**Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências**

RAYANE DE TASSO MOREIRA RIBEIRO

**Mobilização de reservas durante a germinação e estabelecimento de
plântulas de *Macrolobium acaciifolium* Benth. (Leguminosae) e seu papel na
adaptação aos pulsos de alagamento na Amazônia**

**Storage mobilization during germination and seedling establishment of
Macrolobium acaciifolium Benth. (Leguminosae) and its role on the
adaptation to the inundation pulses in the Amazon**

**São Paulo
2013**

RAYANE DE TASSO MOREIRA RIBEIRO

**Mobilização de reservas durante a germinação e estabelecimento plântulas
de *Macrolobium acaciifolium* Benth. (Leguminosae) e seu papel na
adaptação aos pulsos de alagamento na Amazônia**

**Storage mobilization during germination and seedling establishment of
Macrolobium acaciifolium Benth. (Leguminosae) and its role on the
adaptation to the inundation pulses in the Amazon**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Ciências na Área de
Botânica.

Orientador: Marcos Silveira Buckeridge

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Ribeiro, Rayane de Tasso Moreira
Mobilização de reservas durante a germinação e estabelecimento
plântulas de *Macrobium acaciifolium* Benth. (Leguminosae) e seu
papel na adaptação aos pulsos de alagamento na Amazônia

64 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de
São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Amazônia. 2. Semente. 3. Reservas.

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento
de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

Dedico este trabalho a Deus fonte da vida
e minha mãe que lutou para educar-me
em meio a tantas vicissitudes

Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas
Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha fonte de força e coragem para viver cada dia.

A minha mãe Solange e aos meus irmãos Rayssa e Ronald por sempre estarem junto de mim e serem as pessoas que mais amo neste mundo.

Ao Prof. Dr. Marcos Buckeridge, pela oportunidade, confiança, e, especialmente por todo aprendizado que recebi ao longo do mestrado.

A todos que compõem o Laboratório de Anatomia Vegetal, em especial para o Prof. Dr. Gregório Ceccantini, Prof. Dra. Gladys Flávia, Aline, Vitor, Tássia, Gisele e Irwandro pelo espaço e equipamentos cedido e a pronta ajuda.

A todos que compõem ou compuseram o LAFIECO durante meu mestrado: Adriana, Eveline, Débora, Luís, Vinícius, Amanda Rusiska, Eglee.

A minhas queridas amigas de laboratório e de vida: Ana, Lara, Viviane, Giovanna, Marta, Bruna, Amanda Souza, sem vocês realmente não teria conseguido ingressar e concluir o mestrado e estas amizades vou levar por toda a vida.

Ao meu grande amigo Ildefonso Jr., por toda a ajuda e amizade ao longo deste mestrado e espero levar essa amizade para onde eu for.

Aos meus queridos amigos: Luciano, Juliana, Khaterine, Renata, Nara, Andréia, Vitória, Déborah, Aline, Jéssica, Gabriela, Nara Alencar, Stelamaris, Dayanne, Ruth, Maria Rivaldina, Isolda e Marinetes.

Aos meus queridos amigos da igreja: Célia, Tia Nenza, Paulo, Julianne, Francisca das Chagas, por todo apoio e oração.

A Pâmela, Litzy, Alberto e Iara por me receberem de portas abertas e ajudarem sempre que possível.

Aos demais amigos, professores e funcionários da Universidade de São Paulo, em especial do Departamento de Botânica, por toda a ajuda para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida

ÍNDICE

RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
Obtenção do material vegetal e germinação	23
Delineamento experimental e coleta das amostras	24
Medidas de crescimento e alocação de biomassa	25
Trocas gasosas	26
Quantificação de clorofilas a e b, carotenoides e antocianinas	26
Quantificação de açúcares solúveis e amido	27
Extração e análise do xiloglucano	28
Perfil de monossacarídeos	28
Obtenção dos oligossacarídeos	28
Espectrometria de massas (MALDI-TOF)	29
Análises citoquímicas	29
Análise de dados	30
RESULTADOS	31
Aspectos da germinação e estabelecimento de plântulas de <i>Macrolobium acaciifolium</i>	31
Crescimento e alocação de biomassa	33
Trocas gasosas	36
Clorofilas a e b, carotenóides e antocianinas.....	37
Açúcares solúveis	38
Análises citoquímicas	40
Amido e xiloglucano	42
Composição e metabolismo do xiloglucano durante a mobilização de reservas de <i>Macrolobium acaciifolium</i>	44
Perfil de oligossacarídeos	48
Espectrometria de massas (MALDI-TOF)	49
DISCUSSÃO	51
Compostos de reserva em sementes de <i>Macrolobium acaciifolium</i>	51

Mobilização de amido e xiloglucano e metabolismo de carboidratos.....	51
Biomassa, trocas gasosas e pigmentos fotossintéticos	52
Adaptações ao alagamento	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

RESUMO

Planícies amazônicas alagáveis apresentam espécies arbóreas que estão sujeitas a um pulso de inundação proveniente das chuvas anuais. Muitas destas espécies apresentam estratégias de adaptação ao alagamento, germinando suas sementes e estabelecendo as plântulas antes do próximo período de cheia. Este é o caso de *Macrobium acaciifolium* (Benth) Leguminosae (Caesalpinoideae), que ocorre nas cotas altitudinais mais altas das várzeas e igapós amazônicos. Neste trabalho, pela primeira vez foi caracterizado o sistema de mobilização de reservas ao longo do período de germinação e estabelecimento das plântulas de *M. acaciifolium*, com o objetivo de compreender os mecanismos fisiológicos e bioquímicos relacionados à sua estratégia em face à inundação. O experimento teve duração de 56 dias, nos quais foram realizadas coletas destrutivas e análises não-destrutivas de sementes e de diferentes partes das plântulas para análises de crescimento, fotossíntese, carboidratos não estruturais (frutose, glucose, sacarose e amido), xiloglucano de reserva e análises citoquímicas correspondentes à detecção de proteínas, amido e xiloglucano de reserva. Após análises citoquímicas e de açúcares, é reportado pela primeira vez na literatura científica, a existência de uma semente que acumula simultaneamente amido e xiloglucano de reserva na parede celular. Não foi observada a presença de corpos protéicos, que é uma característica comum de armazenamento de nitrogênio em sementes de Leguminosae, o que indica que a plântula provavelmente estabelece a assimilação de nitrogênio pelas raízes ao invés de armazenar e mobilizar reservas para isto. Nas sementes de *M. acaciifolium* xiloglucano e amido juntos perfazem 21,6% da massa da semente quiescente. No início da germinação, parte do amido é degradado e há um aumento concomitante de xiloglucano que leva a um equilíbrio entre as duas reservas. Dos 10 aos 14 dias após a embebição (DAE), o amido dos cotilédones é exaurido com concomitante desenvolvimento das raízes e do caule das plântulas. A partir de 20 DAE, o xiloglucano passa a ser degradado e a mobilização ocorre sem alterações na estrutura do polissacarídeo na parede celular e simultâneo acúmulo transitório de galactose, glucose, xilose e amido. Os produtos de degradação do xiloglucano levam à produção de folhas e ao estabelecimento da fotossíntese. As observações feitas neste trabalho sugerem que *M. acaciifolium* apresenta mecanismos de adaptação aos pulsos de inundação da Amazônia durante o processo de germinação e estabelecimento das plântulas.

ABSTRACT

The Amazonian floodplains display tree species that are subjected to yearly inundation pulses. Several of these species colonize these regions are well adapted to the flood pulses, germinating their seeds and establishing seedlings before the next pulse comes. This is the case of *Macrolobium acaciifolium* (Benth) Leguminosae (Caesalpinoideae) that occur in the upper part of the riverbanks of the amazonian várzeas and igapós. In the present work, we characterized for the first time the system of storage mobilization along the period of seed germination and seedling establishment with the objective of understanding the physiological and biochemical mechanisms related to the strategy of *M. acaciifolium* to face the next flooding season. The experiment was performed for 56 days in which destructive and non-destructive analyses of the seed and different parts of seedlings were performed for analyses of growth, photosynthesis, non-structural carbohydrates (fructose, glucose, sucrose, raffinose and starch), storage xyloglucan and corresponding cytochemical analyses to detect proteins, starch and storage xyloglucan in cotyledon tissues. After cytochemical and sugar analyses, it is reported for the first time in scientific literature the existence of a seed that accumulates starch and storage xyloglucan on the cell wall simultaneously. The presence of protein bodies, a common feature of seeds of the Leguminosae, was not observed, indicating that seedlings probably establish nitrogen assimilation very quickly through the newly formed roots instead of using a storage mobilization system for this reserve type. In seeds of *M. acaciifolium* starch and xyloglucan correspond to 21,6% of the quiescent seed mass. At the beginning of germination, some starch is degraded with a concomitant increase in storage xyloglucan so that the yields of the two polymers become equal. From 10 to 14 days after imbibition (DAI), all starch is mobilized to support root and stem growth. From 20 DAI, xyloglucan is completely degraded without changes in its structure and with transient accumulation of galactose, glucose, xylose and starch. The products of degradation of storage xyloglucan lead to the production of leaves and photosynthesis establishment. The observations made in this work suggest that *M. acaciifolium* show unique mechanisms of adaptation to the inundation pulses in the Amazon during the germination and seedlings establishment.

INTRODUÇÃO

As florestas alagáveis amazônicas são constituídas por uma complexa rede de lagos e planícies (JUNK, 1989). A flutuação do nível de água nas planícies alagáveis pode chegar a 14 metros e durar até 270 dias por ano (JUNK, 1989; FERREIRA, 1997a; PAROLIN, 2000). O pulso de inundação verificado nos grandes rios da Amazônia é resultante do somatório das chuvas de toda a bacia de drenagem e do degelo anual do verão andino e estabelece no ambiente a existência, ao longo do ano, de uma fase aquática e uma fase terrestre para as espécies que ali habitam (JUNK *et al.*, 1989).

As regiões alagáveis, que cobrem cerca de 6% da bacia amazônica ou uma área de 300 000 km², são classificadas de acordo com as propriedades físico-químicas e da qualidade da água das inundações em dois tipos principais: Várzea (4%, 200 000 km²) e Igapó (2%, 100 000 km²) (SIOLI, 1951; IRION *et al.*, 1983). A primeira é formada por rios de água branca, férteis, pois os rios associados a essas áreas carregam muitos sedimentos em suspensão, devido a sua origem, nas regiões montanhosas dos Andes e encostas pré-andinas. Já os Igapós são alagados por rios de águas pretas, que drenam regiões de solos arenosos, bastante erodidos, pobres em nutrientes, pois se originam em áreas geologicamente antigas do escudo das Guianas e do Brasil Central. São águas ácidas, pobres em nutrientes e carregadas de matéria orgânica diluída (PRANCE, 1979; FURCH, 1984; JUNK, 1984; JUNK, 1993).

Consequentemente, a composição florística nas áreas alagáveis é influenciada por uma combinação de fatores como a frequência e a duração da inundação, a tolerância das plântulas à saturação hídrica do solo e as características físico-químicas do mesmo. A adaptação das plantas a este ambiente está relacionada à evolução de adaptações fisiológicas, morfológicas, anatômicas e fenológicas, que lhes confere um desenvolvimento e reprodução eficientes (KOZLOWSKI, 1997; SCHÖNGART *et al.*, 2002; OLIVEIRA-WITTMANN *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.* 2009).

A distribuição das espécies arbóreas nas florestas alagáveis dá-se ao longo do gradiente de inundação, ficando a maioria delas restritas a limitadas faixas topográficas. Com isso, plantas que ocupam as cotas mais baixas no gradiente de inundação são mais adaptadas a essas condições do que aquelas que ocupam cotas mais altas (WITTMANN *et al.*, 2002).

Uma das adaptações amplamente descritas para espécies dessa região é a dispersão de sementes dos tipos anemo, hidro ou zoocórica, e este mecanismo está interligado com os

processos de floração e frutificação, sincronizados com o ciclo hidrológico, permitindo a dispersão dos diásporos pela água ou por peixes (KUBTZKI; ZIBURSKI, 1994; WITTMANN; PAROLIN, 1999; PAROLIN, 2002; PAROLIN, 2010).

Após a dispersão, a germinação rápida é uma forma eficiente de utilizar o solo não inundado para desenvolvimento da plântula. Isto ocorre na maioria das espécies de várzea, uma vez que já foi mencionado que o número de folhas e a altura das plântulas alcançadas, produzidas antes da fase aquática, podem ser responsáveis pela sobrevivência na fase de alagamento (PAROLIN, 2001) e também por características como o tempo de germinação (NG, 1978).

A germinação consiste em um processo complexo e extremamente dependente do equilíbrio dinâmico entre fatores endógenos e exógenos para que ocorra de maneira satisfatória (TAIZ & ZEIGER, 2009). O processo germinativo compreende o início da embebição de água pela semente, e termina frequentemente quando há a protrusão da radícula (BEWLEY & BLACK, 1994).

Em planícies alagáveis, este processo é rápido, pois a fase terrestre tem de ser utilizada para a germinação, crescimento e estabelecimento das plântulas. Por exemplo, a viabilidade, que é a habilidade de germinar por períodos variáveis e geneticamente determinados, após a dispersão das sementes de *Salix martiana* é de 24 h e as sementes de *Campsiandra comosa* possuem viabilidade de 24 dias (MALAVASI, 1988; OLIVEIRA, 1998; PAROLIN, 2001). Portanto, tratam-se de sementes que são viáveis por um curto período, em comparação com sementes de espécies não inundáveis de florestas tropicais, que podem se manter viáveis por vários anos (VAZQUEZ-YÁNES & OROZCO-SEGOVIA, 1990).

A curta viabilidade das sementes de florestas tropicais relaciona-se ao fato de que a maioria destas é recalcitrante, isto é possuem elevado teor de água em seu interior (acima de 25%), como é caso *Cynometra bauhiniifolia* que possui 54,1% de água na semente quiescente (NAZÁRIO *et al.*, 2008; PAROLIN & WITTMANN, 2010).

Questões relacionadas ao tipo de germinação também podem ser peculiares em planícies inundáveis. Um estudo realizado com 31 espécies das florestas alagáveis da Amazônia Central, mostrou que nesse ecossistema o tipo de germinação predominante (59,1%) é a hipógea, caracterizada por plântulas cujos cotilédones carnosos permanecem abaixo ou ao nível do solo ao fim do processo de formação das plântulas. Por outro lado, 40,9% das plantas da mesma região apresentam germinação do tipo epígea, ou seja, plantas

cujos cotilédones permanecem acima do nível do solo. Tais resultados indicam que a germinação hipógea parece ser mais eficiente em planícies inundáveis, com vantagens relacionadas ao maior tamanho da plântula e maior número de folhas em relação às espécies com germinação epígea, auxiliando na resistência ao período de inundação (MOREIRA & MOREIRA, 1996; PAROLIN *et al.*, 2003).

Segundo Ferreira e col. (2009), a sobrevivência e o crescimento inicial de plântulas nas planícies aluviais da Amazônia podem ser fortemente influenciados também pelas reservas disponíveis nas sementes. Isto ocorre porque os compostos acumulados nas sementes podem funcionar tanto como fonte de energia para manter processos metabólicos em funcionamento e/ou como fonte de matéria para a produção de tecidos vegetais que irão constituir a plântula. Uma vez dispersas, as sementes, se germinadas, tornam-se indivíduos independentes da planta mãe podendo se desenvolver em outro local com suas próprias reservas nutritivas, armazenadas principalmente na forma de carboidratos, lipídios e proteínas (BUCKERIDGE *et al.*, 2004). O estabelecimento das plântulas durante o crescimento heterotrófico envolve o uso controlado dessas reservas (mobilização e partição dos produtos) até que as plântulas sejam capazes de extrair do ambiente os recursos necessários ao seu crescimento.

De acordo com Buckeridge e col. (2004), a relação entre a mobilização de reservas, o crescimento e estabelecimento da plântula categoriza 3 classes de sementes:

- Imaturo-eutróficas: onde o embrião presente nas sementes quiescentes é uma massa indiferenciada de células e este se desenvolve à medida que as reservas são mobilizadas lenta e localmente (pós-maturação). Nestes casos, uma parte do processo de maturação foi transferida para o período que se chama de germinação. Isto se dá comumente em sementes da família Arecaceae.

- Maduro-eutróficas: neste caso, o embrião se apresenta com estrutura radicular rudimentar e foliar pré-formadas. As reservas são acumuladas nos cotilédones e/ou endosperma e nestas sementes o processo germinativo é mais rápido do que em sementes imaturo-eutróficas. Isto se dá comumente na maioria das sementes e em especial na de *Glycine max* (soja).

- Maduro-oligotróficas: são sementes que apresentam pouca reserva de carbono para o desenvolvimento da plântula, neste caso o embrião encontra-se num estágio bastante desenvolvido e os cotilédones são foliáceos, se apresentando verdes e se expandido e iniciando

rapidamente a fotossíntese. Representam esse grupo, sementes de *Caesalpinia echinata* e *Inga* sp. (BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

Os principais compostos de reserva em uma semente são carboidratos, lipídios e proteínas, variando em proporção nas diferentes espécies.

As reservas que estão presentes nas sementes podem ser mobilizadas, a fim de compreender o fornecimento de energia durante a retomada do metabolismo da semente, auxiliando na compreensão da relação entre a mobilização das reservas, o crescimento e o desenvolvimento do embrião. Durante a mobilização, as sementes irão dispor das principais reservas produtoras de energia no início da germinação (sacarose e oligossacarídeos da série rafínósica), sendo que durante seu desenvolvimento e estabelecimento da plântula, mobilizarão as reservas que servirão como fonte de matéria (nitrogênio e carbono, principalmente) e energia para os tecidos em formação (BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

As proteínas de reserva normalmente se encontram em organelas denominadas corpos protéicos e são classificadas em função da sua solubilidade. A sua principal função é a de fornecer aminoácidos ou nitrogênio para as plântulas (PERNOLLET & MOSSÉ, 1983). Em relação aos lipídeos, os mesmos são armazenados em forma de triglicerídeos em corpúsculos discretos no citoplasma delimitados por uma única membrana, chamados geralmente de corpos lipídicos (SOMERVILLE, 2000) ou ainda em esferossomos e glóbulos lipídicos (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1989).

Os carboidratos são as principais reservas de armazenamento da maioria das sementes cultivadas. Dentre estes, o amido é o carboidrato mais comumente presente, sendo armazenado em organelas chamadas amiloplastos (BEWLEY *et al.*, 2013). Apesar de o amido constituir a mais importante forma de reserva em quase todas as plantas superiores, sementes que apresentam polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) não possuem quantidades significativas de amido.

Conforme Bewley e col. (2013), a molécula de amido é composta por dois polímeros de D- α -glicose: a amilose e a amilopectina. A proporção dos dois polímeros varia entre sementes de diferentes espécies e pode variar mesmo dentro da mesma espécie. As propriedades funcionais do amido são decorrentes desses dois componentes e na sua organização granular.

Em leguminosas, o amido é uma forma de reserva bastante comum, normalmente depositada nas células dos cotilédones, podendo atingir mais de 50% da massa seca, como em *Pisum* e *Vicia faba* (HALMER, 1985). Seno e col. (1996) caracterizaram o material de reserva de sementes de três espécies de leguminosas e confirmaram a predominância de amido como reserva principal, seguido de proteínas em todas elas.

Figura 1. Modelo representando as moléculas de amilose e amilopectina. Adaptado de BEWLEY *et al.*, 2013.

Em certas sementes, porém, a maior quantidade de carboidratos de reserva não é formada por amido, mas por PRPC, (BUCKERIDGE *et al.*, 2000) que são divididos em três grupos:

1) *galactano*: polissacarídeo formado por $\beta(1 \rightarrow 4)$ -D-galactano que é uma molécula multifuncional, pois além da função de reserva, o galactano é um importante elemento de modulação da expansão cotiledonar durante o desenvolvimento de sementes de *Lupinus* sp (BUCKERIDGE *et al.*, 2010).

2) *mananos* (que podem ser subdivididos em glucomananos, mananos puros e galactomananos): além de todos estes subgrupos possuírem a função de reserva, mananos puros e galactomananos estão relacionados à dureza em endosperma de sementes de

palmeiras, tomate e alface e relações hídricas na semente, respectivamente (BUCKERIDGE, 2010).

3) *xiloglucano*: é a principal hemicelulose encontrada nas paredes celulares das dicotiledôneas e constitui 10 a 20% do peso seco da parede celular primária. Enquanto que na parede celular secundária é depositado como reserva que pode ser posteriormente mobilizada (FRY, 1989; HAYASHI, 1989; O'NEILL & YORK, 2003, BUCKERIDGE, 2010).

O xiloglucano de reserva é um polissacarídeo geralmente encontrado em sementes de espécies das famílias Leguminosae, Tropaeolaceae e Myrcinaceae. São formados por uma cadeia principal de β -D-(1 $\rightarrow$ 4)-glucano ramificada com ligações α -(1 $\rightarrow$ 6) por unidades de D-xilopiranosídeos e β -D-galactopiranosídeo-(1 $\rightarrow$ 2)-D-xilopiranosídeos (HAYASHI, 1989). Quando presente em sementes apresenta dupla função: 1) xeroproteção, onde somente um pequeno número de predadores é capaz de alimentar-se de sementes com este tipo de reserva, devido à necessidade de um grande número de enzimas para a sua degradação, como por exemplo: xiloglucano-endo- β -(1 $\rightarrow$ 4)-glucanase (XET), β -galactosidase (β -gal) e 2) controle da embebição de água, como demonstrado em sementes de *Hymenaea courbaril* (BUCKERIDGE *et al.*, 2000b). Esta proposição pode ser feita com base no fato de que os xiloglucanos possuem propriedades hidrodinâmicas muito semelhantes às encontradas em galactomananos durante a germinação (BUCKERIDGE, 2000a).

A reserva de xiloglucano também está estritamente relacionada com o estabelecimento da fotossíntese como descrito para plântulas de *H. courbaril*. Durante o estabelecimento da plântula foi visto que há duas fontes de carbono simultâneas: a reserva dos cotilédones (xiloglucano), que é gradativamente substituída pela fotossíntese até o momento que o aparato fotossintético se torne capaz de suprir energeticamente a plântula (SANTOS *et al.*, 2004).

Além da função de reserva, as demais funções destes compostos (controle da embebição e distribuição de água nas diferentes partes da semente) são importantes no mecanismo evolutivo que levou as plantas a utilizarem polissacarídeos da parede celular como reserva de carbono (BUCKERIDGE & REID, 1996; BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

Figura 2. Estruturas químicas dos principais polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) que ocorrem em sementes: A) manano puro; B) glucomanano; C) galactomanano; D) xiloglucano. Adaptado de BUCKERIDGE *et al.*, 2008.

A fim de demonstrar a importância de PRPC na ecologia de plantas de regiões alagáveis, Ferreira e colaboradores (2009) analisaram duas populações de *Himatanthus sukuuba* (Apocynaceae) provenientes de ambientes diferentes (várzea - VZ e terra firme - TF). Neste caso, a maior parte dos compostos de reserva (galactomanano) presentes na semente de *H. sukuuba* fica localizada no endosperma. Analisando essas sementes, foram observadas diferenças qualitativas e quantitativas em relação ao galactomanano proveniente das duas populações distintas. As sementes de VZ são ricas em manano, que tem a finalidade de diminuir a absorção de água e acelerar a germinação, enquanto que em TF, apresentam

reservas com as maiores proporções de galactomanano permitindo maior rapidez na absorção de água, assim como maior capacidade de armazenamento da mesma nos tecidos (FERREIRA *et al.*, 2009).

A compreensão do processo de mobilização de reservas em sementes pode auxiliar no entendimento do comportamento ecológico da plântula, sendo este diretamente relacionado com a capacidade de colonização e taxa de sobrevivência em seu local de ocorrência, como visto em sementes de *H. sucubus*.

Em estudos citoquímicos provenientes de observações preliminares no LAFIECO mostraram que sementes de *Macrolobium acaciifolium* armazenam concomitantemente amido e xiloglucano como principais reservas.

A existência de dois carboidratos como reserva na semente quiescente de uma mesma espécie tratava-se de fato ainda não descrito na literatura. Geralmente, acreditava-se que sementes que armazenam majoritariamente amido em seu interior, não apresentariam teores significativos de PRPC. Exemplos são as sementes das espécies *Andira laurifolia*, *Caesalpinia echinata* (56,27 e 30% da massa seca da semente) (HELLMANN, 2008; SASAKI, 2008). Este padrão também é observado em sementes que possuem como principal reserva PRPC, como exemplo: *Copaífera langsdorfii*, *Hymenaea courbaril*. Nesta última o xiloglucano corresponde a 40% da massa seca da semente (SANTOS *et al.*, 2004) (Figura 3A, B).

Figura 3. Cortes transversais em sementes de *Hymenaea courbaril* e *Copaífera langsdorfii* submetidos à coloração com Lugol, evidenciando a presença de xiloglucano nas paredes celulares e corpos protéicos no citoplasma em marrom. Legenda: xg - xiloglucano. Fotos originais de cortes à mão livre feitas para este trabalho.

Na espécie *Tropaeolum majus*, um dos principais modelos para estudo de xiloglucanos de reserva, Hoth e colaboradores (1986) demonstraram que a produção e armazenamento do xiloglucano de reserva nos cotilédones ocorre às custas do acúmulo transitório de amido.

Porém, ao término do depósito de xiloglucano, quando a maturação da semente é completada, o teor de amido nos cotilédones cai à zero, de forma que este polímero não irá funcionar com composto de reserva para a germinação ou o crescimento inicial das plântulas. Um processo similar foi observado em jatobá, ou seja, acúmulo de amido transitório durante o depósito de xiloglucano nos cotilédones (resultados não publicados). Porém, como mostrado na Figura 3, não há tampouco acúmulo de amido nas sementes quiescentes.

Macrolobium acaciifolium Benth. (Leguminosae), popularmente conhecida como arapari, é uma espécie arbórea, semi-decídua e na sucessão ecológica é considerada como espécie-clímax (WORBES, 1996; KREIBICH, 2002; SCHÖNGART *et al.*, 2002). Esta espécie pertence à família Leguminosae e ocorre em baixas elevações de igapós (águas pobres em nutrientes) e nas florestas de várzea (ricas em nutrientes) da Amazônia, portanto apresenta tolerância à inundação, ficando parcialmente submersa entre abril a agosto (PAROLIN *et al.*, 2002).

M. acaciifolium atinge de 20-30 metros de altura, tronco de até 150 cm de diâmetro e pode alcançar até 500 anos de idade (Figura 4). Dentro da várzea, as árvores desta espécie possuem de 40-80 anos e estão sujeitas a 140 até 230 dias de inundação por ano (WORBES *et al.*, 1992; KLINGE *et al.*, 1996). Já nos igapós, estas ocorrem em solos argilosos inundados de 150-200 dias por ano (PIEDEDE, 1985; WORBES, 1997).

Por ser uma espécie adaptada a longos períodos de inundação, possui diferentes estratégias para sobreviver ao alagamento. Uma delas é respiração anaeróbica em suas raízes com produção de etanol, lactato e malato e o câmbio vascular é dormente, causando a formação de apenas um anel por ano (SCHLÜTER, 1989).

A formação de apenas um anel cambial por ano com poucas anomalias, a larga distribuição nas planícies amazônicas e também o fato de serem árvores antigas, faz de *M. acaciifolium* uma espécie essencial nos estudos de alterações climáticas da região amazônica (SCHÖNGART, 2005).

Figura 4. A espécie *Macrobium acaciifolium*. A) Planta adulta às margens de uma floresta de várzea; B) Detalhe dos ramos; C) Ramo com inflorescências; D) Detalhe da folha; E) Fruto. Fotos: BATISTA & SCHÖNGART, 2003; BRUNA ARENQUE, 2010 – Manaus, AM.

Em virtude da observação feita pela primeira vez de uma combinação de reservas de amido e xiloglucano nas sementes quiescentes de *M. acaciifolium*, este trabalho vem contribuir com um novo modelo de estudos de mobilização de reserva de sementes. No presente trabalho foi efetuada a caracterização da mobilização destes polissacarídeos com o objetivo de compreender como se dá a utilização de ambos (amido e xiloglucano) no desenvolvimento das plântulas de *M. acaciifolium* e determinar como este padrão de mobilização influencia na sobrevivência e sucesso da espécie no seu local de ocorrência, nas regiões alagáveis da Amazônia.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo descrever a mobilização de amido e xiloglucano de reserva nos cotilédones de *Macrolobium acaciifolium* ao longo da germinação e estabelecimento da plântula.

Objetivos específicos

- Caracterizar temporalmente a mobilização das reservas de amido e xiloglucano na semente através de análises citoquímicas e bioquímicas;
- Determinar o papel de cada um dos polissacarídeos nos períodos pré e pós-germinativos;
- Relacionar o acúmulo e mobilização de polissacarídeos com o estabelecimento do aparato fotossintético nas plântulas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal e germinação

Os frutos de *Macrolobium acaciifolium* foram coletados em matrizes na região de Manaus, como a Ilha do Careiro (3°16'S/59°59'W) e Marchantaria (3°15'S/59°58'W), no estado do Amazonas e enviados para o Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas (Lafieco), onde foram preservados em água até o início do experimento (Figura 5).

Figura 5. Mapa das áreas de coleta dos frutos de *Macrolobium acaciifolium* nas Ilhas do Careiro e Marchantaria, nas proximidades de Manaus.

Fonte: Google mapas/2013.

Inicialmente as sementes foram retiradas dos frutos e pesadas para obtenção da massa fresca inicial, em seguida foram colocadas para germinar em bandejas com vermiculita e mantidas em câmara de crescimento do tipo BOD a 28 °C em fotoperíodo de 12 horas

(CABRAL DOS ANJOS *et al.*, 2010). Transcorridos 14 dias após o início da embebição (DAE), as plântulas foram transferidas para copos plásticos de 500 ml e mantidas na mesma condição de luz e temperatura descrita anteriormente (Figura 6).

Figura 6. Germinação e cultivo das plântulas de *Macrolobium acaciifolium*. A) Germinação em bandejas com vermiculita em BOD; B) Transferência das plântulas para copos plásticos de 500 ml (14 DAE).

Delineamento experimental e coleta das amostras

O experimento teve duração de 56 dias e foi realizado entre julho e setembro de 2012. Durante este período foram realizadas coletas destrutivas e não destrutivas. A primeira coleta destrutiva foi realizada no primeiro dia de experimento (T0 - semente quiescente) e as demais realizadas com intervalos de 2 dias entre si (T1), 4 dias (T2, T3, T4, T5) e 6 dias (T6, T7, T8, T9, T10, T11 e T12), contado a partir do dia inicial do experimento. Dessa forma, totalizaram-se 13 coletas com *n* amostral de 5 (Figura 7).

Em cada uma das coletas as sementes foram pesadas individualmente para determinação da massa fresca, em seguida foram seccionadas para obtenção de uma porção dos cotilédones que foi fixada para posterior análise citoquímica. O restante do cotilédone foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido para secagem em liofilizador e posterior determinação da

massa seca. Os cotilédones secos foram então pulverizados e utilizados para análises bioquímicas. Em cada uma das coletas, além dos cotilédones foram amostrados folhas, caule e raízes de cada plântula para análises alométricas e posteriores determinações de açúcares solúveis e amido.

As coletas não destrutivas tiveram início no 20º dia de experimento (T6) e foram obtidas medidas de trocas gasosas e condutância estomática com *n* amostral de 5 plantas por coleta, totalizando 7 coletas (Figura 7).

Figura 7. Delineamento do experimento realizado durante o período de julho a setembro de 2012, compreendendo a fase de germinação e pós-germinação da espécie estudada.

Medidas de crescimento e alocação de biomassa

Para cada planta coletada, foram mensurados a altura, área foliar, número de folhas e biomassa, de acordo com a metodologia descrita por MARABESI (2007).

A altura foi medida da primeira raiz lateral até a base do meristema apical do caule e a área foliar total de cada planta foi calculada como a somatória das áreas de todas as folhas de cada planta. Como as folhas desta espécie são compostas, a área de cada folha foi calculada como a somatória da área de todos seus folíolos. A área aparente de cada folíolo foi calculada multiplicando o maior comprimento (C) pela maior largura (L) dos folíolos. Estes folíolos foram digitalizados e obteve-se a área real do folíolo através do programa de reconhecimento de área (IMAGE PRÓ PLUS VERSÃO 6.3, 2008).

Para descrever a alocação de biomassa, foi utilizado o conceito de frações de massa, onde a fração de determinado órgão da planta (raiz, caule e folha) foi calculada dividindo-se a

massa seca do respectivo órgão pela massa seca da planta toda (g.g^{-1}), segundo a fórmula abaixo.

$$F(O) = m (F C R) / B$$

, onde F (O) representa a fração do órgão, sendo utilizado FF para a fração folhas, FC para a fração caule e FR para a fração raiz; m a massa seca dos respectivos órgãos indicado pelo subscrito (F = folhas, C= caule e R= raiz) e B a massa seca total da planta (Poorter & Nagel, 2000).

Trocas gasosas

A taxa fotossintética e condutância estomática foram avaliadas através de medidas pontuais utilizando um medidor portátil de fotossíntese (modelo LI 6400 XTR, Li-Cor), que consiste em um sistema aberto contendo um analisador de gases por infravermelho (IRGA), inferindo o diferencial entre CO_2 e H_2O em um fluxo de ar que passa pela câmara onde se localiza a unidade foliar em medição.

As medidas pontuais foram realizadas na primeira folha totalmente expandida e obedeceu aos seguintes parâmetros: 28°C como temperatura da folha, fluxo de $400 \mu\text{mol}$ e a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) foi de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Quantificação de clorofilas a e b, carotenóides e antocianinas

Em cada ponto amostral foram coletados discos foliares ($n=5$). O disco foliar foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e o material armazenado em freezer -80°C até a extração (no máximo 24h após a coleta). A extração de clorofila a e b e carotenoides foi realizada de acordo com Porra e col. (1989). Foram adicionados 2 mL de acetona 80% ao material que foi macerado e posteriormente centrifugado a $13400g$ a 4°C . A absorbância do sobrenadante foi determinada por espectrofotômetro com três comprimentos de onda distintos: 663 nm para clorofila a, 645 nm para clorofila b e 470 nm para carotenóides (LICHTENTHALER, 1987). A partir das absorbâncias foram calculadas as concentrações desses pigmentos pelas equações onde a quantidade de clorofila e carotenóides é dada em $\mu\text{g.g MF}^{-1}$:

Clorofila a = $12,25 \cdot \text{Abs}_{663} - 2,79 \cdot \text{Abs}_{645}$

Clorofila b = $21,50 \cdot \text{Abs}_{645} - 5,10 \cdot \text{Abs}_{663}$

Clorofila a + b = $7,15 \cdot \text{Abs}_{663} + 18,71 \cdot \text{Abs}_{645}$

Carotenóides totais = $(1000 \cdot \text{Abs}_{470} - 1,82 \cdot \text{Ca} - 85,02 \cdot \text{Cb})/198$

Para a extração e quantificação das antocianinas, os discos foliares congelados e armazenados foram macerados juntamente com 2 ml de solução de ácido clorídrico 0,1% em metanol e posteriormente centrifugado a 13400g a 4°C. A absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 528 nm (AMERICAN HERBAL PHARMACOPOEIA, 2012).

Quantificação de açúcares solúveis e amido

Para a quantificação de açúcares solúveis e amido, 10 mg do pó obtido de cada uma das amostras coletadas foram submetidos à extração com 1,5 mL de etanol 80% (v:v) durante 20 minutos a 80 °C. A extração foi repetida 4 vezes para cada amostra até que os açúcares não fossem mais detectados. Os sobrenadantes obtidos a partir das extrações foram reunidos e armazenados. O precipitado foi colocado em estufa 60°C até completa evaporação do etanol (aproximadamente 2 horas) e armazenado em temperatura ambiente para posterior análise de amido. O volume total da extração etanólica foi evaporado em Speedvac (Savant-SC250EXP) e posteriormente ressuspensionado em 1 mL de água ultrapurificada. O material foi centrifugado e colocado em vials para quantificação dos açúcares (glicose, frutose e sacarose) por Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Performance (HPAEC) com detecção por pulso amperométrico (PAD) (Dionex – DX500) utilizando uma corrida isocrática com 50% NaOH por 27 minutos em coluna Carbopac PA1.

Para a quantificação de amido seguiu-se o protocolo de Amaral *et al.* (2007). O precipitado proveniente da extração etanólica foi hidrolisado com α -amilase (120 U mL⁻¹ em tampão fosfato de sódio 10mM pH 6,8) e amiloglucosidase (30 U mL⁻¹ tampão acetato de sódio 100mM pH 4,5). A glicose liberada foi quantificada utilizando-se o kit enzimático GOD-POD (Glicose PAP Liquiform 1) (Labtest) a 30 °C por 15 min. Após a incubação, o teor de glicose foi determinado em espectrofotômetro acoplado a leitor de ELISA em comprimento de onda de 492 nm. Para a confecção da curva padrão foi utilizada solução de glicose (SIGMA), nas concentrações de 0; 1, 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg/mL .

Extração e análise do xiloglucano

Para a extração dos polissacarídeos, 100 mg de pó seco e moído de cotilédones provenientes das coletas, foram extraídos com 30 mL de água destilada a 80° C por 8h. Em seguida, o material foi filtrado em nylon tipo pele de ovo e o sobrenadante resultante foi submetido à centrifugação (5000 g, 30 min, 5 °C), seguido de precipitação com 3 volumes de etanol e mantido por 15h a 5 °C. O precipitado resultante foi então centrifugado (5000 g, 30 min, 5 °C), ressuspendido em água destilada, liofilizado e posteriormente pesado. O conteúdo de xiloglucano foi calculado em relação à massa seca dos cotilédones.

Perfil de monossacarídeos

A análise da composição dos monossacarídeos presentes no xiloglucano foi realizada com alíquotas de 1 mg do material anteriormente extraído, as quais foram submetidas à hidrólise com 1ml de ácido trifluoracético (TFA) 2N em ampolas seladas por 1 h a 100 °C em digestor seco. Após evaporação do TFA, as amostras foram dissolvidas em água deionizada do tipo milli-Q, filtradas em filtros Millipore (mesh 20 µm) e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta performance (HPAEC) com detecção por pulso amperométrico (PAD) (Dionex – DX500) utilizando uma corrida isocrática com 75% NaOH por 22 minutos em coluna Carbowpac SA10.

Obtenção dos oligossacarídeos

Alíquotas de 0,5 mg do polissacarídeo obtido com a extração aquosa foram submetidas à hidrólise com celulase (0,5 U mL⁻¹ tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0) de *Trichoderma longibatraqueum* (Megazyme Co) por 24h a 30 °C em banho-maria e a reação foi parada por desnaturação da enzima com fervura por cinco minutos (de Souza et al., 2012). Em seguida, as amostras foram filtradas em filtros Millipore (mesh 20 µm) para posterior análise dos oligossacarídeos em HPAEC/PAD (sistema DIONEX ICS-3000) com coluna Carbowpac PA-100 utilizando NaOH 88mM e acetato de sódio 200mM como eluente (0,9 mL.min⁻¹) por 45 minutos. Os picos gerados foram identificados através de comparação com padrão de

oligossacarídeos produzidos pela mesma metodologia a partir de sementes de *Hymenaea courbaril*, caracterizados e disponíveis em publicações como em Tiné e col., 2003.

Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz em analisador por tempo de voo (MALDI-TOF)

As amostras provenientes da hidrólise com celulase foram ressuspensas em 50 ml de água deionizada e misturadas com uma matriz de ácido 2,5-di-hidroxibenzóico, 20 mg/mL em 30% de acetonitrila, contendo TFA (ácido trifluoroacético) a 0,1% (v / v) na proporção de 1:1. Uma alíquota de 0,5 mL da mistura foi aplicada em um pequeno ponto da placa de Maldi-Tof (Anchorchip) com 400 mm/384 pontos (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e posterior aceleração antes da análise num espectrômetro de massa (Bruker Autoflex Maldi-Tof) em modo refletor positivo (ar seco e voltagem de 19 kV, 130 ns de atraso), com uma gama de massas entre 700-3500 m/z. A calibração externa foi realizada com um peptídeo Bruker padrão de calibração II (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os espectros dos fragmentos de íons precursores selecionados foram adquiridos pela fragmentação por Post-Source-Decay, sem gás de colisão na célula de reação.

Análises citoquímicas

As amostras de cotilédones obtidas foram fixadas em paraformaldeído-glutaraldeído. O material fixado foi desidratado em série etanólica crescente (35% (v/v), 50% (v/v), 70% (v/v), 95% (v/v), 100%) por 30 minutos em cada, com exceção do álcool 100% que se deve repetir duas vezes. Posteriormente os materiais fixados foram infiltrados em resina LR White (Ted Pella, Inc).

Após a polimerização foram feitas secções finas em ultramicrotomo (Leica EM UC6). Os cortes obtidos foram colocados em lâminas histológicas e submetidos às seguintes colorações citoquímicas: Azul de Toluidina (AT) 0,025% pH 4,0 como corante metacromático para detectar radical aniônico (VIDAL, 1977); Xylidine Ponceau (XP) 0,1% pH 2,5 para detectar radical catiônico total (VIDAL, 1970); Teste com Lugol, para detecção de amido e xiloglucano. Após estes procedimentos, as lâminas foram montadas em Entellan e cobertas com lamínula para a observação em fotomicroscópio OLYMPUS modelo BX51.

Análise de dados

Os dados obtidos referentes aos estágios de germinação foram submetidos ao teste de normalidade de Anderson-Darling ($p < 0,05$) e homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett e Levene ($p < 0,05$), devido à ausência de normalidade e homogeneidade de variância, os dados então foram submetidos à análise não paramétrica, utilizando o teste de Kruskal-Wallis e comparação múltipla pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Aspectos da germinação e estabelecimento de plântulas de *Macrolobium acaciifolium*

Macrolobium acaciifolium apresenta fruto do tipo legume, indeiscente, elíptico, elíptico-obovado, raramente oblongo, achatado, glabro com tricomas marginais simples e possui uma série de tecidos contendo ar em seu pericarpo e apenas uma semente em seu interior (uniseminado). As sementes por sua vez, são recalcitrantes, pois possuem elevado teor de água (52%), são relativamente grandes (1,38 g), eurispérmicas, exalbuminosas, bitegmentadas e monocrômicas e possuem forma oval ou orbicular com cotilédones crassos ou armazenadores (MAIA & PAROLIN, 2005; CABRAL DOS ANJOS *et al.*, 2010).

O processo germinativo inicia-se com a embebição, em seguida, forma-se na região de protrusão da radícula, uma pequena protuberância que emerge 4 dias após o início do processo de embebição da (DAE). A emissão da parte aérea ocorre aos 10 DAE, na região imediatamente vizinha ao ponto de emissão da radícula (Figura 8A, B, C).

As plântulas desta espécie são consideradas do tipo morfofuncional fanerohipógeo-armazenadora (PHR) e possuem eófilos compostos, parimpinados e com pinas sésseis bipinadas e possuem estípula na base do pulvino. A nervação dos folíolos é inconspícua. O epicótilo reto, cilíndrico, arroxeadado e posteriormente verde claro e levemente marrom na região próxima a inserção dos cotilédones. Ao longo do epicótilo se observam gemas laterais. A raiz é axial ou pivotante com numerosas ramificações laterais de cor marrom escuro (Figura 8D,E,F) (MAIA & PAROLIN, 2005).

Figura 8. Características morfológicas da semente e plântula de *Macrolobium acaciifolium* (Leguminosae): A) Semente quiescente; B) semente após 6 dias de embebição (DAE), com protrusão da radícula; C) semente após 14 DAE, com emergência do epicótilo e surgimento dos catáfilos; D) Desenvolvimento da raiz principal e epicótilo, 20 DAE; E) Alongamento da raiz principal e emergência e desenvolvimento dos eófilos, 32 DAE; F) Plântula aos 56 DAE. Legenda: eo - eófilos, rp - raiz primária, hp - hipocótilo, ca - catáfilo, ep - epicótilo.

Crescimento e alocação de biomassa

A alocação de biomassa seca dos diferentes órgãos de *Macrolobium acaciifolium* evidenciou oscilações ao longo do experimento (0-56 DAE). No período de 0 a 6 dias após a embebição (DAE), a massa de matéria seca dos cotilédones aumenta em 21,1%. A massa do cotilédone passa, então, por um período de pouca alteração (6 aos 14 DAE), apresentando uma redução expressiva da massa dos cotilédones somente a partir dos 18 DAE. Ao final do experimento (56 DAE), a massa de matéria seca dos cotilédones (0,42g) corresponde a 30,5% da massa de matéria seca da semente quiescente (Figura 9D).

Com relação à massa de matéria seca de raiz, caule e folha observa-se um incremento de massa significativo ($p < 0,0001$) ao longo do experimento, com a massa seca inicial de raiz, caule e folha aumentando de 0 g (0%) (0 DAE) para 40,6%; 59,4% e 28,6% aos 56 (DAE), para raiz, caule e folha respectivamente (Figura 9A, B, C).

Figura 9. Biomassa seca (g) dos diferentes órgãos (cotilédone, raiz, caule e folha) das plantas de *Macrolobium acaciifolium* cultivadas ao longo de 56 dias. Pontos representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média (n=5).

O número de folhas não diferiu significativamente ($p=0,07$) entre as coletas realizadas (Figura 10C). No entanto, as medidas de altura e área foliar apresentaram diferenças significativas. Em relação à medida de altura foi observado um aumento de 0,86% dos 26 aos 56 DAE, com um pico aos 50 DAE correspondente a 51,9 cm (Figura 10A). A área foliar também apresentou aumento de 18,5% dos 26 aos 56 DAE, atingindo aos 50 DAE mais do que 30 cm² (Figura 10B).

Figura 10. Altura, área foliar e número de folhas das plantas de *Macrolobium acaciifolium* (26-56 DAE). Pontos representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média ($n=5$).

Figura 11. Frações dos diferentes órgãos (cotilédone, raiz, caule e folha) (g.g⁻¹) das plantas de *Macrolobium acaciifolium* ao longo de 56 dias de experimento. Pontos representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média (n=5).

As frações dos diferentes órgãos das plantas de *M. acaciifolium* evidenciam a distribuição dos recursos entre cotilédone, raiz, caule e folha ao longo do experimento. Portanto, é possível observar que ocorre uma diminuição significativa na massa dos cotilédones e um consequente ganho também significativo de massa na fração raiz, caule e folha (Figura 11). A diminuição da fração de massa dos cotilédones é proporcional aos aumentos dos demais órgãos, denotando o fato de que há transferência de massa dos cotilédones para o desenvolvimento destes. Além disto, foi possível verificar que há uma ordem de investimento inicial da plântula, sendo primeiramente em biomassa para raízes (0-10 DAE), em seguida para caule (14 DAE) e posteriormente para folhas (20 DAE). O caule foi o principal dreno de recursos até o fim do experimento (maior fração que folha até o final) com um ganho médio de 0,3 g.g⁻¹ (Figura 11B). As raízes atingiram 0,25 g.g⁻¹ em média no período e as folhas chegaram a 0,2 g.g⁻¹. Como a perda de massa dos cotilédones foi em

média de $0,75 \text{ g.g}^{-1}$, ficou claro que toda a massa cotiledonar perdida foi transferida para os órgãos em crescimento, com relativamente pouca perda por respiração (Figura 11D).

Trocas gasosas

A assimilação de CO_2 (A) aumentou significativamente ($p=0,0019$) no primeiro grupo de folhas (1°EF) atingindo valor máximo aos 44 DAE com $5,32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ocorrendo um padrão semelhante no segundo grupo de folhas (2°EF) (Figura 12A).

A condutância estomática (g_s) também apresentou aumento significativo ($p=0,0211$) no primeiro grupo de folhas (1°EF) atingindo valor máximo aos 44 DAE com $0,08 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não sendo observadas diferenças para o 2°EF (Figura 12B).

Figura 12. Assimilação de CO_2 (A) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e condutância estomática (g_s) (B) ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) da primeira folha totalmente expandida de plantas de *Macrolobium acaciifolium* dos 26 aos 56 DAE. Pontos representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média ($n=5$).

Clorofilas a e b, carotenóides e antocianinas

Figura 13. Teores de clorofila a (A), clorofila b (B), clorofila a+b (C), carotenoides totais (D) e antocianinas (E) (todos expressos em mg.g^{-1} MF) da primeira folha totalmente expandida das plantas de *Macrolobium acaciifolium* dos 26 aos 56 DAE. Pontos representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média ($n=5$).

Os níveis de clorofila a, b e a+b seguiram padrões semelhantes em todas as coletas, com um aumento de 41% do teor destes pigmentos dos 26 aos 38 DAE e uma estabilização aos 44 DAE para o primeiro grupos de folhas (1°EF), já para o segundo grupo de folhas (2°EF), os teores de clorofilas a, b e a+b aumentaram 22,1, 27 e 23,22%, respectivamente, os níveis destes pigmentos dos 50 até os 56 DAE (Figura 13A, B, C).

Quanto ao teor de carotenóides observou-se um aumento de 37,5% até os 38 DAE e posteriormente uma estabilização aos 44 DAE no 1ºEF, enquanto que no 2ºEF este pigmento aumentou somente 8,97% entre os 50 e 56 DAE (Figura 13D).

Com relação, ao teor de antocianinas este não apresentou diferenças significativas entre as coletas ($p=0,4681$) (Figura 13E).

Em resumo, o sistema fotossintético do primeiro grupo de folhas de *M. acaciifolium* se estabelece após a plântula completar a transferência de massa entre cotilédones e os órgãos em desenvolvimento. Estas plantas, portanto parecem apresentar um investimento de reservas direcionado à produção de raízes e caule inicialmente, com as folhas sendo os últimos órgãos a se desenvolver.

Açúcares solúveis

Figura 14. Teores de frutose (A), glucose (B) e sacarose (C) (mg.g massa seca⁻¹) dos cotilédones de *Macrolobium acaciifolium* ao longo de 56 dias de experimento. Barras representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média (n=5).

Nos cotilédones, os teores de frutose e glicose variaram temporalmente de forma similar. As concentrações de ambos os açúcares aumentaram a partir dos 20 DAE e

diminuíram aos 44 DAE. A glicose dos cotilédones apresentou teor máximo aos 32 DAE com $8,1 \text{ mg.g}^{-1}$ e mínimo aos 56 DAE com $0,19 \text{ mg.g}^{-1}$, já a frutose atingiu sua concentração máxima aos 26 DAE com $10,47 \text{ mg.g}^{-1}$ e mínima aos 2 DAE com $0,018 \text{ mg.g}^{-1}$ (Figura 14A, B).

A sacarose nos cotilédones apresentou uma diminuição significativa ($p=0,0001$) ao longo do experimento com um teor máximo aos 2 DAE de $22,5 \text{ mg.g}^{-1}$ e mínimo aos 56 DAE com $0,09 \text{ mg.g}^{-1}$ (Figura 14C).

Figura 15. Teores de frutose (A), glicose (B) e sacarose (C) ($\text{mg.g massa seca}^{-1}$) das folhas de *Macrolobium acaciifolium* dos 26 aos 56 DAE. Barras representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média ($n=5$).

Nas folhas, teor de frutose sofreu uma redução significativa ($p=0,0006$) com um teor máximo aos 32 DAE de $2,9 \text{ mg.g}^{-1}$ e mínimo aos 50 DAE com $0,67 \text{ mg.g}^{-1}$. Com relação à concentração de glicose, esta apresentou uma diminuição significativa ($p=0,0293$) e teve teor máximo aos 32 DAE com $1,5 \text{ mg.g}^{-1}$ e mínimo aos 50 DAE com $0,81 \text{ mg.g}^{-1}$ (Figura 15A, B).

A sacarose nas folhas não apresentou diferenças significativas ($p=0,5188$), com um teor máximo aos 50 DAE de $6,5 \text{ mg.g}^{-1}$ e mínimo aos 32 DAE com $4,4 \text{ mg.g}^{-1}$ (Figura 15C).

Análises citoquímicas

Através das análises citoquímicas foi observada a localização dos constituintes nas células cotiledonares. A coloração com azul de toluidina, um corante que mostra compostos ácidos como as pectinas (Figura 16A, B e C) evidenciou a ausência de camada mecânica evidente no tegumento, presença de pectinas nas paredes celulares e lamela média, mas não revelou a presença de material aniônico no citoplasma das células cotiledonares. A coloração com XP (Figura 16D, E e F) não revelou a presença de corpos protéicos no citoplasma das células dos cotilédones de *M. acaciifolium*.

Figura 16. Cortes transversais em sementes de *Macrolobium acaciifolium* corados com: A) AT a pH 4,0, tecido de reserva cotiledonar e tegumento (0 DAE); B, C) AT a pH 4,0, tecido de reserva cotiledonar aos 32 e 50 DAE; D, E, F) XP a pH 2,5, para detectar a presença de corpos protéicos no citoplasma das células cotiledonares. Legenda: tg - tegumento; ct - cotilédones; fc - fenda cotiledonar.

Figura 17. Cortes transversais em sementes de *Macrobium acaciifolium* submetidos à coloração com Lugol: A) Tecido de reserva cotiledonar e tegumento (0 DAE); B, C) Tecido de reserva cotiledonar aos 2 DAE e início da mobilização do amido aos 10 DAE; D) Término da mobilização do amido e início da de xiloglucano aos 20 DAE; E) Presença de xiloglucano apenas nas junções triangulares aos 32 DAE; F) Tecido de reserva cotiledonar totalmente consumido aos 50 DAE; G, H, I) Coexistência de amido e xiloglucano e sua mobilização aos 2, 32 e 50 DAE. Legenda: tg - tegumento; ct - cotilédones; xg - xiloglucano; am - amido.

A coloração com lugol evidenciou a presença de amiloplastos no citoplasma ao mesmo tempo em que há xiloglucano na parede das células cotiledonares. Entre zero e 2 DAE, observou-se um aumento de xiloglucano na parede celular. Aos 10 DAE teve início a degradação do amido que continuou até os 20 DAE. O xiloglucano começou a ser degradado aos 20 DAE e sua mobilização procedeu até 50 DAE. Porém, o xiloglucano não foi completamente degradado e a partir dos 32 DAE este polissacarídeo de reserva só pode ser visualizado nas regiões de junções triangulares das células cotiledonares até o desaparecimento da reserva aos 50 DAE (Figura 17).

Amido e xiloglucano

O teor de amido na folha apresentou aumento significativo ($p=0.0026$) desde o início da mensuração do mesmo aos 26 até os 56 DAE, com teor mínimo de $7,1 \text{ mg.g}^{-1}$ aos 26 DAE e máximo de $43,5 \text{ mg.g}^{-1}$ aos 50 DAE (Figura 18).

Figura 18. Teor de amido ($\text{mg.g massa seca}^{-1}$) das folhas de *Macrolobium acaciifolium* dos 26 aos 56 DAE. Barras representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média ($n=5$).

Figura 19. Teores de amido e xiloglucano ($\text{mg.g massa seca}^{-1}$) de cotilédones de *Macrolobium acaciifolium* ao longo de 56 dias de experimento. Barras representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média ($n=5$).

As sementes quiescentes apresentaram teores de amido e xiloglucano de $214,1$ e 90 mg.g^{-1} . Após a germinação, houve uma queda no teor de amido e aumento correspondente em xiloglucano da ordem de 75 e 50 mg.g^{-1} respectivamente. A partir deste ponto, os cotilédones passaram a ter teores equivalentes, cerca de 150 mg.g^{-1} , de ambos os polissacarídeos de reserva. Estas observações sugerem que logo no início da germinação, as sementes de *M.*

acaciifolium utilizam o amido para sintetizar xiloglucano. A diferença equivalente a 25 mg.g^{-1} entre a queda do amido e aumento de xiloglucano pode estar relacionada com a demanda respiratória durante a germinação (Figura 19).

O teor de amido foi estável até 14 DAE, quando houve rápida mobilização até 20 DAE, com queda equivalente de cerca de 110 mg.g^{-1} (90%) (Figura 19). Esta queda foi equivalente ao ganho em massa pelas raízes no mesmo período (Figuras 9 e 11C).

A mobilização do xiloglucano começou somente após a completa degradação do amido, iniciando aos 20 DAE e terminando em cerca de 40 DAE. A massa mobilizada foi da mesma ordem do amido, ou seja, cerca de 110 mg.g^{-1} e também coincide de forma geral com os aumentos observados nas massas de caule e folhas (Figura 9 e 11A,B).

Após o início da degradação do xiloglucano, o cotilédone voltou a sintetizar uma pequena quantidade de amido que também foi degradada entre 26 e 38 dias (Figura 19).

Composição e metabolismo do xiloglucano durante a mobilização de reservas de *M. acaciifolium*

Figura 20. Teor de monossacarídeos solúveis (mg.g massa seca⁻¹) dos cotilédones de *Macrolobium acaciifolium* ao longo de 56 dias de experimento. Barras representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média (n=5). Legenda: A - Arabinose, B - Galactose, C - Fucose, D - Glucose, E - Xilose, F - Manose.

Com o objetivo de compreender em maior detalhe o processo de degradação do xiloglucano de reserva das sementes de *M. acaciifolium* foram investigados: 1) os teores de monossacarídeos solúveis nos cotilédones ao longo de 56 dias; 2) a composição do

xiloglucano em monossacarídeos e 3) as variações na estrutura fina do xiloglucano no mesmo período utilizando HPAEC e espectrometria de massas Maldi-TOF.

Os monossacarídeos solúveis presentes nos cotilédones de *M. acaciifolium* são majoritariamente glucose, xilose, arabinose e galactose e em menor quantidade fucose, manose e ramnose.

Os teores de arabinose e galactose até os 14 DAE não foram separados devido a problemas durante as leituras. Por este motivo, os dados para estes dois monossacarídeos até 14 dias tiveram que ser excluídos da análise. A partir de 14 dias, a arabinose diminuiu gradativamente até os 56 DAE, quando atingiu menor nível (6,3 mg.g⁻¹). Já a galactose, aumentou significativamente até os 32 DAE (0,58 mg.g⁻¹) e em seguida diminuiu até os 56 DAE (0,022 mg.g⁻¹) (Figura 20A, B e C).

Os teores de glucose e xilose seguem um padrão similar variação, com uma diminuição significativa do 0 (5,3 e 1,3 mg.g⁻¹) até os 10 DAE (1,1 e 0,47 mg.g⁻¹), em seguida, ocorre elevação até os 38 DAE (4,9 e 4,6 mg.g⁻¹) e novamente diminui até 56 DAE (0,33 e 0,47 mg.g⁻¹) (Figura 20E, F).

O teor de fucose aumenta significativamente até os 32 DAE (0,82 mg.g⁻¹) e em seguida diminui até os 56 DAE (0,42 mg.g⁻¹).

Já a manose aumenta até os 20 DAE (0,31 mg.g⁻¹), estabiliza-se até 38 DAE e em seguida diminui até os 56 DAE (0,085 mg.g⁻¹) (Figura 20H).

Figura 21. Proporção relativa de monossacarídeos obtidos após hidrólise ácida do xiloglucano de reserva de *Macrobium acaciifolium* ao longo de 56 dias de experimento. Barras representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média (n=5). Legenda: A - Arabinose, B - Galactose, C - Fucose, D - Glucose, E - Xilose, F - Rhamnose, G - Mannose.

Os monossacarídeos provenientes da hidrólise dos polissacarídeos solúveis em água quente de reserva de *M. acaciifolium* são majoritariamente glucose, xilose, arabinose e galactose e em menor quantidade fucose, manose e ramnose.

Os teores de arabinose aumentam do 0 (1,94%) aos 38 DAE (24,17%), e em seguida sofrem uma diminuição até os 56 DAE (12,64%). Já a galactose, aumenta significativamente até os 38 DAE (25,27%), e em seguida diminui até os 56 DAE (19,64%) (Figura 21A, C).

O teor de glucose apresenta uma diminuição inicial de 54,63% (0 DAE) para 27,53% (38 DAE), e em seguida ocorre elevação do mesmo para 46,88% (56 DAE) (Figura 21D).

Quanto à xilose, ocorre aumento da concentração da mesma de 22,03% (0 DAE) para 38,31% (20 DAE), e em seguida ocorre redução para 17,19% aos 56 DAE (Figura 21E).

Os teores de ramnose, manose e fucose apresentam elevação ao longo do experimento com nível máximo aos 50 DAE (0,8680, 0,4380 e 1,004%, respectivamente) (Figura 21B, F e G). Estes dados sugerem que após a retirada do xiloglucano, as paredes celulares restantes após o processo sejam compostas principalmente por arabinanos, mananos e que ainda sobre xiloglucanos, mas que estes sejam do tipo fucosilado.

Perfil de oligossacarídeos do xiloglucano

Figura 22. Perfil dos oligossacarídeos de xiloglucano ao longo dos 56 dias de experimento produzidos após digestão enzimática com celulase.

Espectrometria de massas - Maldi-Tof

Figura 23. Espectrometria de massas do tipo Maldi-Tof de oligossacarídeos de xiloglucano de reserva de *M. acaciifolium* e *Hymenaea courbaril* obtidos por digestão enzimática com celulase.

A análise por HPEAC/PAD e espectrometria de massas por ionização (ESI-MS) evidenciou o padrão de oligossacarídeos do xiloglucano de reserva de *M. acaciifolium* obtidos por meio de digestão enzimática com celulase e comparados com o padrão de oligossacarídeos do xiloglucano de *Hymenaea courbaril*. Foram observados os oligossacarídeos típicos de xiloglucanos de reserva, como XXXG, XLXG, XXLG e LLLG. Foi observada também a presença de combinações destes que aparecem nos cromatogramas como um pico único (Figura 22).

A espectrometria de massas por ionização dessa mistura de oligossacarídeos produziu fragmentos de m/z 792 (XXG), 954 (XLG), 1085 (XXXG), 1247 (XLXG ou XXLG) e 1409 (LLLG) (Figura 23), confirmando as observações feitas por HPAEC/PAD.

Aos 14 DAE, é possível observar um aumento do fragmento de LLLG (1409) em relação ao de XLXG ou XXLG (1247). Aos 32 e 38 DAE surgem fragmentos do grupo das maltodextrinas e diminuição dos oligossacarídeos, respectivamente (Figura 22 e 23), indicando o acúmulo transitório de amido durante a mobilização do xiloglucano.

DISCUSSÃO

Compostos de reserva em sementes de *Macrolobium acaciifolium*

Através das técnicas citoquímicas utilizadas neste trabalho foi possível verificar a existência e distribuição das reservas nos cotilédones de *M. acaciifolium*. Foi comprovada a ocorrência de amiloplastos, oligossacarídeos da serie rafinósica (rafinose e estaquiose) e de xiloglucano (Figura 17). Diferentemente das sementes de outras espécies de Leguminosae, não foi observada, através da coloração com azul de toluidina, a presença de uma camada mecânica evidente no tegumento desta semente. Este caráter ocorre frequentemente em famílias avançadas, cujos frutos são indeiscentes (BELTRATI, 1995; APPEZZATO-DA-GLÓRIA & CARMELLO-GUERREIRO, 2003) (Figura 16A).

A coloração com xylidine ponceau não detectou a existência de corpos protéicos no citoplasma das células cotiledonares (Figura 16D, E e F). Quanto ao teor de material lipídico, não foi possível realizar a análise do mesmo, devido ao processamento para obtenção dos blocos em resina. No entanto, este último em estudo de Da Silva e col. (2003) é de 1, 9% nas sementes de *M. acaciifolium*.

Em tecidos de reserva contendo xiloglucano de cotilédones de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.), tem sido verificado que amido transitório pode ser formado ao longo do processo de mobilização (TINÉ *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2004). Estes últimos autores demonstraram inclusive que a síntese de amido é prontamente ativada no caso de uma inibição do crescimento da parte aérea. O surgimento de amido transitório também foi observado em sementes de espécies que acumulam galactomanano no endosperma (REID, 1971; MC'CLEARY, 1983; BUCKERIDGE & DIETRICH, 1996, SANTOS *et al.*, 2004).

Mobilização de amido e xiloglucano e metabolismo de carboidratos

A análise das reservas totais contidas na semente demonstra que os carboidratos (açúcares solúveis, amido e PRPC) constituem o principal material de reserva acumulado, para a espécie investigada neste estudo. Pesquisas com espécies tropicais têm revelado uma elevada diversidade estrutural, metabólica e funcional dos carboidratos, indicando uma grande

variedade de estratégias adaptativas de plantas aos seus respectivos ambientes (FERREIRA *et al.*, 2009; BUCKERIDGE *et al.*, 2010; SORIANO *et al.*, 2011).

Nos cotilédones, que podem ser ontogeneticamente considerados folhas modificadas, os níveis de sacarose apresentaram diminuição no decorrer do experimento (0-56 DAE), enquanto que os níveis de glucose e frutose apresentaram uma tendência inversa. O teor de amido apresentou uma diminuição nos cotilédones, sendo este praticamente exaurido aos 20 DAE (Figura 19). Os dados acima indicam que o amido é degradado em 2 etapas, que compreendem dos 0 aos 4 DAE, sendo este possivelmente convertido em sacarose e utilizado para o término do processo germinativo e em seguida dos 14 aos 20 dias, sendo este utilizado para produção de biomassa de raiz e caule e início da produção das folhas (Figura 9A,B e C).

No estágio em que os eófilos estão se expandido (a partir dos 26 DAE), as reservas fornecem exclusivamente sacarose (frutose e glucose) para o crescimento da plântula, que são provenientes do início da degradação do xiloglucano. Os produtos de degradação do xiloglucano também são utilizados para tornar o sistema fotossintético funcional (38-44 DAE). Da mesma forma que observado por Santos e Buckeridge (2004) para *H. courbaril*, a fotossíntese em *M. acaciifolium* é estabelecida à custa do xiloglucano. No presente trabalho foi observado que os níveis de fotossíntese, condutância e clorofilas atingem taxas máximas aos 44 DAE coincidem com o término da degradação do xiloglucano (Figura 12 e 13).

Biomassa, trocas gasosas e pigmentos fotossintéticos

O padrão de alocação observado para *Macrolobium acaciifolium* evidencia uma mobilização das reservas para promover inicialmente um crescimento de raízes (10 DAE), seguido do caule (14 DAE) e por último o crescimento das folhas (20 DAE). Este padrão foi verificado em relação aos dados de massa seca e frações dos respectivos órgãos (Figura 9 e 10).

A distribuição dos recursos para raiz, caule e folhas ao final do período de estabelecimento das plântulas (56 DAE) foi de 23,7, 34,7 e 16,7%, respectivamente.

Uma distribuição similar dos recursos para raiz, caule e folhas foi observada em plântulas de *Swietenia macrophylla* em que o crescimento da raiz corresponde com 40% do ganho de massa da plântula, o caule com 37% e as folhas com apenas 23%. Isto evidencia que a plântula inicialmente necessita de um considerável ganho de altura, estimulado pela

utilização de reservas acumuladas em suas sementes e posteriormente desenvolvem-se as folhas para o estabelecimento da fotossíntese (GONÇALVES *et al.*, 2012).

A assimilação fotossintética mensurada em plântulas de *M. acaciifolium* teve como valor máximo $5,3 \mu\text{mol m}^{-2}$ aos 44 DAE, sendo este valor similar ao encontrado para outras espécies de planícies inundáveis, como *Nectranda amazonum* ($6,7 \mu\text{mol m}^{-2}$) e *Tabebuia barbata* ($6,3 \mu\text{mol m}^{-2}$) (PAROLIN *et al.*, 2010).

Parolin (2001) observou em estudo comparando a taxa de assimilação fotossintética em diferentes espécies de planícies alagáveis que as plantas em estágios sucessionais iniciais (pioneiras) têm maiores taxas de assimilação fotossintética do que as plantas em estágios sucessionais posteriores (não-pioneiras), como é o caso de *M. acaciifolium*.

As espécies ditas pioneiras apresentaram taxa de assimilação de 15 a $18,4 \mu\text{mol m}^{-2}$, enquanto que as plantas não-pioneiras de $7,6$ a $8,6 \mu\text{mol m}^{-2}$. Essas diferenças devem-se principalmente ao rápido estabelecimento das espécies pioneiras com um eficiente sistema de absorção de nutrientes e altos padrões fotossintéticos a fim de alcançar um rápido crescimento (LARCHER, 1994; PIEDADE, 1994, PAROLIN *et al.*, 2010).

A condutância estomática para o CO_2 (g_s) que indica o grau de abertura dos estômatos teve valor máximo aos 44 DAE de $0,08 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Trata-se de valor similar ao encontrado para as espécies *Nectranda amazonum* ($0,08 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e *Tabebuia barbata* ($0,06 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), ao contrário de *Senna reticulata* que apresenta valor superior ($0,018 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (BUSCHMANN & GRUMBACH, 1985; PAROLIN *et al.*, 2010).

As diferenças na condutância estomática devem-se a mudanças na assimilação de CO_2 e a transpiração. Ao final do período aquático, a condutância estomática eleva-se, devido ao aumento da transpiração (PAROLIN *et al.*, 2010).

O conteúdo de clorofilas é um importante parâmetro para avaliar a condição fisiológica das folhas e da atividade fotossintética (MEDINA & LIETH, 1964).

Os teores de clorofila a e b apresentaram elevação nas duas emissões foliares que foram mensuradas ao longo do experimento, atingindo máximo aos 38 DAE com 3 mg.g^{-1} (Figura 13). Com o alagamento, os teores de clorofila das folhas são menores do que quando o ambiente está seco (PAROLIN, 2010).

Nas folhas de *M. acaciifolium* ocorre aumento dos níveis de clorofila a e b e carotenóides, e em seguida estabilizam-se, pois a folha alcança a fase adulta (38 DAE) (Figura 13). O conteúdo de clorofilas e carotenóides estão relacionados com o crescimento da

folha. Quando estas atingem a fase adulta, ocorre estabilização dos teores desses pigmentos (SESTAK, 1985).

É notável o fato de que as sementes de *M. acaciifolium* não apresentam reserva significativa de nitrogênio (corpos protéicos) em suas sementes, uma vez que a maioria das sementes de Leguminosae estudadas apresenta este tipo de estratégia de armazenamento de N. No caso de *M. acaciifolium* é possível que algum outro tipo de assimilação de N, como absorção de NO₃ ou NH₄ diretamente, comece a funcionar com o investimento das reservas no desenvolvimento inicial das raízes e caule. Com isto as plântulas adquirem estrutura para absorção e condução dos compostos nitrogenados e poderiam combiná-los com as reservas de carbono (xiloglucano) para a construção dos aparatos fotossintéticos foliares.

Adaptações ao alagamento

As características de frutos e sementes são de extrema importância para as estratégias de germinação e estabelecimento de plantas em planícies amazônicas inundáveis. Isto porque estas estruturas estão sujeitas a longos períodos de submersão (> 2 meses por ano) (PAROLIN, 2010).

O fruto de *Macrolobium acaciifolium* é do tipo legume, uniespermado com tecidos que acumulam ar em seu pericarpo e com isso facilitam a flutuação dos frutos desta espécie (Figura 4E). Este atributo morfológico no fruto está relacionado à estratégia de dispersão desta espécie que é hidrocórica (dispersão pela água), trata-se de um mecanismo de dispersão muito comum entre espécies de várzea e igapó (MANNHEIMER *et al.*, 2003; WITTMANN, 2007). Portanto, existe uma forte correlação entre o período de inundação e a dispersão das sementes, e isto está evidenciado na fenologia da frutificação que é um mecanismo sincronizado com o ciclo anual de inundação. A queda dos frutos de muitas espécies de várzea e igapó ocorre durante o período de inundação (KUBITZKI & ZIBURSKI, 1994; PAROLIN *et al.*, 2002; HAUGAASEN & PERES, 2005).

As sementes de *M. acaciifolium* também apresentam atributos que facilitam a sobrevivência da espécie, como o caráter recalcitrante, em que as sementes possuem 52% de água em seu interior. Esta característica está presente em muitas espécies de florestas tropicais, e é responsável por uma germinação considerada rápida, que no caso desta espécie

foi de 4 dias em nossos estudos, valor inferior ao encontrado por Parolin (2003), que foi de 9 dias.

Uma germinação rápida nessa espécie deve-se ao elevado teor de água, que promove a perda de viabilidade se as sementes forem expostas ao ambiente seco, que coincide com a redução das precipitações nas florestas alagáveis da Amazônia (BEWLEY & BLACK, 1994; PAROLIN & WITTMANN, 2010).

Quanto à massa seca da semente quiescente, que neste trabalho foi de 1,38 g, valor aproximado ao encontrado por Parolin (2003) de 1,4g, sendo esta considerada leve. A massa seca está relacionada com o conteúdo de reservas que é mobilizado para produzir plântulas que consigam sobreviver por mais tempo, especialmente em locais onde as condições ambientais não permitem o aproveitamento das reservas nutricionais e hídricas do solo e a realização da fotossíntese (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

A plântula aos 20 DAE possui massa seca de 1,65 g e ainda não está fotossinteticamente ativa, portanto o incremento de 0,27 g em sua massa seca deve-se a mobilização das reservas situadas nos cotilédones das sementes desta espécie.

O acúmulo de reserva nas sementes de plantas situadas em planícies alagáveis também está relacionado com o tipo de germinação apresentado, pois espécies que possuem alto teor de reservas em suas sementes comumente apresentam germinação do tipo hipógea.

M. acaciifolium adota um sistema maturo-eutrófico de mobilização de reservas e possui como principais fontes de reserva amido e xiloglucano que representam 15,28% e 6,38% da massa seca da semente quiescente respectivamente, sendo, portanto as principais reservas das sementes desta espécie.

A presença de ambas as reservas nos cotilédones desta espécie representa uma estratégia de partição única em relação ao que foi observado até o momento. A utilização das mesmas, em que o amido degradado inicialmente subsidia energeticamente parte do processo germinativo, mas ao mesmo tempo a maior parte do amido degradado parece ser utilizada para a síntese de xiloglucano nos cotilédones. O segundo pulso de degradação de amido, coincide com o desenvolvimento da raiz e parte do caule, o que parece estar relacionado com a fixação da plântula jovem e um rápido ganho em altura. A reserva de xiloglucano é mobilizada durante parte do desenvolvimento do caule e o desenvolvimento completo dos eófilos. Isto promove o completo estabelecimento da fotossíntese na plântula antes do período do próximo período de inundação.

O fato de ter sido observado anteriormente que o xiloglucano em sementes de *Tropaeolum majus* (HOTH et al. 1987) e *Hymenaea courbaril* (resultados não publicados do LAFIECO) é acumulado nos cotilédones via acúmulo transitório de amido nas próprias células que irão, posteriormente, depositar o xiloglucano nas paredes celulares, sugere que em *Macrolobium acaciifolium* o desenvolvimento das sementes tenha sido alterado durante a evolução no sentido de que ao serem dispersas, as sementes ainda apresentem características compatíveis com sementes imaturas, ou seja, ainda possuem amido transitório que será transformado em xiloglucano. Além disto, parece claro que uma nova estratégia tenha sido adquirida por esta espécie em que outra parte do amido passou a ser utilizada para garantir o estabelecimento primeiramente da raiz e caule. Só posteriormente o xiloglucano será usado para completar o crescimento da plântula, com a construção dos aparatos fotossintéticos. Esta estratégia contrasta com aquela descrita para a variedade de *Hymenaea courbaril* oriunda da Mata Atlântica em que as plântulas se estabelecem sob o dossel da floresta e necessitam gerar primeiro capacidade fotossintética adequada ao ambiente escuro da floresta (Dos Santos e Buckeridge, 2004). Neste caso, o investimento é primeiramente na parte aérea, gerando primeiro área foliar e fotossíntese, para depois as raízes se desenvolverem às custas de carbono assimilado fotossinteticamente (Dos Santos et al, 2004, Brandão et al, 2009). Neste caso também, há grande acúmulo de corpos protéicos que servem para nutrir a planta com nitrogênio, já que o desenvolvimento das raízes é completado posteriormente. Isto também contrasta com a estratégia de *M. acaciifolium*, que não apresenta reservas de proteínas e possivelmente já tem mecanismos de assimilação de nitrogênio via radicular quando a planta ainda está para completar o desenvolvimento da parte aérea a partir das reservas de xiloglucano.

No caso de *H. courbaril* e de várias outras espécies de Leguminosae, tem sido proposto que os mecanismos fisiológicos e bioquímicos relacionados à mobilização de reservas de parede celular tenham sido o resultado de mecanismos de transferência de funções durante a evolução conforme proposto por Stebbins (1974) (Buckeridge e Reid, 1996, Buckeridge et al., 2000, Buckeridge, 2010).

Os resultados obtidos neste trabalho apontam na direção de que *M. acaciifolium* seja mais um exemplo da ocorrência de tais mecanismos durante a evolução. *M. acaciifolium* apresenta alterações nunca reportadas para sementes que acumulam xiloglucanos de reserva. No caso desta espécie, durante a evolução, o amido teria passado a ser um composto de

reserva para o desenvolvimento das raízes e caule ao invés de funcionar como reserva transitória para a síntese de xiloglucano durante o desenvolvimento da semente, como ocorre em outras espécies cujas sementes são acumuladoras de xiloglucano. Em conjunto, as características do sistema de estabelecimento das plântulas de *M. acaciifolium* provavelmente fazem parte de uma estratégia de adaptação do estabelecimento de plântulas de *M. acaciifolium* aos pulsos de inundação na Amazônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, L. I. V. et al. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, p. 425-431, 2007.

AMERICAN HERBAL PHARMACOPOEIA. Analytical methods and quantitative standards. Disponível em: <http://www.herbal-ahp.org/analytic_guide.htm>. Acesso em: 10 Set. 2012.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2003. 438p.

BATISTA, E. S.; SCHÖNGART, J. Relationship between tree growth of *Maclobium acaciifolium* and climate in central Amazonian floodplain forests. In: INTECOL International Wetlands Conference. Wetlands in a complex world, 9., 2012, Orlando.

BELTRATI, C. M. **Morfologia e anatomia de sementes**. Rio Claro: Departamento de Botânica da UNESP, 1995. 108p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BEWLEY, J. D. et al. Structure and Composition. In: BEWLEY, J. D. et al. (Orgs.). **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. New York: Springer, 2013. p. 1-25.

BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth (Leguminosae-Faboideae). **Plant Science**, v. 117, p. 33-43, 1996.

BUCKERIDGE, M. S.; REID, J. S. G. Major cell wall polysaccharides in legume seeds: structure, catabolism and biological functions. **Ciência & Cultura**, v. 48, p. 153-162, 1996.

BUCKERIDGE, M. S. et al. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes, estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 107-125, 2000a.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 41-156, 2000b.

BUCKERIDGE, M. S. et al. Acúmulo de Reservas. In: FERREIRA, A. G. BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: Do Básico ao Aplicado**, Porto Alegre: ARTMED, 2004a. p. 31-50.

BUCKERIDGE, M. S.; CAVALARI, A. A.; SILVA, G. B. Parede Celular. In: KERBAUY, G. B. (Org.). **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008b. p.165-168.

BUCKERIDGE, M. S. Seed Cell Wall Storage Polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v. 154, p. 1017-1023, 2010.

BUSCHMANN, C.; GRUMBACH, K. **Physiologie der Photosynthese**. Berlin: Springer Verlag, 1985. 245p.

CABRAL-DOS-ANJOS, M. S.; WITTMANN, A. O.; PIEDADE, M. T. F. Germinação de sementes e monitoramento de plantulas de *Macrolobium acaciifolium* e *Tabebuia barbata*, espécies arbóreas de várzea da Amazônia Central em diferentes condições de substrato. In: XIX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA - CNPq/FAPEAM, 19., 2010, Manaus.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

DA SILVA, J. A. M.; PEREIRA-FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. D. Nutritional and energy value from important vegetal species in tambaqui feeding. **Acta Amazonica**, v. 33, p. 687-699, 2003.

FERREIRA, L. V. Effects of the duration of flooding on species richness and floristic composition in three hectares in the Jaú National Park in flood plain forests in central Amazonia. **Biodiversity and Conservation**, v. 6, p. 1353-1363, 1997.

FERREIRA, C. D. S. et al. The role of carbohydrates in seed germination and seedling establishment of *Himatanthus suluuba*, an Amazonian tree with populations adapted to flooded and non-flooded conditions. **Annals of Botany**, v. 104, p. 1111-1119, 2009b.

FRY, S.C. The structure and functions of xyloglucan. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, p. 1-11, 1989.

FURCH, B. Untersuchungen zur Überschwemmungstoleranz von Baumen der Várzea und des Igapó: Blattpigmente. **Biogeographica**, v. 19, p. 77-83, 1984.

CARVALHO, G. J. F. et al. Effect of light environment on growth of young plants of mahogany (*Swietenia macrophylla* King). **Scientia Forestalis**, v. 40, p. 337-344, 2012.

HALMER, P. The mobilization of storage carbohydrates in germinated seeds. **Physiologie Vegetale**, v. 23, p. 107-125, 1985.

HAUGAASEN, T.; PERES, C. A. Tree phenology in adjacent Amazonian flooded and unflooded forests. **Biotropica**, v. 37, p. 620-630, 2005.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 139-168, 1989.

HELLMANN, M. E.; MELLO, J. I. O.; BARBEDO, C. J.; FIGUEIREIDO-RIBEIRO, R. C. L. Variações dos carboidratos de reserva de sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) armazenadas sob diferentes temperaturas. **Hoehnea**, v. 35, p. 255-264, 2008.

HOTH, A.; BLASCHEK, W.; FRANZ, G. Xyloglucan (amyloid) formation in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds. **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 9-12, 1986.

- IRION, G. J.; ADIS, W.; JUNK, W. J.; WUNDERLICH, F. Sedimentological studies of the "Ilha de Marchantaria" in the Solimões/Amazon River near Manaus. **Amazoniana**, v. 8, p. 1-18, 1983.
- JUNK, W. J. Ecology of várzea, floodplain of Amazonian with water rivers. In: SIOLI, H. (Org.). **The Amazon: Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin**. Dordrecht: Dr. Junk Publ, 1984. p. 215-243.
- JUNK, W. J. Flood tolerance and tree distribution in Central Amazonian Floodplains. In: NIELSEN, L. B; NIELSEN, I. C; BASLEV, H. (Orgs.). **Tropical forests: botanical dynamics, speciation and diversity**. London: Academic Press, 1989. P. 47-64.
- JUNK, W. J. Wetlands of tropical South-America. In: WHIGHAM, D; HEJNY, S; DYKYJOVÁ, D. (Orgs.). **Wetlands of the world**. Dordrecht: Kluve, 1993. p. 679-739.
- KLINGE, H.; ADIS, J.; WORBES, M. The vegetation of a seasonal várzea forest in the lower Solimões River, Brazilian Amazonia. **Acta Amazonica**, v. 25, p. 201-220, 1996.
- KREIBICH, H. **N₂ fixation and denitrification in a floodplain forest in Central Amazonia, Brazil**. 2002. 163 f. Ph. D. Thesis, University of Marburg, Marburg, 2002.
- KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. **Physiology of Wood Plants**. San Diego: Academic Press, 1997. 332p.
- KUBITZKI, K.; ZIBURSKI, A. Seed dispersal in flood plain forest of Amazonia. **Biotropica**, v. 26, p. 30-43, 1994.
- LARCHER, W. Photosynthesis as a tool for indicating temperature stress events. In: SCHULZE, E. D; CALDWELL, M. M (Orgs.). **Ecophysiology of photosynthesis. Ecological studies**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p. 261-277.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: COLOWICK, S. P; KAPLAN, N. O. (Orgs.). **Methods in enzymology**. San Diego, Academic Press, 1987. p. 350-382.
- MAIA, L. A.; MAIA, S.; PAROLIN, P. Seedling morphology of non-pioneer trees in Central Amazonian várzea floodplain forests. **Ecotropica**, v. 11, p. 1-8, 2005.
- MALAVASI, M. M. Germinação de sementes. In: PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. (Org.). **Manual de análise de sementes florestais**. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 25-40.
- MANNHEIMER, S.; BEVILACQUA, G.; CARAMASCHI, E. P.; SCARANO, F. R. 2003. Evidence for seed dispersal by the catfish *Auchenipterichthys longimanus* in an Amazonian lake. **Journal of Tropical Ecology**, v. 19, p. 215-218, 2003.
- MAYER, A. C.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. London: Pergamon Press, 1989. 270p.

MC'CLEARY, B. V. Enzymic interaction in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: the role of exo- β -mannanase. **Phytochemistry**, v. 22, p. 649-658, 1983.

MEDINA, E.; LIETH, H. Die Beziehungen zwischen Chlorophyllgehalt, assimilierender Fläche, und Trockensubstanzproduktion in einigen Pflanzen gemeinschaften. **Beitraege zur Biologie der Pflanzen**, v. 40, p. 451-494, 1964.

MOREIRA, F. M. S.; MOREIRA, F. W. Características da germinação de sementes de 64 espécies de leguminosas florestais nativas da Amazônia em condições de viveiro. **Acta Amazonica**, v. 26, p. 3-16, 1996.

NAZÁRIO, P.; FERREIRA, S. A. N.; REBOUÇAS, E. R. Germinação de sementes de *Cynometra bauhiniifolia* Benth (jutairana) em função do dessecamento e da manutenção sob condição úmida. **Acta Amazonica**, v. 38, p. 439-444, 2008.

NG, F. S. P. Tropical trees as living systems. In: TOMLINSON, P. B.; ZIMMERMANN, M. H. (Orgs.). **Strategies of establishment in Malayan forest trees**. Cambridge: Cambridge University Press, 1978. p.129-162.

OLIVEIRA, A. C. **Aspectos da dinâmica populacional de *Salix martiana* Leyb.(Salicaceae), em áreas de várzea da Amazônia Central**. 1998. Masters thesis. INPA/UFAM, Universidade Federal do Amazonas, 1998.

OLIVEIRA-WITTMANN, A.; PIEDADE, M. T. F.; WITTMANN, F.; PAROLIN, P. Germination in four low-várzea tree species of Central Amazonia. **Aquatic Botany**, v. 86, p. 197-203, 2007.

O'NEILL, M. A.; YORK, W. S. The composition and structure of plant primary cell walls. In: ROSE, J. K. C (Org.). **The Plant Cell Wall**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 1-54.

PAROLIN, P. Seed mass in Amazonian floodplain forests with contrasting nutrient supplies. **Journal of Tropical Ecology**, v. 16, p. 417-428, 2000.

PAROLIN, P. Morphological and physiological adjustments to waterlogging and drought in seedlings of Amazonian floodplain trees. **Oecologia**, v. 128, p. 326-335, 2001a.

PAROLIN, P.; ARMBRUESTER, N.; WITTMANN, F.; FERREIRA, F.; PIEDADE, M. T. F.; JUNK, W. J. A review of tree fenology in Central Amazonian floodplains. **Pesquisas Botânica**, v. 52, p. 195-222, 2002.

PAROLIN, P.; FERREIRA, L. V.; JUNK, W. J. Germination characteristics and establishment of trees from Central Amazonian floodplains. **Tropical Eccology**, v. 44, p. 155-167, 2003.

PAROLIN, P.; WITTMANN, F. Struggle in the flood: tree responses to flooding stress in four tropical floodplain systems. **AoB Plants**, p. 1-19, 2010.

PAROLIN, P. Fruit and seed chemistry, biomass and dispersal. In: JUNK, W. J et al. (Orgs.). **Amazonian floodplain forests: ecophysiology, biodiversity and sustainable management**. London: Springer, 2010. p. 243-258.

PAROLIN, P. Gas Exchange and photosynthesis. In: JUNK, W. J et al. (Orgs.). **Amazonian floodplain forests: ecophysiology, biodiversity and sustainable management**. London: Springer, 2010. p. 203-224.

PERNOLLET, J. C.; MOSSÉ, J. Structure and location of legume and cereal seed storage proteins. In: DUSSANT, J; MOSSÉ, J; VAUGHAN, J. (Orgs.). **Seed proteins**. London: Academic Press, 1983.

PIEIDADE, M. T. F. **Ecologia e biologia reprodutiva de *Astrocaryum jauari* Mart. (Palmae), como exemplo de população adaptada às áreas inundáveis do rio Negro (igapós)**. 1985. Dissertação, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, 1985.

PIEIDADE, M. T. F.; LONG, S. P.; JUNK, W. J. Leaf and canopy photosynthetic CO₂ uptake of a stand of *Echinochloa polystachya* on the Central Amazon floodplain. Are the high potential rates associated with the C4 syndrome realized under the near-optimal conditions provided by this exceptional natural habitat? **Oecologia**, v. 97, p. 193-201, 1994.

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 975, p. 384-394, 1989.

POORTER, H.; NAGEL, O. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 27, p. 595-607, 2000.

PRANCE, G. T. Notes on the vegetation of Amazonia. III. Terminology of Amazonian forest types subjected to inundation. **Brittonia**, v. 31, p. 26-38, 1979.

REID, J. S. G. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenum graecum* L. (Legum). **Planta**, v. 100, p. 131-142, 1971.

SANTOS, H. P.; BUCKERIDGE, M. S. The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. **Annals of Botany**, v. 94, p. 819-830, 2004.

SANTOS, H. P.; PURGATO, E.; MERCIER, H.; BUCKERIDGE, M. S. The control of storage xyloglucan mobilization in cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. **Plant Physiology**, v. 135, p. 287-299, 2004.

SASAKI, M. Lipídios, carboidratos e proteínas de sementes de leguminosas do Cerrado. 2008. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em:

<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41132/tde-11062008-231448/>>. Acesso em: 2013-09-23.

SENO, M. S.; GOMES, L.; CORTELAZZO, A. L. Caracterização do material de reserva em feijão-guandu, lab-lab e mucuna. **Bragantia**, v. 55, p. 67-73, 1996.

SESTAK, Z. Chlorophylls and Carotenoids During Leaf Ontogeny. In: SESTAK, Z. (Org.). **Photosynthesis During Leaf Development**. Boston: Dr. W. Junk Publishers, 1985. p.76-106.

SCHÖNGART, J.; PIEDADE, M. T. F.; LUDWIGHAUSEN, S.; HOMA, V.; WORBES, M. Phenology and stem-growth periodicity of tree species in Amazonian floodplain forests. **Journal of Tropical Ecology**, v. 18, p. 581-597, 2002.

SCHÖNGART, J.; PIEDADE, M. T. F.; WITTMANN, J.; JUNK, W. J.; WORBES, M. Wood growth patterns of *Macrolobium acaciifolium* (Benth.) Benth. (Fabaceae) in Amazonian black-water and white-water floodplain forests. **Oecologia**, v. 145, p. 654–661, 2005.

SCHLUTER, U. B. Morphologische, anatomische und physiologische untersuchungen zur überflutungstoleranz zweier charakteristischer baumarten des Weiß und Schwarzwasser überschwemmungswaldes bei Manaus. Ein Beitrag zur Ökosystemanalyse von várzea und igapó Zentralamazoniens. Dissertação, Universität Kiel, 1989.

SIOLI, H. Alguns resultados e problemas da limnologia amazônica. Belém, IPEAN, 1951. p. 3-44.

SOMERVILLE, C. et al. Lipids. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Orgs.). **Biochemistry, molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. P. 458-527.

SORIANO, D.; OROZCO-SEGOVIA, A.; MARQUEZ-GUZMAN, J.; KITAJIMA, K.; GAMBOA-DEBUEN, A.; HUANTE, P. Seed reserve composition in nineteen tree species of a tropical deciduous forest in Mexico and its relationship to seed germination and seedling growth. **Annals of Botany**, v. 107, p. 939-951, 2011.

STEBBINS, G. L. Seeds, seedlings and the origin of angiosperms. In: BECK, C. B. (Org.). **Origin and evolution of angiosperm**. New York: Columbia University Press, 1974. p. 300-311.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TINÉ, M. A. S.; CORTELAZZO, A. L.; BUCKERIDGE, M. S. Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae Caesalpinoideae). **Plant Science**, v. 154, p. 117-126, 2000.

TINÉ, M. A. S.; LIMA, D. U.; BUCKERIDGE, M. S. Galactose branching modulates the action of cellulase on seed storage xyloglucans. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 135-141, 2003.

- VÁZQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. 1990. Ecological significance of light controlled seed germination in two contrasting tropical habitats. **Oecologia**, v. 83, p. 171-175, 1990.
- VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. **Annals of Histochemistry**, v. 15, p. 289-296, 1970.
- VIDAL, B. C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cellular & Molecular Biology**, v. 22, p. 45- 64, 1977.
- WITTMANN, F.; PAROLIN, P. Phenology of six tree species from Central Amazonian várzea. **Ecotropica**, v. 5, 51-57, 1999.
- WITTMANN, F.; ANHUF, D.; JUNK, W. J. Tree species distribution and community structure of Central Amazonian várzea forests by remote sensing techniques. **Journal of Tropical Ecology**, v. 18, p. 805–820, 2002.
- WITTMANN, A. O.; PIEDADE, M. T. F.; PAROLIN, P.; WITTMANN, F. Germination in four low-várzea tree species of Central Amazonia. **Aquatic Botany**, v. 86, p. 197-203, 2007.
- WORBES, M.; KLINGE, H.; REVILLA, J. D.; MARTIUS, C. On the dynamics, floristic subdivision and geographical distribution of várzea forests in Central Amazonia. **Journal of Vegetal Science**, v. 3, p. 553-564, 1992.
- WORBES, M. Rhythmisches Wachstum und anatomisch-morphologische Anpassungen an Lebensstrategien von Bäumen in zentralamazonischen Überschwemmungswäldern. **Mitteilungen der Deutschen Dendrologischen Gesellschaft**, v. 82, p. 155-172, 1996.