeds of *Cicer arietinum*. **Phytochem.**, 19: 3-5.
- ALPI, A & BEEVERS, H. 1983. Effects of oxygen concentration on rice seedlings. **Plant Physiol.**, 71: 30-34.
- ANDERSEN, P.C.; LOMBARD, P.B. & WESTWOOD, M.N. 1984. Effect of root anaerobiosis on the water relation of several *Pymus* species. **Physiol. Plant**, 62: 245-252.
- ANDREEV, V.Y. & VARTAPETIAN, B.B. 1992. Induction of alcoholic and lactic fermentation in the early stages of anaerobic incubation of higher plants. **Phytochem.**, 31: 1859-1861.
- ANGELES, G.; EVERT, R.F. & KOZLOWSKI, T.T. 1986. Development of lenticels and adventitious roots in flooded *Ulmus americana* seedlings. **Can. J. For. Res.**, 16: 585-590.
- ANGEVINE, M.W. & CHABOT, B.F. 1979. Seed germination syndromes in higher plants. In: **Topics in plant population biology** (O Solbring, S. Jain, G.B. Johnson, P.H. Raven, eds.). Columbia University Press, New York. Pp: 188-206.
- 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. Pp: 227-238.
- ARMSTRONG, W. 1967. The oxidising activity of roots in waterlogged soils. **Physiol. Plant**, 20: 920-926.
- ARMSTRONG, W. 1979. Aeration in higher plants. **Adv. Bot. Res.**, 7: 226-332.
- ARMSTRONG, W.; HEALY, M.T. & WEBB, T. 1982. Oxygen diffusion in pea. I. Pore space resistance in the primary root. **New Phytol.**, 91: 647-659.
- ARMSTRONG, W.; HEALY, M.T. & WEBB, T. 1983. Oxygen diffusion in pea. II. Oxygen concentrations in the primary pea root apex as affected by growth, the production of laterals and radial oxygen loss. **New Phytol.**, 94: 549-559.

- ARMSTRONG, J. & ARMSTRONG, W. 1988. *Phragmites australis* - A preliminary study of soil-oxidizing sites and internal gas transport pathways. **New Phytol.**, 108: 373-382.
- ARMSTRONG, W.; BRÄNDLE, R. & JACKSON, M.B. 1994. Mechanisms of flood tolerance in plants. **Acta Bot. Neerl.**, 43: 307-358.
- ASADA, K. & TAKAHASHI, M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: **Photoinhibition** (D.J. Kyle; C.B. Osmond & C.J. Arntzen, eds.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam. Pp: 227-287.
- ATWELL, B.J. & STEER, B.T. 1990. The effect of oxygen deficiency on uptake and distribution of nutrients in maize plants. **Plant and Soil**, 122: 1-8.
- BERTANI, A ; BRAMBILLA, I. & MENEGUS, F. 1980. Effect of anaerobiosis on rice seedlings: growth, metabolis rate, and rate of fermentation products. **J. Exp. Bot.**, 31: 325-331.
- BERTANI, A & BRAMBILLA, I. 1982a. Effects of decreasing oxygen concentration on some aspects of protein and amino acid metabolism in rice roots. **Z. Pflanzenphysiol.**, 107: 193-200.
- BERTANI, A & BRAMBILLA, I. 1982b. Effects of decreasing oxygen concentration on wheat roots. Growth and induction of anaerobic metabolism. **Z. Pflanzenphysiol.**, 108: 283-288.
- BLOM, C.W.P.M.; BÖGEMANN, G.M.; LAAN, P.; SMAN, A J.M. van der; STEEG, H.M. van de & VOESENEK, L.AC.J. 1990. Adaptations to flooding in plants from river areas. **Aquatic Bot.**, 38: 29-47.
- BLOM, C.W.P.M.; VOESENEK, L.AC.J.; BANGA, M.; ENGELAAR, W.M.H.G.; RIJNDERS, J.H.G.M.; STEEG, H.M. van de & VISSER, E.J.W. 1994. Physiological ecology of riverside species: adaptative responses of plants to submergence. **Annals of Bot.**, 74: 253-263.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254.
- BURROWS, W.J. & CARR, D.J. 1969. Effects of flooding the root system of sunflower plants on the cytokinin content in xylem sap. **Physiol. Plant**, 22: 1105-1112.
- CHIRKOVA, T.V. & GUTMAN, T.S. 1972. Physiological role of branch lenticels in willow and poplar under conditions of root anaerobiosis. **Soviet Plant Physiol.**, 19: 289-295.
- COBB, B.G. & KENNEDY, R.A 1987. Distribution of alcohol dehydrogenase in roots and shoots of rice (*Oryza sativa* L.) and *Echinochloa* seedlings. **Plant Cell Environ.**, 10: 633-638.

- CÔME, D.; CORBINEAU, F. & SOUDAIN, P. 1991. Beneficial effects of oxygen deprivation on germination and plant development. In: **Plant life under oxygen stress: ecology, physiology and biochemistry**. (M.B. Jackson; D.D. Davies, H. Lambers & B.B. Vartapetian, eds.). SBP Academic Publishing, The Hague. Pp: 69-83.
- CORTELAZZO, A.L. 1992. Detecção e quantificação do amido em cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata* durante o desenvolvimento inicial da planta. **Revta. Brasil. Bot.**, 15: 157-162.
- CORTELAZZO, A.L. & VIDAL, B.C. 1991. Soybean seed proteins: detection in situ and mobilization during germination. **Revta. Brasil. Bot.**, 14: 27-33.
- COSSINS, E.A. 1978. Ethanol metabolism in plants. In: **Plant life in anaerobic environments**. (D.D. Hook & R.M.M. Crawford, eds.). Ann Arbor Science Publishers. Pp: 169-202.
- COUTINHO, L.M. & STRUFFALDI, Y. 1971. Observações sobre a germinação das sementes e o crescimento das plântulas de uma leguminosa da mata amazônica de igapó (*Parkia auriculata* Spruce Mss.). **Phyton**, 28: 149-159.
- 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.). Ann Arbor Science Publishers. Pp: 119-136.
- CRAWFORD, R.M.M. 1992. Oxygen availability as an ecological limit to plant distribution. **Adv. Ecol. Res.**, 23: 93-185.
- CRAWFORD, R.M.M. & TYLER, P.D. 1969. Organic acid metabolism in relation to flooding tolerance in roots. **J. Ecol.**, 57: 235-244.
- CRAWFORD, R.M.M. & WOLLENWEBER-RATZER, B. 1992. Influence of L-ascorbic acid on post-anoxic growth and survival of chickpea seedlings (*Cicer arietinum* L.). **J. Exp. Bot.**, 43: 703-708.
- CRAWFORD, R.M.M. & BRÄNDLE, R. 1996. Oxygen deprivation stress in a changing environment. **J. Exp. Bot.**, 47: 145-159.
- DACEY, J.W.H. 1980. Internal winds in water lilies: and adaptation for life in anaerobic sediments. **Science**, 210: 1017-1019.
- DAVANSO, V.M. 1994. Tolerância à inundação: Aspectos da anatomia ecológica e do desenvolvimento de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Fabaceae). **Monografia**, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

- DAVIES, D.D. 1980. Anaerobic metabolism and production of organic acids. In: **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise** (P.K. Stumpf, E.E. Conn, eds.). Academic Press, New York. Vol. 2, Pp. 581-611.
- DAVIES, D.D.; GREGO, S. & KENWORTHY, P. 1974. The control of the production of lactate and ethanol by higher plants. **Planta**, 118: 297-310.
- DAVIES, M.C.; KENWORTHY, P.; MOCQUOT, B. & ROBERTS, K. 1987. The effects of anoxia on the ultrastructure of pea roots. In: **Plant life in aquatic and amphibious habitats**. (R.M.M. Crawford, ed). Blackwell Scientific Publications, Oxford. Pp. 265-277.
- DREW, M.C. 1983. Plant injury and adaptation to oxygen deficiency in the root environment: a review. **Plant and Soil**, 75: 179-199.
- DREW, M.C. 1988. Effects of flooding and oxygen deficiency on plant mineral nutrition. In: **Advances in plant nutrition**. (A Lauchli & P.B. Tinker, eds.). Praeger, New York, vol. III. Pp: 115-159.
- DREW, M.C. 1990. Sensing soil oxygen. **Plant Cell Environ.**, 13: 681-693.
- DREW, M.C.; JACKSON, M.B. & GIFFARD, S. 1979. Ethylene-promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in *Zea mays* L. **Planta**, 147: 83-88.
- DREW, M.C. & LYNCH, J.M. 1980. Soil anaerobiosis, microorganisms and root functions. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 18: 37-66.
- DREW, M.C.; JACKSON, M.B.; GIFFARD, S. & CAMPBELL, R. 1981. Inhibition by silver ions of gas space (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. subjected to exogenous ethylene or to oxygen deficiency. **Planta**, 153: 217-224.
- DREW, M.C.; SAGLIO, P.H & PRADET, A 1985. Higher adenylate energy charge and ATP/ADP ratios in aerenchymatous roots of *Zea mays* in anaerobic media as a consequence of improved internal oxygen transport. **Planta**, 165: 51-58.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A ; HAMILTON, J.K.; REBELS, P.A & SMITH, F. 1956. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, 3: 350-356.
- ERNST, W.H.O 1990. Ecophysiology of plants in waterlogged and flooded environments. **Aquatic Bot.**, 38: 73-90.
- GAMBRELL, R.P.; DELAUNE, R.D. & PATRICK, W.H.Jr. 1991. Redox processes in soils following oxygen depletion. In: **Plant life under oxygen stress: ecology, physiology and biochemistry**. (M.B. Jackson, D.D. Davies, H. Lambers & B.B. Vartapetian, eds.). SPB Academic Publishing, The Hague.
- HALLIWELL, B. 1984. **Chloroplast metabolism**. Clarendon Press, Oxford.

- HANSON, AD. & JACOBSEN, J.V. 1984. Control of lactate dehydrogenase, lactate glycolysis, and α -amylase by O₂ deficit in barley aleurone layers. **Plant Physiol.**, 75: 566-572.
- HIATT, A J. 1967. Relationship of cell sap pH to organic acid change during ion uptake. **Plant Physiol.**, 42: 294-298.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. **Calif. Agric. Exp. Sta. Circ.**, 347.
- HOFFMAN, N.E.; BENT, AF. & HANSON, AD. 1986. Induction of lactate dehydrogenase isozymes by oxygen deficit in barley root tissue. **Plant Physiol.**, 82: 658-663.
- HOOK, D.D. 1984. Adaptation to flooding with fresh water. In: **Flooding and plant growth**. (T.T. Koslowski, ed.). Academic Press, New York. Pp: 265-294.
- HOOK, D.D.; BROWN, C.L. & KORMANIK, P.P. 1970. Lenticels and water root development of swamp tupelo under various flooding conditions. **Bot. Gaz.**, 131: 217-224.
- HOOK, D.D. & SCHOLTENS, J.R. 1978. Adaptations and flood tolerance of tree species. In: **Plant life under anaerobic environments**. (D.D. Hook, R.M.M. Crawford, eds.). Ann Arbor, Michigan. Pp: 299-331.
- JACKSON, M.B. 1985. Ethylene and the responses of plants to soil waterlogging and submergence. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, 36: 145-174.
- JACKSON, M.B. 1994. Root-to-shoot communication in flooded plants: Involvement of abscisic acid, ethylene, and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **Agron. J.**, 86: 775-782.
- JACKSON, M.B. & DREW, M.C. & GIFFARD, S.C. 1981. Effects of applying ethylene to the root system of *Zea mays* on growth and nutrient concentration in relation to flooding tolerance. **Physiol. Plant**, 52: 23-28.
- JACKSON, M.B.; HERMAN, B. & GOODENOUGH, A 1982. An examination of the importance of ethanol in causing injury to flooded plants. **Plant Cell Environ.**, 5: 163-172.
- JACKSON, M.B. & DREW, M.C. 1984. Effect of flooding on herbaceous plants. In: **Flooding and plant growth** (T.T. Kozlowski, ed.). Academic Press, London. Pp.47-128.
- JACKSON, M.B.; DAVIES, D.D.; LAMBERS, H. & VARTAPETIAN, B.B. 1991. **Plant life under oxygen stress: ecology, physiology and biochemistry**. SPB Academic Publishing, The Hague.
- JACOBSON, L. & ORDIN, L. 1954. Organic acid metabolism and ion absorption in roots. **Plant Physiol.**, 29: 70-75.

- JACOBY, B. & LATIES, G.G. 1971. Bicarbonate fixation and malate compartmention in relation to salt-induced stoichiometric synthesis of organic acid. **Plant Physiol.**,47: 525-531.
- JENSEN, W.A 1962. **Botanical histochemistry: principles and practice.** W.H. Freeman, San Francisco.
- JENSEN, C.R.; LUXMOORE, R.J.; VAN GUNDY, S.D. & STOLZY, L.H. 1969. Root air space measurements by a pycnometer method. **Agron. J.** 61:474-475.
- JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique.** Mc Graw-Hill, New York.
- JOLY, C.A 1986. Heterogeneidade ambiental e diversidade de estratégias adaptativas de espécies de mata de galeria. **Anais do X Simpósio Anual da ACIESP**, 50: 19-38.
- JOLY, C.A. 1991. Flooding tolerance in Tropical forest trees. In: **Plant life under oxygen stress: ecology, physiology and biochemistry.** (M. B. Jackson, D. D. Davies, H. Lambers & B. B. Vartapetian, eds.). SBP Academic Publishing, The Hague. Pp: 23-34.
- JOLY, C.A. 1994. Flooding tolerance: a reinterpretation of Crawford's metabolic theory. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh**, 102: 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 *Asorus calamus* L. (Araceae) under hypoxia and anoxia. **Functional Ecology**, 9: 505-510.
- JUSTIN, S.H.F.W. & ARMSTRONG, W. 1987. The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. **New Phytol.**, 106: 465-495.
- KAWASE, M. 1981. Anatomical and morphological adaptation of plants to waterlogging. **Hortic. Science**, 16: 30-34.
- KAWASE, M. & WHITMOYER, R.E. 1980. Aerenchyma development in waterlogged plants. **Am. J. Bot.**, 66: 183-196.

- KEELEY, J.E. 1978. Malic acid accumulation in roots in response to flooding: Evidence contrary to its role as an alternative to ethanol. **J. Exp. Bot.**, 29: 1345-1349.
- KENNEDY, R.A.; BARRETT, S.C.H.; VAN DER ZEE, D. & RUMPHO, M.E. 1980. Germination and seedling growth under anaerobic conditions in *Echinochloa crus-galli* (barnyard grass). **Plant Cell Environ.**, 3: 243-248.
- KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E. & FOX, T.C. 1992. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiol.**, 100: 1-6.
- KING, J. 1970. The isolation, properties and physiological role of lactic dehydrogenase from soybean cotyledons. **Can. J. Bot.**, 48: 533-540.
- KLUDZE, H.K.; PEZESHKI, S.R. & DELAUNE, R.D. 1994. Evaluation of root oxygenation and growth in baldcypress in response to short-term soil hypoxia. **Can. J. Res.**, 24: 804-809.
- KOLB, R.M.; GILONI, P.C.; MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E. & PIMENTA, J.A. 1998. Anatomia ecológica de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae) submetida ao alagamento. **Revta. Brasil. Bot.** (aceito).
- KOZLOWSKI, T.T. 1984. Responses of woody plants to flooding. In: **Flooding and plant growth** (T.T Kozlowski, ed.). Academic Press, New York. Pp: 129-163.
- KUNIYOSHI, Y.S. 1993. Aspectos morfo-anatômicos do caule, raiz e folha de *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC (Bignoniaceae) em diferentes fases sucessionais no litoral do Paraná. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- LAAN, P.; BERREVOETS, M.J.; LYTHE, S.; ARMSTRONG, W. & BLOM, C.W.P.M. 1989. Root morphology and aerenchyma formation as indicators of the flood-tolerance of *Rumex* species. **J. Ecol.**, 77: 693-703.
- LAAN, P. & BLOM, C.W.P.M. 1990. Growth and survival responses of *Rumex* species to flooded and submerged conditions: The importance of shoot elongation, underwater photosynthesis and reserve carbohydrates. **J. Exp. Bot.**, 41: 775-783.
- LAAN, P.; TOSSERAMS, M.; BLOM, C.W.P.M. & VEEN, B.W. 1990. Internal oxygen transport in *Rumex* species and its significance for respiration under hypoxic conditions. **Plant and Soil**, 122: 39-46.
- LAAN, P.; SMOLDERS, A & BLOM, C.W.P.M. 1991. The relative importance of anaerobiosis and high iron levels in the flood tolerance of *Rumex* species. **Plant and Soil**, 136: 153-161.
- LARSON, R.A. 1988. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, 27: 969-978.

- LASZLO, A & StLAWRENCE, P. 1983. Parallel induction and synthesis of PDC and ADH in anoxic maize roots. **Mol. Gen. Genet.**, 192: 110-117.
- LIEBERG, S.A. & JOLY, C.A. 1993. *Inga affinis* DC (Mimosaceae): germinação e tolerância de plântulas à submersão. **Revta. Brasil. Bot.**, 16: 175-179.
- 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: 35-40.
- LORENZI, H. 1992. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum, Nova Odessa.
- MARQUES, M.C.M. 1994. Estudos auto-ecológicos do guanandi (*Calophyllum brasiliense* Camb. Clusiaceae) em uma mata ciliar do município de Brotas, SP. **Tese de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MARQUES, M.C.M.; PIMENTA, J.A & COLLI, S. 1992. Germinação de *Cedrela fissilis* Vell. e *Parapiptadenia rigida* (Benth) Bren. após pré-tratamento em condições hipóxicas e posterior estocagem a seco. **Anais do 2º Congresso Nacional sobre Essências Nativas**, Instituto Florestal, São Paulo, Pp: 620-624.
- McCREADY, R.M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V. & OWENS, H.S. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. **Anal. Chem.**, 22: 1156-1158.
- McMANMON, M. & CRAWFORD, R.M.M. 1971. A metabolic theory of flooding tolerance: the significance of enzyme distribution and behavior. **New Phytol.**, 70: 299-306.
- MEDRI, M.E. & CORREA, M.A. 1985. Aspectos histológicos e bioquímicos de *Joanesia principis* e *Spatodea campanulata* crescendo em solos na capacidade de campo, encharcado e alagado. **Semina**, 6: 147-154.
- MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J.A.; DELGADO, M.F. & CORREA, G.T. 1998. Aspectos morfo-anatômicos e fisiológicos de *Peltophorum dubium* (Spr.) Taub. submetido ao alagamento e aplicação de ethrel. **Revta. Brasil. Bot.** (aceito).
- MONK, L.S.; BRÄNDLE, R. & CRAWFORD, R.M.M. 1987. Catalase activity and post-anoxic injury in monocotyledonous species. **J. Exp. Bot.**, 38: 233-246.
- MONK, L.S.; FAGERSTEDT, K.V. & CRAWFORD, R.M.M. 1989. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an anti-oxidant in physiological stress. **Physiol. Plant**, 76: 456-459.
- OKAMOTO, J.M. 1995. Germinação e alguns aspectos do metabolismo de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Fabaceae). **Monografia**, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

- OTTOW, J.C.G.; BENCKISER, G. & WATANABE, I. 1982. Iron toxicity of rice as a multiple nutritional soil stress. **Trop. Agric. Res. Ser.**, 15: 167-179.
- PERATA, P. & ALPI, A. 1991. Ethanol-induced injuries to carrot cells. **Plant Physiol.**, 95: 748-752.
- PERATA, P.; POZUETA-ROMERO, J.; AKAZAWA, T. & YAMAGUCHI, J. 1992. Effect of anoxia on starch breakdown in rice and wheat seeds. **Planta**, 188: 611-618.
- PERATA, P. & ALPI, A. 1993. Plant responses to anaerobiosis. **Plant Science**, 93: 1-17.
- PERATA, P.; GESHI, N.; YAMAGUCHI, J. & AKAZAWA, T. 1993. Effect of anoxia on the induction of α -amylase in cereal seeds. **Planta**, 191: 402-408.
- PEZESHKI, S.R. & DELAUNE, R.D. 1990. Influence of sediment oxidation-reduction in *Spartina patens*. **Acta Ecol.**, 11: 377-383.
- PEZESHKI, S.R. MATTHEWS, S.W. & DELAUNE, R.D. 1991. Root cortex structure and metabolic response of *Spartina patens* to soil redox conditions. **Environ. Exp. Bot.**, 31: 91-97.
- PIMENTA, J.A.; BIANCHINI, E. & MEDRI, M.E. 1996. Aspectos da morfo-anatomia e fisiologia de *Jacaranda puberula* Cham. (Bignoniaceae) em condições de hipoxia. **Revta. Brasil. Bot.**, 19: 215-220.
- PONNAMPERUMA, F.N. 1984. Effects of flooding on soil. In: **Flooding and plant growth**. (T.T. Kozlowski ed.). Academic Press, London, Pp: 195-209.
- PURVIS, AC. & WILLIAMSON, R.E. 1972. Effects of flooding and gaseous composition of the root environment on growth of corn. **Agron. J.**, 64: 674-678.
- RAYMOND, P.; AL-ANI, A & PRADET, A. 1983. Low contribution of nonrespiratory pathways in ATP regeneration during early germination of lettuce seeds. **Physiol. Vég.**, 21: 677-687.
- 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.
- REGGIANI, R.; CANTU, C.A ; BRAMBILLA, I. & BERTANI, A. 1988. Accumulation and interconversion of amino acids in rice roots under anoxia. **Plant Cell Physiol.**, 26: 981-987.
- REID, D.M. & CROZIER, A. 1971. Effects of waterlogging in the gibberellin contents and growth of tomato plants. **J. Exp. Bot.**, 22: 39-48.

- REID, D.M. & BRADFORD, K.J. 1984. Effects of flooding on hormonal relations. In: **Flooding and plant growth** (T.T. Kozlowski, ed.). Academic Press, New York. Pp: 195-219.
- RICARD, B.; MOCQUOT, B.; FOURNIER, A ; DELSENY, M. & PRADET, A 1986. Expression of alcohol dehydrogenase in rice embryos under anoxia. **Plant Mol. Biol.**, 7: 321-329.
- RICARD, B.; COUÉE, I.; RAYMOND, P.; SAGLIO, P.H.; SAINT-GES, V. & PRADET, A 1994. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. **Plant Physiol. Biochem.**, 32: 1-10.
- RIVOAL, J.; RICARD, B. & PRADET, A 1991. Lactate dehydrogenase in *Oriza sativa* L. seedlings and roots. **Plant Physiol.**, 95: 682-686.
- RIVOAL, J. & HANSON, AD. 1993. Evidence for a large and sustained glycolytic flux to lactate in anoxic roots of some members of the halophytic genus *Limonium*. **Plant Physiol.**, 101: 553-560.
- ROBERTS, J.K.M; CALLIS, J; JARDTEZKY, O.; WALBOT, V. & FREELING, M 1984a. Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding tolerance in plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 81: 6029-6033.
- ROBERTS, J.K.M.; CALLIS, J; WEMMER, D.; WALBOT, V. & JARDTEZKY, O. 1984b. Mechanism of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under hypoxia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 81: 3379-3383.
- ROBERTS, J.K.M.; ANDRADE, F.H. & ANDERSEN, I.C. 1985. Further evidence that cytoplasmic is a determinant of flooding intolerance in plants. **Plant Physiol.**, 77: 492-494.
- ROBERTS, J.K.M.; HOOKS, M.A ; MIAULLIS, AP.; EDWARDS, S. & WEBSTER, C. 1992. Contribution of malate and amino acid metabolism to cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize roots tips studies using Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. **Plant Physiol.**, 98: 480-487.
- RUMPHO, M.E. & KENNEDY, R.A. 1981. Anaerobic metabolism in germinating seeds of *Echinochloa crus-galli* (barnyard grass): Metabolite and enzyme studies. **Plant Physiol.**, 68: 165-168.
- RUMPHO, M.E. & KENNEDY, R.A. 1983a. Anaerobiosis in *Echinochloa crus-galli* (barnyard grass) seedlings. Intermediary metabolism and ethanol tolerance. **Plant Physiol.**, 72: 44-49.
- RUMPHO, M.E. & KENNEDY, R.A. 1983b. Activity of the pentose phosphate and glycolytic pathways during anaerobic germination of *Echinochloa crus-galli* (barnyard grass) seeds. **J. Exp. Bot.**, 34: 893-902.
- SACHS, M.M.; FREELING, M. & OKIMOTO, R. 1980. The anaerobic proteins of maize. **Cell**, 20: 761-767.

- SAGLIO, P.H.; RAYMOND, P. & PRADET, A. 1980. Metabolic activity and energy charge of excised maize roots tips under anoxia control by soluble sugars. **Plant Physiol.**, 66: 1053-1057.
- SAINT-GES, V.; ROBY, C.; BLIGNY, R.; PRADET, A & DOUCE, R. 1991. Kinetic studies of the variation of cytoplasmic pH, nucleotide triphosphates (^{31}P -NMR) and lactate during normoxic and anoxic transitions in maize root tips. **Eur. J. Biochem.**, 200: 477-482.
- SASS, J.E. 1951. **Botanical microtechnique**. Iowa State College Press, Ames.
- SCARANO, F.R. & CRAWFORD, R.M.M. 1992. Ontogeny and the concept of anoxia-tolerance: the case of the Amazonian leguminous tree *Parkia pendula*. **J. Trop. Ecol.**, 8: 349-352.
- SCARANO, F.R.; RIBEIRO, K.T.; MORAES, L.F.D. de & LIMA, H.C. de. 1997. Plant establishment on flooded and unflooded patches of a freshwater swamp forest in southeastern Brazil. **J. Trop. Ecol.**, 14: 793-803.
- SCHLÜTER, U.B.; FURCH, B. & JOLY, C.A. 1993. Physiological and anatomical adaptations by young *Astrocaryum jauari* Mart. (Arecaceae) in periodically inundated biotopes of central Amazonia. **Biotropica**, 25: 384-396.
- SCOTT Jr., T.A & MELVIN, E.H. 1953. Determination of dextran with anthrone. **Anal. Chem.**, 25: 1656-1661.
- SENA-GOMES, AR. & KOZLOWSKI, T.T. 1980 a. Effects of flooding on growth of *Eucalyptus camaldulensis* and *E. globulus* seedlings. **Oecologia**, 46: 139-142.
- SENA-GOMES, AR. & KOZLOWSKI, T.T. 1980 b. Responses of *Pinus halepensis* seedlings to flooding. **Can. J. For. Res.**, 10: 308-311.
- SMALL, J.G.C.; McNAUGHTON, J.E. & GREEFF, J.H. 1977. Physiological studies on the germination of *Erythrina caffra* Thunb. seeds. **J. South African Bot.**, 43: 213-222.
- SMALL, J.G.C.; POTGIETER, G.P. & BOTHA, F.C. 1989. Anoxic seed germination of *Erythrina caffra*: ethanol fermentation and response to metabolic inhibitors. **J. Exp. Bot.**, 40: 375-381.
- SMIRNOFF, N. & CRAWFORD, R.M.M. 1983. Variation in the structure and response to flooding of root aerenchyma in some wetland plants. **Ann. Bot.**, 51: 237-249.
- SMITH, AM. & AP REES, T. 1979. Effect of anaerobiosis on carbohydrate oxidation by roots of *Pisum sativum*. **Phytochem.**, 18: 1453-1458.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, F. 1979. **Biometria: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica**. H Blume ediciones, Madrid.

- TANG, Z.C. & KOZLOWSKI, T.T. 1982 a. Some physiological and morphological responses of *Quercus macrocarpa* seedlings to flooding. **Can. J. For. Res.**, 10: 308-311.
- TANG, Z.C. & KOZLOWSKI, T.T. 1982 b. Some physiological and growth responses of *Betula papyrifera* seedlings to flooding. **Physiol. Plant.**, 55: 415-420.
- TRIPEPI, R.R. & MITCHELL, C.A. 1984. Stem hypoxia and root respiration of flooded maple and birch seedlings. **Physiol. Plant.**, 60: 567-571.
- VANLERBERGHE, G.C.; FEIL, R. & TURPIN, D.H. 1990. Anaerobic metabolism in the N-limited green alga *Selenastrum minutum*. **Plant Physiol.**, 94: 1116-1123.
- VIDAL, B.C. 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell. Mol. Biol.**, 22: 45-64.
- VISSER, E.J.W.; HEIJINK, C.J.; HOUT, K.J.G.M.; VOESENEK, L.AC.J.; BARENDSE, G.W.M. & BLOM, C.W.P.M. 1995. Regulatory role of auxin in adventitious root formation in two species of *Rumex*, differing in their sensitivity to waterlogging. **Physiol. Plant.**, 93: 116-122.
- VOESENEK, L.AC.J. & BLOM, C.W.P.M. 1989. Growth responses of *Rumex* species in relation to submergence and ethylene. **Plant Cell Environ.**, 12: 433-439.
- WILLIAMS, W.T. & BARBER, D.A. 1961. The functional significance of aerenchyma in plants. **S. Exp. Bot. Symp.**, 12: 243-251.
- WILLIGEN, P. DE & NOORDWIJK, M. VAN. 1984. Mathematical models on diffusion of oxygen to and within plant roots, with special emphasis on effects of soil-root contact. **Plant and Soil**, 77: 233-241
- YAMAMOTO, W.T. & KOZLOWSKI, T.T. 1987a. Effect of flooding of soil on growth, stem anatomy, and ethylene production of *Cryptomeria japonica* seedlings. **Scand. J. For. Res.**, 2: 45-58.
- YAMAMOTO, W.T. & KOZLOWSKI, T.T. 1987b. Regulation by auxin and ethylene of responses of *Acer negundo* seedlings to flooding of soil. **Environ. Exp. Bot.**, 27: 329-340.
- YAMAMOTO, F.; KOZLOWSKI, T.T. & WOLTERS, K.E. 1987. Effect of flooding on growth, stem anatomy, and ethylene production of *Pinus halepensis* seedlings. **Can. J. For. Res.**, 17: 69-79.

- YAMAMOTO, F.; SAKATA, T. & TERAZAWA, K. 1995. Growth, morphology, stem anatomy, and ethylene production in flooded *Alnus japonica* seedlings. **IAWA J.**, 16: 47-59.
- YANG, S.F. & HOFFMAN, N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, 35: 155-189.
- ZHANG, J. & DAVIES, W.J. 1986. Chemical and hydraulic influence on the stomatal of flooded plants. **J. Exp. Bot.**, 37: 1479-1491.