

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



PRISCILA AUGUSTA BRÍGITTE

ECOFISIOLOGIA DA GERMINAÇÃO DE *Hedychium coronarium* J.
KÖNIG (ZINGIBERACEAE), SUBMETIDA À HIPOXIA E ANOXIA.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
PRISCILA AUGUSTA BRÍGITTE
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do título de
Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Joly

Campinas
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

B768e

Brigitte, Priscila Augusta
Ecofisiologia da Germinação de *Hedychium coronarium*
J.König (Zingiberaceae), submetida a hipoxia e anoxia /
Priscila Augusta Brigitte. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

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

1. Germinação. 2. Ecofisiologia. 3. Anoxia. 4.
Hipoxia. 5. Reserva de sementes. I. Joly, Carlos
Alfredo, 1955-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

(pbg/ib)

Título em inglês: Germination ecophysiology of *Hedychium coronarium* J. König (Zingiberaceae) under hypoxia and anoxia.

Palavras-chave em inglês: Germination; Ecophysiological; Anoxia; Hypoxia; Seed storage.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Carlos Alfredo Joly, Ivany Ferraz Marques Válio, Marcelo Polo.

Data da defesa: 18/12/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 18 de dezembro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Alfredo Joly
(Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Ivany Ferraz Marques Válio



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Polo



Assinatura

Prof. Dr. Rafael Silva Oliveira

Assinatura

Profa. Dra. Kayna Agostini

Assinatura

*À minha linda avó Clarinha (in
memoriam) que, conversando com as plantas
do jardim, me ensinou desde cedo a amá-las
também...*

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos a todos que participaram de alguma maneira de minha vida no decorrer deste curso. Será difícil citar todos os nomes, por isso mencionarei apenas os que estiveram diretamente envolvidos com o trabalho.

Desde meus amigos da época da graduação, que me auxiliaram nos estudos para o exame de seleção (obrigada pelos cadernos e pela torcida, pessoal!) às funcionárias do CECI, que cuidaram de meu filho desde tão pequeno enquanto eu freqüentava as aulas e atividades do curso, e à equipe da CEMEI Profa. Leonor Motta Zuppi, onde ele esteve matriculado nos últimos tempos. Às minhas amigas também mães, pela amizade tão preciosa que cultivamos entre as famílias ao longo deste período.

Aos meus colegas do departamento de botânica, que tantas vezes me deram suporte para que eu pudesse realizar minhas tarefas. Ao professor Carlos Joly, por ter aceitado o papel de orientador, pelo apoio dado ao trabalho e aprendizado que me proporcionou. À professora Sandra, pelo acompanhamento durante o trabalho que realizei em seu laboratório, referente ao segundo capítulo da presente dissertação, pelo auxílio durante o trabalho prático e comentários valiosos na pré-banca. À professora Eliana pela paciência e dedicação, enquanto estive em seu laboratório realizando contagens cromossômicas. Ao professor Ângelo Cortelazzo, por sua atenção e auxílio com técnicas de coloração e interpretação de resultados obtidos para os testes microquímicos. À Divina Vilhalva, pela ajuda com parte das fotografias e técnicas de coloração. Ao Fabiano “Careca” Scarpa, pela amizade e dicas nas análises de germinação. Ao Leandro Vieira, por não me deixar desistir e por todo o inestimável apoio na época da redação da versão inicial do trabalho. À Daniela Seabra, pelo *abstract* e pela amizade. Ao Tiago Brito, pelos desenhos e pelo socorro em diversos momentos, incluindo as impressões de emergência. Ao professor Ivany, por toda a paciência e ensinamentos, desde a época de iniciação científica até as correções sugeridas para o trabalho na pré-banca. Ao professor Marcos Aidar, pelas sugestões e correções na pré-banca. Aos professores Ivany, Marcelo, Kayna e Rafael, por

terem aceitado o convite para compor a banca examinadora, pela disponibilidade e atenção dedicada.

A todos os meus amigos queridos: os que estiveram sempre por perto, alguns praticamente irmãos, e também os que não vejo há anos, mas que sempre torceram por mim. Aos meus professores e colegas de tatame, que também se tornaram preciosos amigos e tantas vezes me ajudaram a perceber que meus limites estavam além do que eu imaginava.

Aos meus pais, que me deram condições para que eu pudesse chegar até aqui, pois me deram todo o amor, ensinaram o valor da educação, me incentivaram e apoiaram desde sempre. Aos meus irmãos, pelo amor e porque estiveram comigo nos momentos mais importantes. Ao meu amado companheiro, Andrés, pelo suporte, carinho e compreensão e à sua família, por todo o apoio dado. E principalmente ao meu filhinho Pedro, que desde que crescia em minha barriga já ouvia sobre botânica e fisiologia vegetal, que tem sido uma criança paciente e amorosa (o filho perfeito, tal qual pedi a Deus!), e hoje me ajuda até a cuidar do jardim.

E como não podia deixar de ser, agradeço muito a Deus, que me permitiu chegar até aqui, colocando as pessoas certas em meu caminho e obstáculos não superiores aos que eu poderia enfrentar, por tudo.

ÍNDICE

Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Introdução geral.....	13
Objetivo.....	16
Capítulo 1: Ecofisiologia da germinação de <i>Hedychium coronarium</i> J. König (Zingiberaceae), submetida a anoxia e hipoxia	17
Introdução	17
Material e métodos	19
Resultados	25
Discussão	36
Considerações finais	42
Capítulo 2: Desenvolvimento pós-seminal de <i>Hedychium coronarium</i> J. König: as reservas da semente nos estágios iniciais do desenvolvimento sob diferentes condições de oxigenação	50
Introdução	50
Material e métodos	51
Resultados	55
Discussão	58
Considerações finais	64
Ilustrações	67
Discussão geral	65
Referências bibliográficas	73

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Climatograma do município de Ubatuba/SP	26
Figura 2 – Temperaturas médias, mínimas e máximas registradas no município de Ubatuba/SP	27
Figura 3 – Teste de fotoblastismo	28
Figura 4 – Teste de alternância de temperatura	31
Figura 5 – Teste de longevidade	33
Figura 6 – Curvas de germinação sob normoxia	33
Figura 7 – Germinação de sementes de <i>Hedychium coronarium</i> em normoxia, hipoxia e anoxia	35
Tabela 1 – Resultado dos testes aplicados nos tecidos de reserva e envoltório da semente	56
Figura 8 – Desenhos dos estágios de desenvolvimento estudados.....	67
Figura 9 – Desenho da semente sob corte transversal.....	67
Figura 10 – Estrutura da semente durante a germinação	68
Figura 11 – Sementes não embebidas.....	68
Figura 12 – Sementes recém-germinadas sob normoxia.....	69
Figura 13 – Sementes recém-germinadas sob hipoxia.....	70
Figura 14 – Sementes recém-germinadas sob anoxia.....	71
Figura 15 – Estágio mais avançado de desenvolvimento - plântula.....	72

RESUMO

Foram estudados aspectos ecofisiológicos da germinação de *Hedychium coronarium* J. König e suas características quanto à anatomia e à reserva das sementes. O principal foco foi o estudo de seu comportamento sob diferentes condições de oxigenação, sendo estes os tratamentos: normoxia, hipoxia e anoxia.

Trata-se de uma espécie exótica, invasora de ambientes brejosos, nos quais há, periódica e naturalmente, uma restrição na disponibilidade de oxigênio dissolvido no solo em virtude da saturação hídrica que ocorre nestas áreas. Sob tais condições, *Hedychium* apresenta vantagem competitiva e impede a regeneração das plantas nativas. Atualmente presente em praticamente toda a América, é uma espécie originária da Ásia, trazida inicialmente com fins ornamentais, mas hoje é também utilizada como planta medicinal, dentre outras aplicações já dadas à espécie.

As sementes utilizadas foram coletadas no Núcleo Picinguaba, do Parque Estadual da Serra do Mar, Ubatuba-SP. Os testes de germinação compararam suas respostas à luz, à alternância de temperaturas e à disponibilidade de oxigênio e determinaram a longevidade das sementes. Também foi verificada a viabilidade das sementes através do teste com tetrazólio. Em relação ao estudo dos tecidos de reserva, foram feitos cortes anatômicos em sementes submetidas a diferentes condições de oxigenação, com posterior coloração com diferentes substâncias, com diferentes afinidades, para verificar quais as reservas presentes e verificar possível diferença quanto ao consumo das mesmas de acordo com o tratamento recebido pela semente durante o processo de germinação.

Os resultados demonstraram que a espécie germina indiferente à luz, ou seja, é fotoblástica neutra, e tem sua germinação retardada, porém não diminuída, sob temperaturas que simulam as condições de inverno da região de coleta das sementes utilizadas neste estudo. As sementes mostraram boa viabilidade até cerca de um ano após a dispersão, sendo que, após esse período, a taxa de germinação caiu sensivelmente. Embora esta espécie tolere bem condições de

pouca disponibilidade de oxigênio e seja capaz de colonizar ambientes que apresentem esta característica com sucesso, seu melhor desempenho em relação à germinação, ocorre sob condições drenadas e de boa aeração. Os estudos anatômicos indicaram que o processo de germinação foi iniciado sob privação de oxigênio, porém não foi viável pelo período testado (30 dias), pois provocou a morte das sementes.

As sementes apresentam dois tipos de tecidos de reservas, perisperma e endosperma, de acordo com o esperado para a família (Zingiberaceae), porém de ocorrência conhecida apenas para poucos grupos de plantas. A composição dos tecidos indica que sua principal reserva é composta por polissacarídeos, sendo amido o principal, encontrado tanto no perisperma, como no endosperma, e proteínas dispersas no citoplasma das células do endosperma.

Palavras-chave: invasora – germinação – ecofisiologia – fotoblastismo – alternância de temperaturas – longevidade - normoxia - hipoxia – anoxia – reserva de semente.

ABSTRACT

Ecophysiological aspects of *Hedychium coronarium* J. König and its characteristics concerning anatomy and seeds storage were studied aiming to understand its behavior under different oxygenation conditions, with the following treatment: normoxia, hypoxia e anoxia.

This is an exotic species, invasive of water logging environments, where there is, regular and naturally, a restriction on the availability of dissolved oxygen in the soil, because of water saturation in these areas. Under such conditions, the competitive advantage of *Hedychium* prevents the regeneration of native plants. Currently present in almost all of America, it is a species originated in Asia, initially brought with ornamental purposes, but today is also used as a medicinal plant, among other applications already given to the species.

The seeds used were collected in Ubatuba-SP, at “Núcleo Picinguaba”, from PESH. Tests for germination compared their responses to light, the alternation of temperatures and availability of oxygen and determine the seeds' longevity. The viability of seeds was also verified through the test with tetrazolium. Regarding the study of storage tissues, anatomical cuts were made in seeds subjected to different conditions of oxygenation, with subsequent staining with different substances, with different affinities, to check the present storages and check possible difference in regard to their consumption according to the treatment received by the seed during germination.

The results have shown that the species germinates indifferent to light, i.e, it is a neutral photoblastic, and it has its germination delayed, but not decreased, under temperatures that simulate the winter conditions of the region where the seeds used in this study were collected. The seeds resist with good viability until about a year after the dispersion, when the germination rate falls significantly. Although well able to tolerate low availability of oxygen and capable of colonizing environments that successfully present this characteristic, its best performance concerning germination occurs under conditions of good aeration and drained conditions. Anatomical studies indicate that the process of germination was initiated, but not viable for the testing period (30 days), under this condition.

The seeds feature two types of storage tissue, perisperm and endosperm, according to the expected for the family (Zingiberaceae), but occurring for only a few groups of plants. The composition of tissues indicates that its main storage is composed of polysaccharides, being starch the main one, found both in perisperm and endosperm, and protein scattered in the cytoplasm of cells in the endosperm.

Key words: invasive - germination - ecophysiology - photoblastism - alternation of temperatures - longevity - normoxia - hypoxia - anoxia – seed storage.

INTRODUÇÃO GERAL

A palavra *Hedychium* vem do grego e significa “neve doce”. A palavra *coronarium*, do latim “*corona*”, significa “coroa” (Kissmann & Groth 1991) referente às características de sua flor. A espécie é conhecida popularmente por lírio-do-brejo, mariazinha-do-brejo ou gengibre-branco (Kissmann & Groth 1991; Macedo 1997). Pertencente à família Zingiberaceae, é uma macrófita aquática nativa da região do Himalaia, na Ásia tropical (Macedo 1997; Pio Corrêa 1984). Introduzida nas Américas, ocorre desde os Estados Unidos até a Argentina (Kissmann & Groth 1991), invadindo agressivamente baixadas úmidas e pantanosas, margens de lagos, riachos e canais de drenagem, formando densas populações (Lorenzi 1982). No Brasil, a espécie é muito comum em toda a zona litorânea (Kissmann & Groth 1991), ocorrendo nos estados de RS, PR, SC, SP, RJ, MG, BA e MT (Instituto Hórus 2006)

Hedychium coronarium é uma espécie herbácea rizomatosa e perene (Macedo 1997; Pio Corrêa 1984). As plantas podem atingir até 2,0 m de altura, as inflorescências são terminais, com flores brancas, trímeras, zigomorfas e bastante perfumadas. Apresenta ovário ínfero, trilocado. Seus frutos são cápsulas de deiscência septicida, atingindo de 4 a 6 cm de comprimento, alaranjados internamente, expondo essa coloração quando maduros e abertos. Apresenta cerca de 30 sementes por fruto, com placentação do tipo axilar. Cada semente tem cerca de 3 mm de largura por 4 mm de comprimento, sendo recoberta por um arilo vermelho (Kissmann & Groth 1991). Os polinizadores noturnos são as mariposas, em virtude da coloração branca e do aroma atrativo das flores (Endress 1994).

A família Zingiberaceae possui cerca de 50 gêneros, representados por mais de 1000 espécies, distribuídas em regiões tropicais, especialmente S e SE da Ásia. Muitas das espécies desta família são de interesse econômico, como é o caso do *Zingiber officinalis*, popularmente conhecido como gengibre, do qual se utilizam os rizomas, o *Aframomum* sp., cujas sementes são picantes e empregadas na culinária, e *Apinia* sp., que apresenta propriedades medicinais,

assim como o próprio *Hedychium*, cujo extrato dos rizomas vêm sendo estudado por suas propriedades antiinflamatórias. No passado, suas fibras foram utilizadas para produção de papel, porém já não é mais cultivado no Brasil com esta finalidade (Instituto Hórus 2006).

Estudos sobre biologia e ecologia de espécies invasoras estão sendo realizados em regiões de importante diversidade biológica, sobretudo em consequência dos reflexos negativos que estas plantas podem ocasionar sobre a biodiversidade local e regional (Pitelli 1998; Pedralli 2003; Ramsar 1999).

De acordo com a Convenção sobre Diversidade Biológica – CDB, “espécie exótica” é toda espécie que se encontra fora de sua área de distribuição natural. “Espécie exótica invasora”, por sua vez, é definida como sendo aquela que ameaça ecossistemas, habitats ou espécies. A introdução de espécies invasoras é considerada a segunda maior causa de perda de biodiversidade, após as alterações de habitats (Brasil 2006). Estudos envolvendo espécies invasoras são de grande importância para projetos de manejo e conservação de ambientes naturais. Os impactos relacionados ao *Hedychium* são principalmente devido à substituição da vegetação nativa em áreas úmidas e sub-bosques de florestas, além de problemas econômicos provocados por entupimentos de tubulações pelos rizomas e prejuízos em lagos de hidrelétricas. É uma espécie de difícil controle mecânico, devido à reprodução vegetativa da espécie extremamente eficiente: fragmentos de rizomas dão origem a novas plantas facilmente. Em alguns locais, é realizado o controle químico com a utilização de uma combinação de defensivos agrícolas, porém, esta metodologia é problemática devido à grande poluição causada nos cursos de água, às margens dos quais a espécie ocorre.

Introduzida no Brasil como planta ornamental há mais de 400 anos, o *Hedychium* tornou-se uma espécie invasora agressiva de áreas brejosas. Os estudos realizados nos últimos 30 anos mostraram de forma consensual, que as plantas, assim como a maioria de outros organismos, em condições de baixa tensão de oxigênio, como as encontradas em solos alagados ou em plantas em total submersão, substituem a respiração aeróbica pelo metabolismo fermentativo (McManmon & Crawford 1971, Davies 1980, Mocquot *et al.* 1981, Joly & Crawford

1982, 1983, Raymond *et al.* 1985, Joly 1991, 1994a, Crawford 1992, Joly & Brändle 1995, Crawford & Brändle 1996). Okamoto (1998), em um estudo ecofisiológico enfocando o metabolismo respiratório das sementes de quatro espécies de *Inga* postas para germinar em normoxia, hipoxia e anoxia, demonstrou que as respostas observadas estavam diretamente correlacionadas com o ambiente de origem das espécies estudadas. Os resultados obtidos levantaram uma série de questões que poderiam auxiliar na compreensão da estratégia adaptativa desenvolvida para tolerar os períodos de baixa disponibilidade de oxigênio no solo. Portanto, o objetivo deste trabalho é estudar a ecofisiologia da germinação e dos primeiros estágios de desenvolvimento de *Hedychium*, com o intuito de fornecer conhecimento para subsidiar planos de manejo e/ou erradicação da espécie em áreas de conservação, onde, em função de sua agressividade, está impedindo a regeneração da vegetação nativa.

O Núcleo Picinguaba pertence ao Parque Estadual da Serra do Mar (PESM) e está localizado no município de Ubatuba, SP (23°20'S e 44°46'W). Em seus arredores são encontrados praticamente todos os ecossistemas representativos da mata atlântica, desde manguezais e vegetação de planície litorânea com altíssimos índices de biodiversidade, até pequenas ocorrências de campos de altitude nos seus pontos culminantes. É o único trecho do PESM que atinge o nível do mar, protegendo assim os ecossistemas costeiros. Constitui um ponto ambientalmente estratégico por unir o PESM com o Parque Nacional da Serra da Bocaina através de uma sobreposição das duas unidades, integrando ambas a um conjunto formado ainda pela Área de Proteção Ambiental do Cairuçu e Reserva Ecológica da Joatinga, já no município de Paraty/RJ. O clima da região caracteriza-se como tropical chuvoso, com chuvas ao longo de todo o ano. O mês de janeiro é o que apresenta maior pluviosidade e junho, a menor, não existindo déficit hídrico na região (San Martin-Gajardo & Morellato 2003).

Este trabalho será apresentado em dois capítulos. No primeiro capítulo são abordados aspectos relativos às respostas das sementes a diferentes condições ambientais. Foram realizados testes para avaliar condições de luz, temperaturas,

disponibilidade de oxigênio e efeito do tempo de armazenamento para determinação da durabilidade das sementes.

O segundo capítulo estuda a anatomia da semente, a composição de seus tecidos de reserva e testa a hipótese de que a disponibilidade de oxigênio no momento da germinação poderia determinar diferentes padrões de mobilização destas reservas.

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi estudar a germinação e os primeiros estágios de desenvolvimento de *Hedychium* sob diferentes condições de luz, temperaturas e níveis de disponibilidade de oxigênio – normoxia, hipoxia e anoxia, verificando a ocorrência de germinação em anoxia e possíveis diferenças quanto à mobilização das reservas de acordo com a disponibilidade de oxigênio durante a germinação. Também foi avaliada a longevidade das sementes após a dispersão e armazenamento. Foi testada a hipótese de que uma das estratégias envolvidas na capacidade de germinar sob privação de oxigênio estaria relacionada com o tipo de reserva presente em suas sementes e ao seu modo de mobilização nestas condições.

Capítulo 1 - Ecofisiologia da germinação de *Hedychium coronarium* König (Zingiberaceae), submetida à anoxia e hipoxia.

INTRODUÇÃO

Hedychium coronarium é uma macrófita aquática nativa da região do Himalaia, na Ásia tropical (Macedo 1997; Pio Corrêa 1984). Introduzida nas Américas, ocorre desde os Estados Unidos até a Argentina (Kissmann & Groth 1991) invadindo agressivamente baixadas úmidas e pantanosas, margens de lagos, riachos e canais de drenagem, formando densas populações (Lorenzi 1982). No Brasil, a espécie é muito comum em toda a zona litorânea (Kissmann & Groth 1991).

Sabe-se que com o encharcamento do solo há substituição da fase gasosa (ar) do solo pela fase líquida (água). Dentre as conseqüências deste processo está a diminuição da disponibilidade de oxigênio no solo (Rodrigues *et al.* 1993). A capacidade das plantas viverem sob condições de uma deficiência ou ausência temporária de oxigênio é amplamente disseminada na natureza. Assim, o conhecimento das vias de adaptação a essas condições é essencial, uma vez que o encharcamento permanente ou temporário pode ocorrer em muitas regiões. Algumas plantas morrem rapidamente durante o encharcamento enquanto outras são capazes de sobreviver nestas condições (Chirkova 1978).

Alguns estudos avaliam as diferentes estratégias adaptativas de espécies que vivem sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio. Plantas em total ou parcial submersão substituem a respiração aeróbica pelo metabolismo fermentativo (McManmon & Crawford 1971, Davies 1980, Mocquot *et al.* 1981, Joly & Crawford 1982, 1983, Raymond *et al.* 1985, Joly 1991, 1994a, Crawford 1992, Joly & Brändle 1995, Crawford & Brändle 1996). Outros mecanismos são: diminuição da taxa metabólica, remoção dos produtos tóxicos, manutenção da integridade e estabilidade das membranas e mudanças compensatórias no metabolismo. Estas últimas incluem: a síntese de enzimas adaptativas, a

metabolização de produtos provenientes do metabolismo anaeróbico, a oxidação endógena anóxica e a adaptação das vias respiratórias (Rodrigues *et al.* 1993).

Com relação à germinação de sementes sob anoxia e hipoxia, existem poucos estudos. A presença de ar é um requisito básico para a germinação de sementes e estabelecimento de plântulas (Hook 1984). Segundo Rumpho & Kennedy (1981), após a inundação ocorre um período de anoxia no interior da semente, principalmente se for antes da ruptura do envoltório e se o período de submersão for longo, resultando em impermeabilidade temporária e morte da semente. Já segundo Kramer & Kozlowski (1979), a germinação de semente sob água pode ser benéfica ou desastrosa, dependendo da profundidade, duração da inundação, da temperatura da água e principalmente da espécie. Okamoto (1998), em um estudo ecofisiológico enfocando o metabolismo respiratório das sementes de quatro espécies de *Inga* germinando sob normoxia, hipoxia e anoxia, demonstrou que as respostas observadas estavam diretamente correlacionadas com o ambiente de origem das espécies estudadas.

Para Bewley e Black (1994), dependendo da espécie, as sementes podem germinar somente após longas exposições à luz ou apenas com breve exposição no escuro ou com períodos de luz e escuro, sendo muitas sementes indiferentes à luz. A percepção, interpretação e transdução dos sinais luminosos são captados por fotorreceptores, sendo o fitocromo o principal deles (Kendrick & Kronenberg 1994). A resposta das sementes à luz é variável, de acordo com a espécie. Estas podem ser classificadas como sendo fotoblásticas positivas, negativas ou neutras (Mancinelli 1994; Silva *et al.* 1997).

Existem diferenças inerentes entre espécies quanto à longevidade das sementes e, portanto, da velocidade de deterioração das mesmas. (Delouche 1969). O estudo da longevidade da semente é muito importante para espécies agrícolas, como grãos utilizados para fins alimentícios, bem como para espécies florestais utilizadas para fins de regeneração. Para estas, é muito utilizada a aplicação de testes que determinem a viabilidade das sementes que estão sendo comercializadas, como uma maneira de rotular a qualidade das mesmas. No entanto, conhecer aspectos sobre a durabilidade e deterioração das sementes de

espécies invasoras também pode fornecer informações úteis, que auxiliem na tomada de decisão em relação às medidas de controle a serem adotadas.

A interferência da temperatura no processo de germinação também se dá de maneira diferenciada para cada espécie. Além de interferir na velocidade de embebição, a temperatura atua na velocidade de reação e, como resultado, acelera ou não a germinação da semente. Existem espécies que exigem alternância de temperatura durante o processo germinativo, semelhantes às condições naturais (Popinigis, 1977; Carvalho & Nakagawa, 1980). A faixa de temperatura em que normalmente ocorre a germinação oscila entre 15 e 30° C (Carvalho & Nakagawa, 1980).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar as respostas das sementes quando expostas à diferentes condições de luz, temperatura e disponibilidade de oxigênio, além de determinar sua longevidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da espécie

Hedychium coronarium J. König (Zingiberaceae) é uma espécie herbácea rizomatosa e perene. Conforme verificado em campo, as plantas podem atingir cerca de até 2,0 m de altura, as inflorescências são terminais, com flores brancas, trímeras, zigomorfas e bastante perfumadas. Algumas flores foram coletadas e observadas com auxílio de lupa. Desta maneira, foi verificado que apresentam ovário ínfero e trilocado. Foram coletados frutos em vários estágios de desenvolvimento. Aqueles que já se apresentavam maduros, iniciando a abertura para dispersão das sementes, foram medidos e 10 deles tiveram suas sementes contadas.

O *Hedychium*, popularmente conhecido como lírio-do-brejo, ocorre em áreas permanentemente, ou sazonalmente, encharcadas e seus rizomas toleram longos períodos de hipoxia, não resistindo, entretanto, a períodos de anoxia superiores a 15 dias (Joly & Brändle 1995). A espécie apresenta tanto a

reprodução sexuada, por formação de sementes, quanto a assexuada, pela produção de hastes aéreas a partir do rizoma (Tunison 1991; Stone *et al.* 1992). Segundo Tunison (1991), fragmentos dos rizomas podem se dispersar pela água, através das bacias hidrográficas, e apresentar crescimento vegetativo em novas áreas.

Apesar desta propagação vegetativa agressiva e dominante, a espécie também investe com sucesso na reprodução sexuada, florescendo de dezembro a março (embora ao longo de todo o ano forneça flores em menores quantidades, conforme observado em campo) e frutificando de maio a agosto. Seus frutos são cápsulas de deiscência septicida, atingindo de 4 a 6 cm de comprimento, alaranjados internamente, expondo essa coloração quando maduros e abertos. Apresenta cerca de 30 sementes por fruto, com placentação do tipo axial. A dispersão das sementes ocorre no período de menor precipitação (**Figura 1**), onde há maior probabilidade de caírem em microsítios mais secos e arejados.

Morfometria de frutos e sementes

Após a retirada do arilo, 100 sementes foram medidas com paquímetro de precisão e pesadas em balança analítica Metler.

Ecofisiologia da germinação

Os frutos foram coletados no Núcleo Picinguaba, Parque Estadual da Serra do Mar, município de Ubatuba/SP (23°28'13,6"S; 45°08'14,6"W) e levados para o Laboratório de Ecofisiologia Vegetal do Departamento de Botânica da UNICAMP, onde as sementes foram retiradas dos frutos e os arilos removidos. Portanto, em todos os tratamentos foram utilizadas sementes sem arilo. As coletas foram realizadas entre maio de 2005 e maio de 2007.

Nos experimentos de germinação, antes de cada tratamento, as sementes foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio a 0,25% durante 10 minutos. Todos os tratamentos contaram com 10 placas de Petri, contendo 10 sementes cada, ou, no caso das sementes submetidas à hipoxia, 10 béqueres contendo 100mL de água destilada com 10 sementes cada.

Todas as repetições, de todos os tratamentos (referentes aos testes para fotoblastismo, testes com diferenças de temperaturas, testes com diferentes disponibilidades de oxigênio e testes para determinação da longevidade) foram realizados em germinador ARTLAB, com 3 lâmpadas fluorescentes brancas acopladas à porta.

Durante a contagem do número de sementes germinadas era verificado se as mesmas estavam viáveis ou apresentavam sinais de putrefação. Neste caso, o procedimento era descartá-las ao longo do período do experimento. Padronizou-se que o experimento seria considerado finalizado quando a taxa de germinação atingisse 100% ou quando as amostras restantes se mostrassem inviáveis ou, no máximo, 30 dias após a data de início.

A protrusão da radícula foi considerada como indício de germinação, e a contagem, realizada diariamente.

Fotoblastismo

Foram comparadas as taxas de germinação das sementes submetidas ao tratamento de fotoperíodo de 12h e de sementes mantidas no escuro constante. Ambos a 25° C constantes e condições normais de oxigênio. A condição de escuro foi obtida acondicionando as sementes em caixas Gerbox pretas, envolvidas por três sacos de polietileno pretos sobrepostos. A manipulação para a contagem foi feita em câmara escura, com a utilização de luz verde de segurança (Joly & Felipe 1979).

O índice de velocidade de germinação foi calculado segundo Maguire (1962): $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$, sendo G1, G2,... Gn = número de diásporos germinados e N1, N2,... Nn = número de dias após a sementeira.

Temperatura

Os tratamentos testados foram: alternância de temperaturas (12h de escuro a 10° C e 12h de luz a 25° C) e temperatura constante (25° C) com fotoperíodo de 12h, ambos em condições normais de disponibilidade de oxigênio. Neste experimento, foram utilizados, simultaneamente, dois germinadores, cada um com

uma das regulagens já especificadas. Estas temperaturas foram escolhidas por serem muito próximas das condições naturais existentes no local da coleta durante a época mais fria e seca do ano. Cada tratamento contou com 10 placas de Petri contendo 10 sementes cada, verificadas diariamente.

Para comparação destes tratamentos, também foi calculado o IVG, conforme especificado no item acima.

Longevidade das sementes

A longevidade das sementes foi testada ao longo de 18 meses após a coleta, sendo apresentados os resultados dos testes após 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 13 e 18 meses após a coleta. O armazenamento das sementes foi feito em condição ambiente, no laboratório (temperatura mantida a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) dentro de Gerbox tampados e conservados ao abrigo da luz. Os testes foram realizados com 10 placas de Petri, contendo 10 sementes cada, ao longo de 30 dias, sendo feita diariamente a contagem das germinadas. Neste experimento, foi utilizado germinador com regulagem de temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$ e fotoperíodo de 12h de luz branca. Foram comparadas as taxas de germinação obtidas em cada mês de estudo, a fim de verificar se houve uma queda significativa da viabilidade das sementes ao longo do tempo.

Disponibilidade de oxigênio: normoxia, hipoxia e anoxia

O termo “normoxia” foi utilizado neste trabalho para os tratamentos em condições normais de aeração. A condição de normoxia foi estabelecida com a colocação de 10 sementes em 10 placas de Petri sobre papel de filtro úmido.

O termo hipoxia foi utilizado para definir sementes em condições de submersão, portanto não medido, com menor concentração de oxigênio que a condição de normoxia, uma vez que a água atua como barreira para a difusão do oxigênio até as sementes. A quantidade de oxigênio dissolvido na água, nestas condições, é de aproximadamente 86% em relação à saturação da água (ou 7,5 mg/L) no início do experimento, sendo adotado como premissa que deveria ser idêntica em todos os experimentos de hipoxia realizados. Este dado foi obtido

através da utilização de um medidor de tensão de oxigênio (marca JENWAY, modelo 9071). A condição de hipoxia foi obtida com a submersão de 10 sementes em 100mL de água destilada em béqueres cobertos com filme plástico. Foi realizada também a medição da concentração de oxigênio durante o experimento, no 14º dia e ao final, no 30º dia. As concentrações de oxigênio médias observadas nestas fases foram, respectivamente, 75,7% e 15,3%.

Foram comparadas as velocidades de germinação das sementes submetidas à normoxia em relação às que foram submetidas à hipoxia, utilizando o IVG, da mesma maneira como já foi mencionado para os testes de fotoblastismo e temperaturas.

O termo anoxia foi utilizado para os tratamentos feitos em total ausência de oxigênio, monitorada através de um indicador específico. Para estabelecer a condição de anoxia foi utilizada uma jarra anaeróbica OXOID contendo um *sachet* ANAEROGEN que libera um catalisador que remove totalmente o oxigênio da jarra, que permanece fechada e selada durante todo experimento. Na parede transparente da jarra é fixado um papel indicador, que comprova a total ausência de oxigênio no interior da jarra, através da mudança de coloração (cor vermelha em presença de oxigênio e branca na ausência). Em função destas características, a contagem das sementes germinadas não podia ser feita diariamente, sendo realizada apenas uma vez após 30 dias de permanência das placas de Petri no interior da jarra.

Todos os tratamentos referentes à disponibilidade de oxigênio (normoxia, hipoxia e anoxia) foram realizados em germinador ARTLAB com temperatura de 25° C ± 2°C, com fotoperíodo de 12h de luz branca, conforme as especificações anteriormente informadas.

Teste de viabilidade das sementes – Tetrazólio

O teste de tetrazólio é importante para a agricultura, pois fornece, de maneira rápida, informações a respeito da qualidade das sementes, tanto em termos de viabilidade como de vigor. É um teste baseado na alteração de coloração dos tecidos vivos na presença de uma solução de cloreto de 2,3,5

trifenil tetrazólio que detecta a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas na atividade respiratória (Bhering *et al.* 2006). A coloração vermelha se deve à formação de uma substância estável e que não se difunde, chamada trifênilformazan (França Neto *et al.* 1999). Quando há a coloração, significa que o tecido está vivo, portanto viável. A intensidade da coloração indica o vigor, sendo as coradas em carmim mais claro, as de maior vigor e as que se coram em vermelho muito intenso, as que possuem tecido em deterioração. Colorações um pouco mais claras indicariam viabilidade, porém menor vigor. Neste trabalho, a palavra “vigor” refere-se às condições da semente quanto à sua capacidade de germinar. Foram consideradas como sendo as de maior vigor, as que germinaram com maior velocidade e de menor vigor as que germinaram (viáveis, portanto), porém, com menor velocidade. As que não se coram, não apresentam atividade respiratória, portanto estão mortas (Delouche *et al.* 1976). A interpretação do teste exige que cada semente seja analisada individualmente, quanto às partes coradas e a intensidade da coloração, a fim de determinar a condição de cada semente (Brasil 1992). Para cada espécie, existe uma metodologia a ser seguida, como maneira de padronizar os resultados, em geral utilizados para espécies de valor comercial. No caso de *Hedychium*, foram realizados diversos testes prévios a fim de encontrar a melhor metodologia e os resultados mais confiáveis, ou seja, mais próximos da realidade observada em laboratório, se deram como descrito a seguir.

Foi realizado teste de viabilidade das sementes com o uso do sal de tetrazólio em solução a 1%, mantido em escuro por 24h a 25° C. As sementes foram previamente cortadas e tiveram seus embriões expostos para facilitar o contato com a solução. Foram utilizados 3 lotes de 10 sementes cada. Após o período de coloração, as sementes, juntamente com seus respectivos embriões, foram observadas e classificadas de acordo com a tonalidade apresentada. As classes de cores adotadas foram: “vermelho”, “rosado”, “vermelho muito intenso” e “branco” para as não coradas. A porcentagem de sementes coradas nas 3 primeiras classes de cor foi considerada como “viável” e a intensidade da coloração adquirida por cada uma foi relacionada com o vigor e a velocidade de germinação, sendo coradas em vermelho consideradas como as que germinam

primeiro em cada lote, por serem mais vigorosas e as brancas como as que não germinam, ou seja, inviáveis.

Análise estatística

Para os testes de germinação, os resultados foram analisados através da análise de variância com os dados convertidos para arco seno da raiz quadrada da porcentagem, sendo posteriormente aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade (Sokal & Rohlf 1995). O programa utilizado para as análises de variância foi o VARPC, desenvolvido pelo professor Dr. Ladaslav Sodek, do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas.

RESULTADOS

Caracterização climática do ambiente natural

O clima da região caracteriza-se como tropical chuvoso, com chuvas ao longo de todo o ano. O mês de janeiro é o que apresenta maior pluviosidade e junho, a menor não existindo déficit hídrico na região (San Martin-Gajardo & Morellato 2003). A observação dos dados pluviométricos de 2002 a 2006 mostra que o período mais úmido ocorreu entre dezembro e março, enquanto a estação menos úmida se estendeu de junho a agosto. No ano de 2005, quando foi iniciada a coleta de sementes, foram registrados 439,8 mm de precipitação em janeiro, e 56,7 mm em junho. Neste ano, o mês de menor pluviosidade foi agosto, registrando 31,3 mm. Em relação às temperaturas médias, para o mesmo período de 2002 a 2006, as mais elevadas foram registradas entre os meses de janeiro a março, enquanto que as temperaturas médias mais baixas ocorreram entre os meses de julho a agosto (**Figuras 1 e 2**).

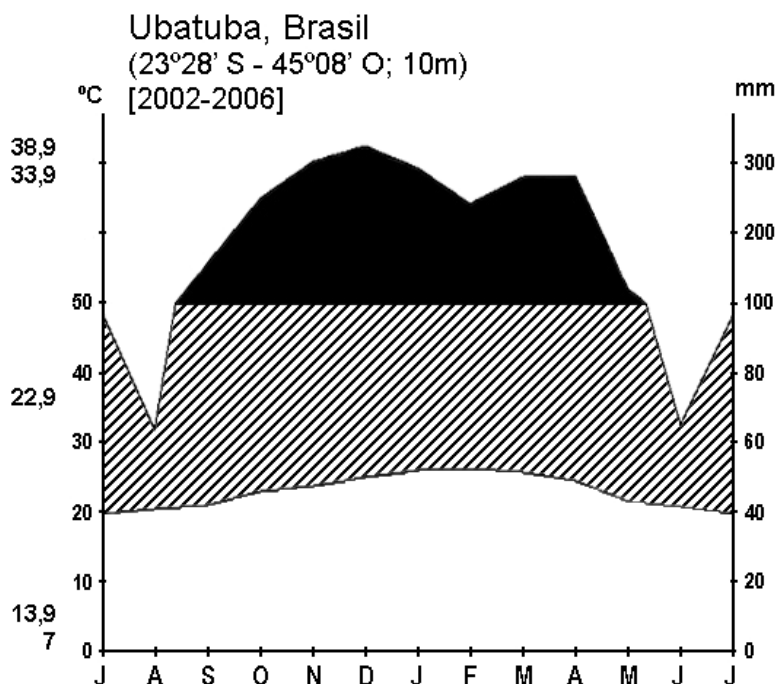


Figura 1 - Climatograma do município de Ubatuba/SP, no período de 2002 a 2006. Construído com base em dados disponíveis “on line” em www.ciiagro.sp.gov.br, baseado no modelo de Walter (1971).

Morfometria da semente

Cada semente tem cerca de 3 mm de largura por 4 mm de comprimento, sendo recoberta por um arilo vermelho. A massa fresca da semente recém-coletada é de aproximadamente 0,0219 g. Após 24h de secagem a 50° C, a massa é de 0,0119 g, e depois de um período de 48h de secagem a 50° C, 0,0118 g, em média. Essas informações demonstram que a semente tem um teor de umidade próximo de 46% quando dispersa do fruto.

Fotoblastismo

As sementes recém-coletadas e germinadas sob a condição de escuro apresentaram 76% de sementes germinadas após 30 dias e IVG= 8,64, enquanto que as recém-coletadas e germinadas sob fotoperíodo de 12h apresentaram 78% de taxa de germinação e IVG= 10,22. Para estas, não houve diferença significativa entre os tratamentos, segundo os testes estatísticos (F= 0,05 NS) **(Figura 3)**

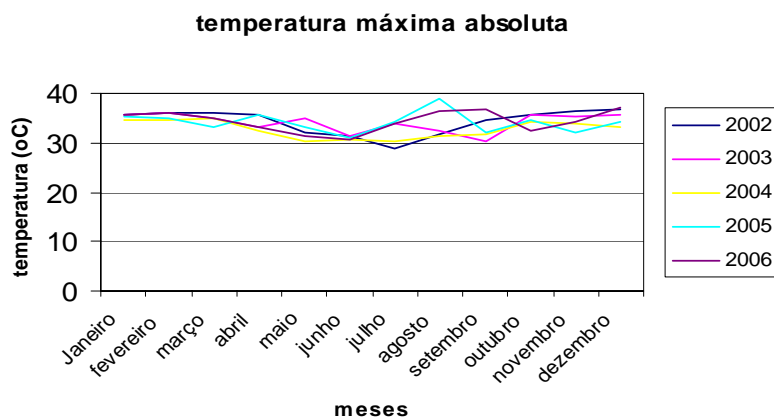
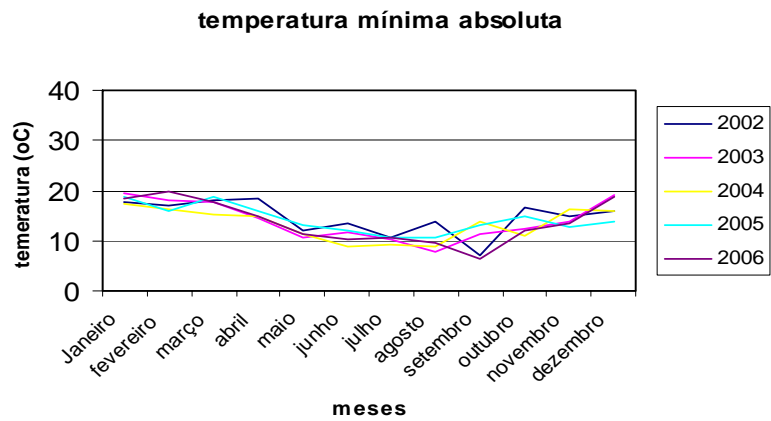
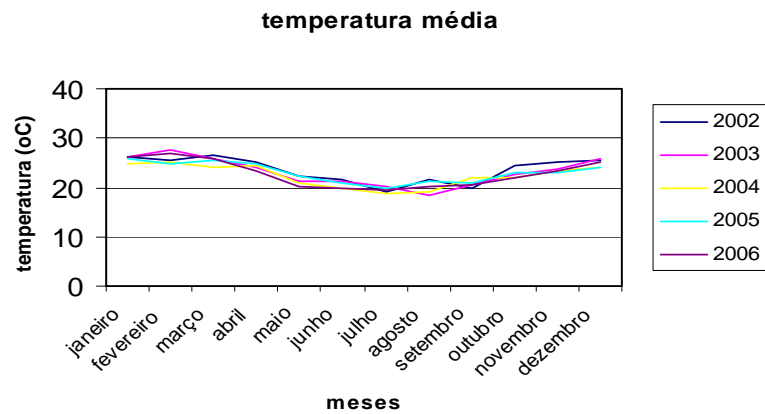


Figura 2: Temperaturas médias, mínimas e máximas registradas no município de Ubatuba/SP no período de 2002 a 2006. Construídos com base em dados disponíveis “on line” no site www.ciiagro.sp.gov.br. Com base nestes resultados foi definida a faixa de alternância de temperaturas (12h de escuro a 10° C e 12h de luz a 25° C) utilizada neste trabalho.

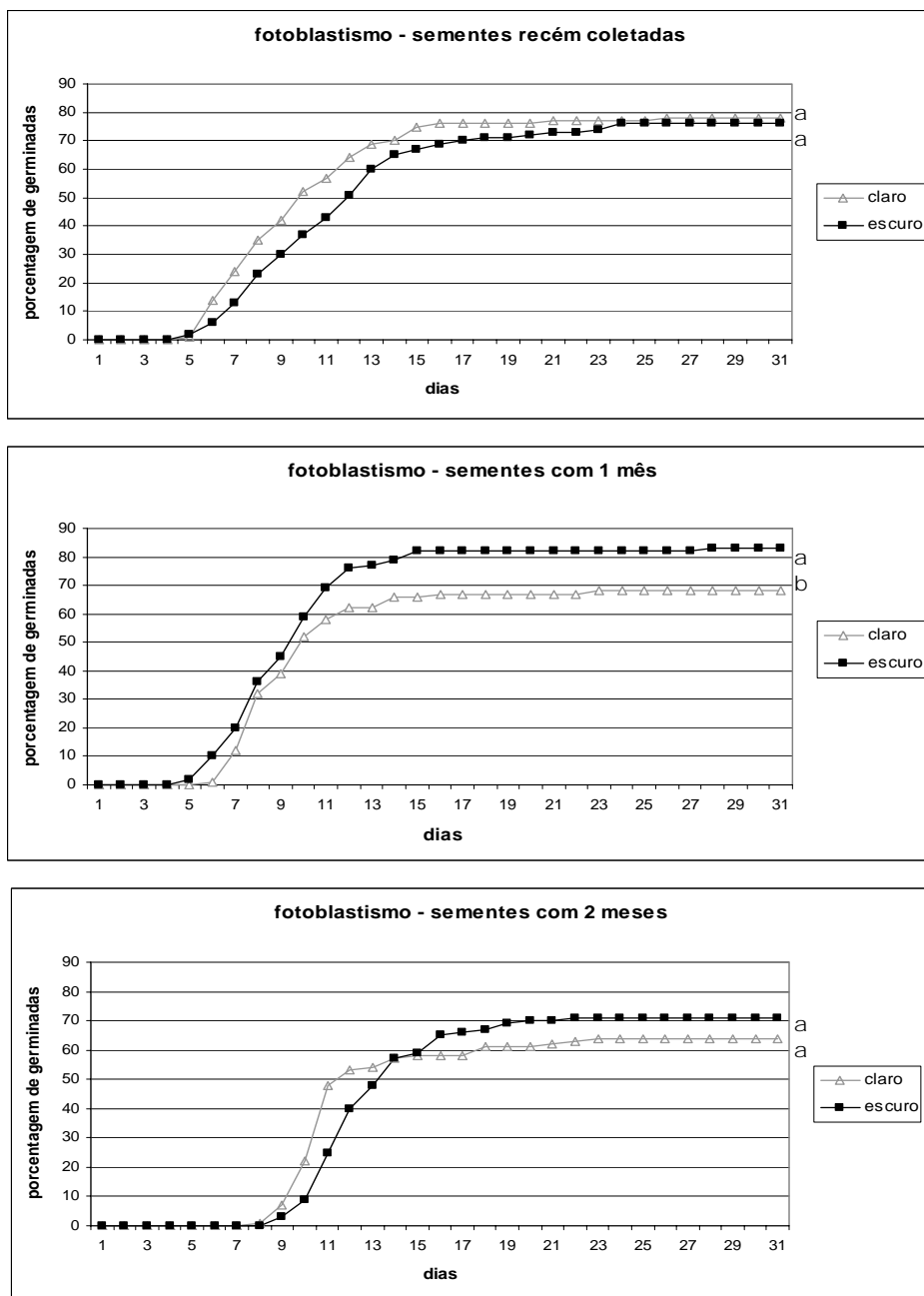


Figura 3 – Teste de fotoblastismo de sementes de *Hedychium* colocadas para germinar a 25 °C, em fotoperíodo de 12 horas (claro) e totalmente sem luz (escuro). 10 placas, com 10 sementes cada, por tratamento. As placas do tratamento de escuro foram colocadas dentro de 3 sacos plásticos pretos vedando qualquer possibilidade de entrada de luz, e a contagem foi feita em luz verde de segurança (Joly & Felipe, 1979). Tratamentos realizados em condições de normoxia. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, segundo teste de Tukey.

As sementes que foram armazenadas por um mês antes de serem colocadas para germinar, no claro e no escuro, apresentaram taxa de germinação de 83% e IVG=10,86 sob condição de escuro e 68% de germinação e IVG= 8,60 sob fotoperíodo de 12h. Entre estas, houve diferença significativa entre os resultados ($F= 7,79$ a 5% de probabilidade, com a DMS= 1,261, segundo o teste de Tukey a 5%), indicando que a condição de escuro seria mais favorável. Para as sementes armazenadas por dois meses, sob escuro, a taxa de germinação foi de 71% e apresentaram IVG= 6,24 e sob fotoperíodo de 12h, a germinação foi de 64% e IVG= 6,32. A diferença entre estas não foi significativa ($F= 1,90$ NS), segundo os testes estatísticos.

Portanto, de três repetições, com sementes de idades distintas, apenas uma, a intermediária entre as três, resultou em diferença estatisticamente significativa, de maneira que não seria possível afirmar que a ausência de luz poderia favorecer de fato a germinação. A partir destes resultados, é possível dizer que as sementes de *Hedychium coronarium* não são fotoblásticas.

Temperatura

Das sementes colocadas para germinar logo após a coleta, mesmo sendo expostas a baixa temperatura, foi observado o início da germinação logo no quinto dia após o início do período de incubação, porém somente no oitavo dia começou a ocorrer um número mais expressivo de germinadas. Para este tratamento de temperatura ($25^{\circ}\text{C}/ 10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), a taxa de germinadas após 30 dias foi de 73% e o IVG=5,13. Para as sementes colocadas para germinar a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, o início da germinação iniciou-se no quarto dia, aumentando sua expressão a partir do quinto dia. A taxa de germinação destas foi de 78% e o IVG= 10,22. Não houve diferença significativa na taxa de germinação entre os dois tratamentos ($F= 0,44$ NS), porém a germinação foi sensivelmente atrasada quando as sementes foram expostas à temperatura mais baixa (**Figura 4**)

No lote de sementes armazenadas por um mês antes de serem postas para germinar, aquelas que foram submetidas ao tratamento de alternância de

temperaturas a germinação iniciou-se no sétimo dia, sendo mais expressiva a partir do oitavo dia. A taxa de germinação alcançada foi de 56% e o IVG= 4,22. As sementes submetidas ao tratamento de temperatura constante começaram a germinar no sétimo dia, porém concentrando a maior parte das germinadas no nono dia. A taxa de germinadas foi de 68% e o IVG= 8,60. A diferença entre as taxas de germinação novamente não foram significativas, estatisticamente ($F=2,68$ NS), porém a velocidade de germinação caiu na mesma proporção para os dois tratamentos, mantendo a velocidade mais lenta para as que foram submetidas à temperatura mais baixa.

As sementes que foram armazenadas por dois meses antes da incubação apresentaram as primeiras radículas no décimo quarto dia para o tratamento de alternância, com maior número de germinadas no vigésimo primeiro dia. A taxa de germinadas ao trigésimo dia foi de 53% e o IVG 2,20. Para as sementes submetidas ao tratamento de temperatura constante, o início da germinação se deu no sétimo dia e o pico ocorreu no décimo dia. A germinação chegou a 64% nesta condição e o IVG= 6,32 (**figura 4**).

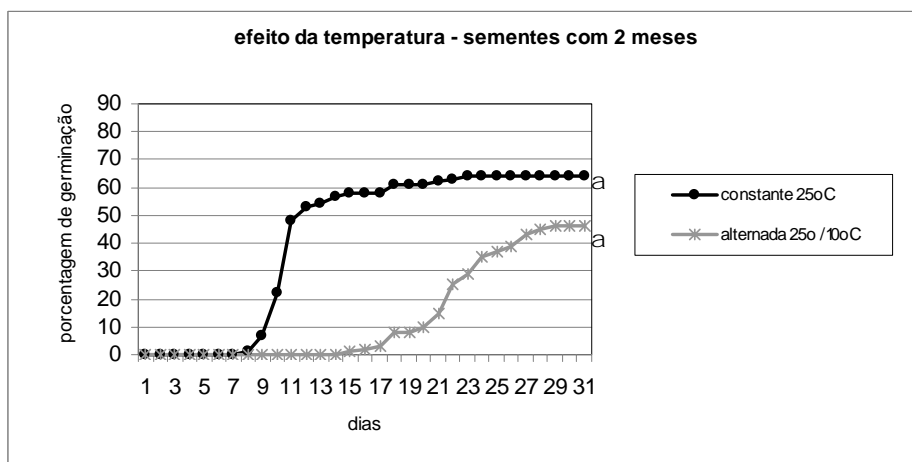
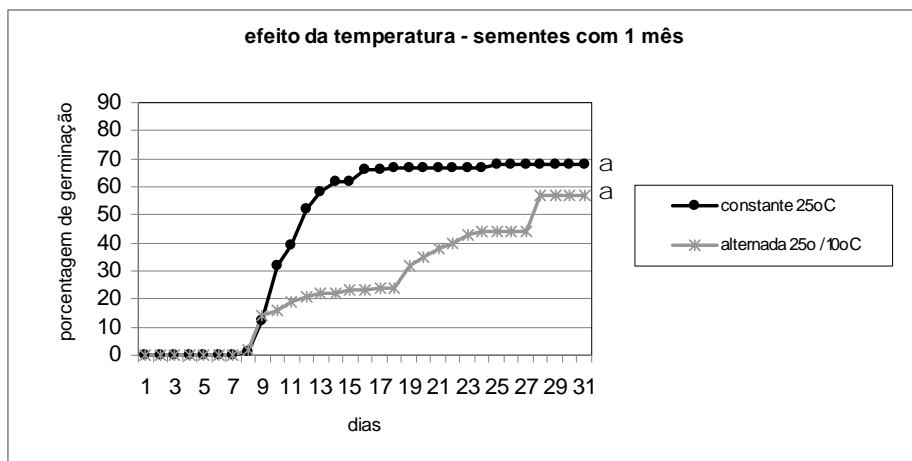
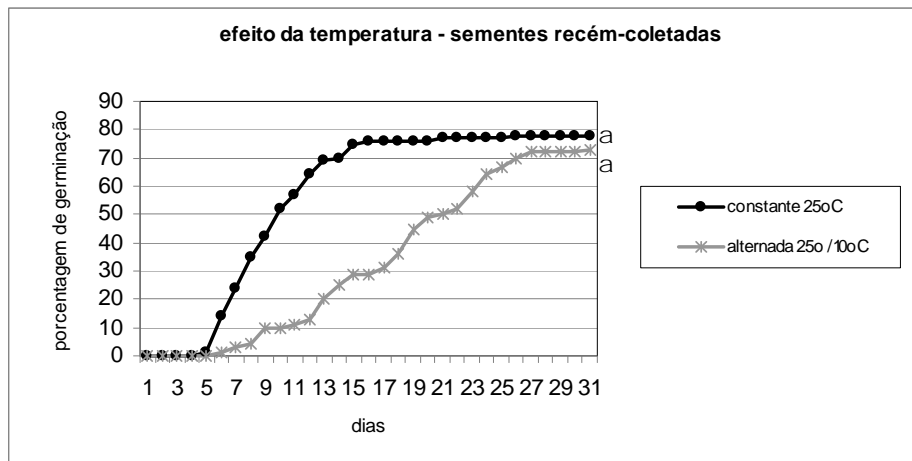


Figura 4 – Teste de alternância de temperatura na germinação de sementes de *Hedychium coronarium* colocadas para germinar a 25 °C e na alternância de 12 horas a 25 °C e 12 horas a 10 °C. 10 placas, com 10 sementes cada, por tratamento, fotoperíodo de 12 horas e condições normais de oxigenação. Letras iguais indicam que não houve diferença entre os tratamentos, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Longevidade das sementes

Logo após coletadas, 78% das sementes geminaram. Com um mês de armazenamento, a taxa foi de 68%. De dois a seis meses de armazenamento, as taxas foram, respectivamente, 64%, 61%, 66%, 67% e 58%. Do décimo segundo mês até o décimo oitavo, as taxas de germinação obtidas foram: 65%, 39%, 34%, 33%, 32%, 14% e 10% (**figura 5**). Os testes sugerem uma tendência de queda na viabilidade das sementes ao longo do tempo, porém a diferença não foi estatisticamente significativa se comparada mês a mês até o décimo segundo mês (**Figura 6**). A partir do décimo terceiro mês de idade, as sementes passam a perder de maneira significativa a viabilidade. O valor de F foi de 25,30 a 0,01% de probabilidade. O teste de Tukey a 5% fornece a DMS= 3.521. Os resultados mais relevantes são apresentados na **figura 6**.

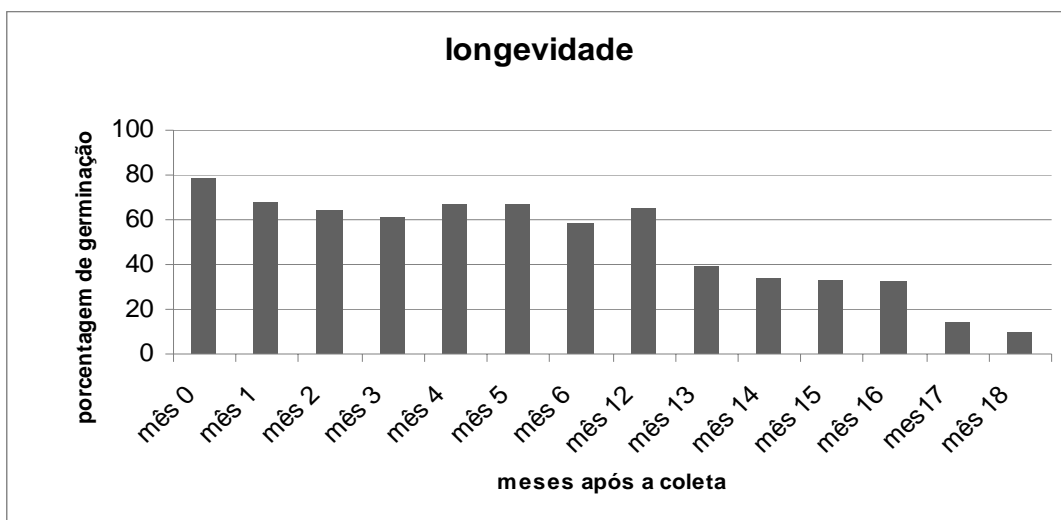


Figura 5 – Teste de longevidade de sementes de *Hedychium coronarium* armazenadas em gerbox, em condições normais de laboratório (25 oC ± 2 oC). 10 placas, com 10 sementes cada, por tratamento, fotoperíodo de 12 horas, 25 °C constante, condição de normoxia.

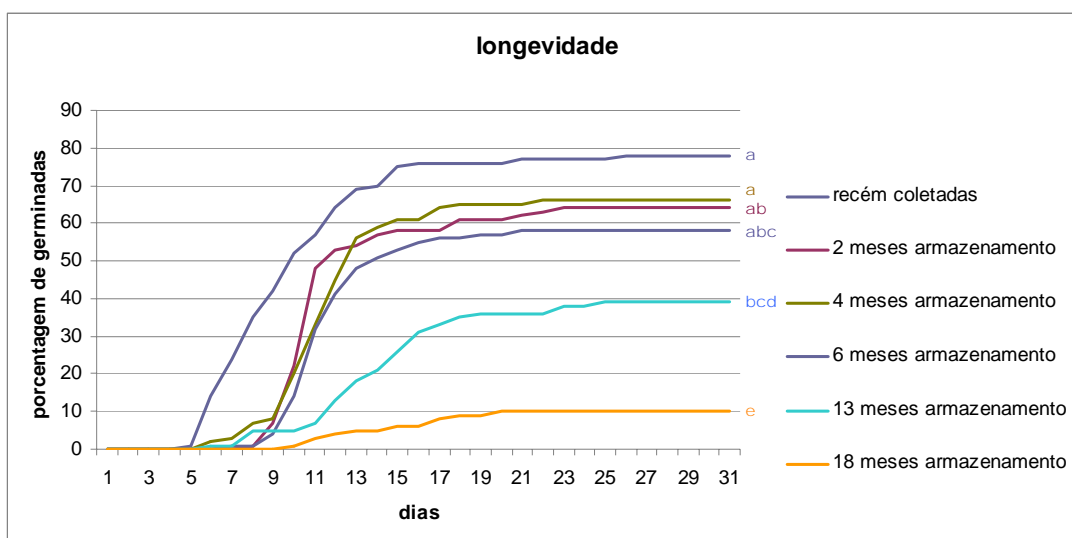


Figura 6 – Curvas de germinação de sementes de *Hedychium coronarium*, armazenadas em gerbox, em condições normais de laboratório (25 °C ± 2 °C). 10 placas, com 10 sementes cada, por tratamento, fotoperíodo de 12 horas, 25 °C constante, condição de normoxia.

Disponibilidade de oxigênio: normoxia, hipoxia e anoxia

Sob disponibilidade normal de oxigênio, normoxia, 78% das sementes recém-coletadas germinaram, com IVG= 10,22. Sob hipoxia, sementes recém-coletadas germinam a uma taxa de 32% e IVG= 2,72. Sementes submetidas à anoxia logo após a coleta apresentaram 2% de germinação. Para as sementes germinadas sob anoxia, não foi possível calcular o IVG, uma vez que a contagem foi realizada apenas no 30º dia. Estatisticamente, os três resultados apontam para evidências fortíssimas, a um nível de significância de 0,1% de que se deve rejeitar a hipótese de igualdade entre os tratamentos, ou seja, os mesmos diferem entre si ($F= 59,20$ ***). O teste de Tukey aponta a DMS= 3,388 entre os tratamentos, após a transformação dos dados em raiz do arco seno (**figura 7**).

Após dois meses de armazenamento, sementes submetidas à normoxia apresentaram 64% de germinadas e IVG= 6,32. Sementes submetidas à hipoxia, após o mesmo período de armazenagem, apresentaram novamente 32% de taxa de germinação, com IVG= 2,22. Das sementes submetidas a anoxia, 21% apresentaram protrusão da radícula, mas já se encontravam mortas na ocasião da abertura da jarra anaeróbica. A um nível de significância de 1%, houve diferença entre os tratamentos de normoxia e os outros dois tratamentos, ($F=8,89^{**}$), com DMS=4,733. Porém, não houve diferença significativa entre os resultados para a comparação entre as condições de hipoxia e anoxia (**figura 7**).

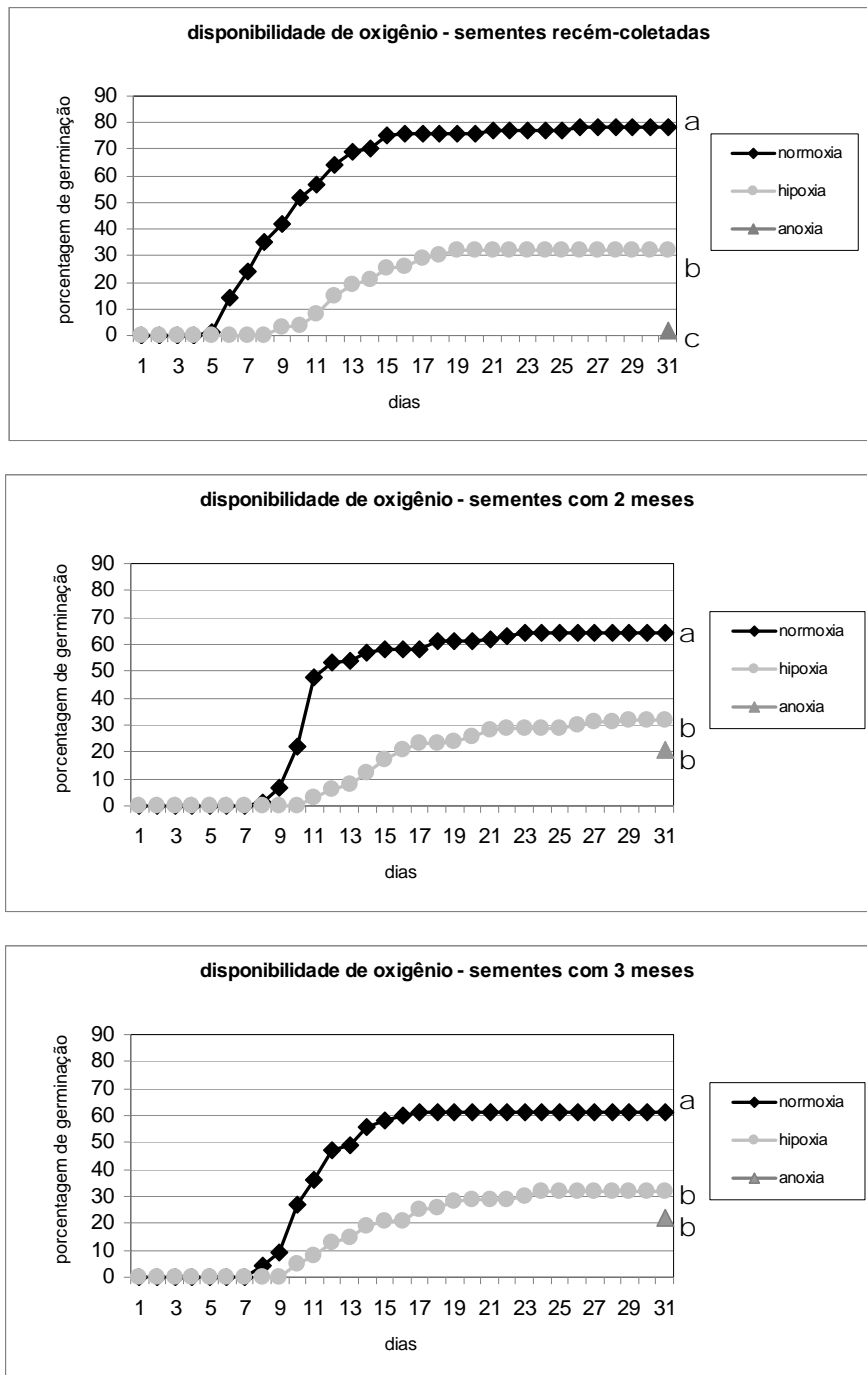


Figura 7 – Germinação de sementes de *Hedychium* em normoxia, hipoxia e anoxia. 10 placas, com 10 sementes cada, por tratamento, fotoperíodo de 12 horas, 25 °C constante. No tratamento de normoxia as sementes foram colocadas em Gerbox sobre papel de filtro umedecido. A condição de hipoxia foi obtida mantendo as sementes submersas em 100 ml de água destilada (Okamoto & Joly, 2000). Para estabelecer a condição de anoxia foi utilizada uma jarra anaeróbica OXOID contendo um *sachet* ANAEROGEN que libera um catalisador que remove o oxigênio total da jarra, que permanece fechada e selada durante todo experimento (Okamoto & Joly, 2000). Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Sementes armazenadas por três meses apresentaram 61% de taxa de germinação sob normoxia, com IVG= 6,14. Sob hipoxia, a taxa de germinação se manteve em 32% e IVG= 2,53 (**figura 7**).

Um total de 22% das sementes submetidas a anoxia apresentaram a protrusão da radícula, mas também já se encontravam mortas quando foram contadas. Novamente, a um nível de significância de 0,1%, houve diferença entre o tratamento de normoxia em relação aos tratamentos de hipoxia e anoxia ($F=15,42^{***}$), sendo a DMS=2,736, mas não entre as situações de hipoxia e anoxia (**figura 7**).

Viabilidade das sementes

De acordo com o teste de tetrazólio realizado, 80% das sementes recém-coletadas se apresentam viáveis. Destas, 30% foram consideradas como sendo as de maior vigor, por terem apresentado coloração “vermelho”; 43,5% foram consideradas sadias, por terem sido coradas de “rosado”. O restante das coradas, equivalente a 6,5% das sementes coradas em “vermelho muito intenso”, foram consideradas capazes de germinar, porém danificadas, que devem corresponder àquelas que germinam após um período maior de incubação (as que apresentam menor velocidade de germinação). 20% das sementes permaneceram sem corar-se, sendo interpretadas como aquelas que não germinariam, por serem inviáveis (sem coloração, estas sementes foram contadas como “mortas”).

DISCUSSÃO

Embora as sementes com um mês de idade tenham apresentado resultado diferente em relação à resposta à luz, este resultado não se repetiu com as sementes recém-coletadas, nem com aquelas que tinham dois meses de idade quando utilizadas nos experimentos. Deste modo, não se pode afirmar que a condição de escuro seja mais favorável à germinação. O mais adequado é considerá-la como uma espécie fotoblástica neutra, ou seja, indiferente à luz para germinar (Mancinelli 1994). Sob escuro, fungos e agentes contaminantes se proliferaram em menor quantidade, o que pode ter permitido que estas

alcançassem maiores taxas de germinação, de acordo com o observado nas placas **(figura 3)**. Sendo assim, a espécie pode ser considerada capaz de germinar tanto em áreas expostas à luz, como áreas de bordas e clareiras, ou sujeitas ao sombreamento, como áreas de sub-bosque.

Já em relação ao efeito da alternância de temperaturas testada, nota-se que esta não afetou a porcentagem final de sementes germinadas, mas sim a velocidade de germinação apresentada por elas **(figura 3)**

O IVG é um valor freqüentemente expresso sem unidade, porém que se refere à quantidade de sementes germinadas por unidade de tempo (Borghetti & Ferreira, 2004). Portanto, isso significa que quanto maior o valor obtido para um determinado tratamento, mais rápida é a velocidade de germinação apresentada pelos propágulos submetidos a ele. Como ocorre com diversas outras espécies, a alternância de temperatura, utilizando uma temperatura mais baixa do que a média observada no ambiente, provocou uma diminuição da velocidade de germinação (Labouriau 1983; Lima *et al.* 1997; Santos & Cardoso 2001).

Esta diminuição de velocidade de germinação, observada para a condição em que as sementes foram expostas à temperatura mais baixa por um período do dia, demonstra que houve uma perda de vigor neste grupo de sementes. Delouche (1969) relata que a perda de vigor está relacionada ao início da deterioração da semente, com queda na velocidade e uniformidade do crescimento e desenvolvimento de plântulas.

A velocidade de germinação é um dos conceitos mais antigos de vigor de sementes e tem como objetivo determinar o vigor relativo do lote, avaliando-se a velocidade de germinação, em condições controladas de laboratório, estabelecidas para o teste de germinação. Sementes com porcentagens de germinação semelhantes freqüentemente mostram diferenças em suas velocidades, indicando que existem diferenças de vigor entre elas.

A longevidade das sementes observada em laboratório sugere que estas possam compor o banco de sementes das florestas tropicais. Isto está de acordo com o estudo de Young *et al.* (1987) que mostra um predomínio de sementes de gramíneas, espécies arbustivas e herbáceas no banco de florestas tropicais,

refletindo o importante papel destas na composição da vegetação nos primeiros estágios da sucessão. Em se tratando de uma espécie invasora, torna-se importante o conhecimento deste fato, pois além da propagação vegetativa muito bem sucedida, a espécie também possui um grande potencial de colonização de novos ambientes, distantes da planta mãe, através da dispersão de suas sementes e de sua durabilidade no banco.

A germinabilidade de sementes varia ao longo do ano, mas no caso de *Hedychium*, quando os diásporos começam a perder significativamente a viabilidade, novos frutos já estão maduros nos indivíduos parentais, prontos para um novo evento de dispersão. A época da frutificação e dispersão coincide com a estação mais seca do ano na região (**figura 1**) o que favorece a abertura dos frutos e exposição das sementes, uma vez que se trata de frutos do tipo capsular, cuja desidratação é importante no mecanismo de abertura dos septos. Esta estratégia também foi observada para *Talauma ovata* A. St.-Hil. (Magnoliaceae) por Lobo & Joly (1996).

Estes dados são referentes à longevidade das sementes armazenadas sob condições de laboratório, e são provavelmente diferentes das que seriam encontradas pelas sementes se houvessem caído no solo imediatamente após a dispersão, devido à ação de insetos e microorganismos decompositores presentes no solo (Motta *et al.* 2006). Os bancos de sementes do solo podem ser classificados em transitórios, nos quais as sementes germinam no período de até um ano e em bancos persistentes, quando as sementes mantêm-se viáveis por período superior a um ano (Simpson *et al.* 1989). De acordo com Baskin e Baskin (1998), vários autores classificam os bancos de semente como sendo de curta ou longa duração. Nos bancos de curta duração as sementes permanecem viáveis por períodos de no mínimo um ano e no máximo cinco anos, enquanto que naqueles de longa duração as sementes permanecem viáveis por período mínimo de cinco anos. Apesar disso, os autores definem bancos persistentes quando as sementes permanecem viáveis até a segunda estação de germinação subsequente. Isso permitiria sugerir que as sementes de *Hedychium* fizessem parte do banco transitório, pois em campo, a viabilidade dos diásporos

provavelmente seria inferior à verificada em laboratório, sendo enquadradas na categoria de sementes de curta duração.

As curvas de germinação apresentadas para os diferentes tratamentos são do tipo platicúrtica, ou seja, apresentam um pico de germinação nos primeiros dez dias, mas depois a germinação continua ocorrendo ao longo de um período relativamente longo. A grande variância na frequência de germinação sugere que, sob condições naturais, a germinação pode se estender de dias a meses, aproveitando janelas de oportunidade. (Borghetti & Ferreira 2004).

Em relação aos tratamentos de restrição de oxigênio, os resultados demonstram que sob hipoxia ocorre uma queda significativa na taxa de germinação, tanto em relação à velocidade de germinação como na porcentagem final de sementes germinadas (**figura 7**). Os resultados para anoxia não são conclusivos, pois sementes recém-coletadas apresentaram uma taxa de germinação de 2% e essa porcentagem cresceu de maneira muito significativa após um período de armazenagem, sendo difícil explicá-los apenas com base nestes valores (**figura 7**). Uma hipótese possível seria a de que as sementes recém-coletadas possuem um teor maior de água em seu interior, portanto, menos espaço para a existência de ar em seu interior. Já as sementes que foram armazenadas, podem ter tido uma redução no teor de água e possivelmente tenha ocorrido a entrada de ar em espaços no seu interior. Por este motivo, talvez, as sementes com maior tempo de armazenamento possam ter tido maior sucesso quando expostas à condição de anoxia, já que possuiriam sua própria reserva de oxigênio armazenada para utilizar na ocasião do início da germinação.

Resultados semelhantes em relação aos testes em ausência de oxigênio foram obtidos por Lobo & Joly (1996) para sementes de *Talauma ovata*, que são dispersas na estação mais seca do ano e não germinam sob alagamento, embora quando adultas, suas plantas também tolerem períodos de ausência de oxigênio no solo. Apesar de ser típica de matas de brejo, *T. ovata* não demonstra preferência por esta situação, sendo que seu crescimento, apesar de não ser inibido por condições de alagamento, é favorecido em condições de boa drenagem (Lobo & Joly 1995). A diferença entre estas espécies é que *Hedychium*

germina sob hipoxia, condição sob a qual *T. ovata* não se mostrou capaz de germinar. Okamoto & Joly (2000) verificaram estes resultados para *Inga sessilis*, cuja germinação ocorre sob hipoxia, também em taxa sensivelmente reduzida em relação à apresentada sob normoxia e sendo inibida quando em condição de anoxia. No estudo de Okamoto (1998), sementes de *Inga luschnathiana* tiveram alta taxa de germinação sob hipoxia (96%) e inibição da germinação sob anoxia, enquanto sementes de *I. affinis* apresentaram capacidade de germinação sob hipoxia com maior sucesso e mantiveram sua viabilidade sob anoxia, embora sem germinar, por um período de 60 dias. Ainda neste mesmo estudo, *I. fagifolia* mostrou-se bastante tolerante às condições de baixa disponibilidade ou ausência de oxigênio, germinando com taxa de 100% em ambas as situações. São conhecidas pouquíssimas espécies capazes de germinar sob anoxia, sendo este fenômeno relatado na literatura para as espécies arbóreas *Erythrina caffra* (Fabaceae) (Small *et al.* 1989) e *Chorisia speciosa* (Bombacaceae) (Joly & Crawford 1983), para *Oryza sativa* (Poaceae) (Bertani *et al.* 1980) e *Echinochloa crus-galli* (Poaceae) (Kennedy *et al.* 1983, Kennedy *et al.* 1992), e para as plantas aquáticas *Trapa natans* (Trapaceae), *Nuphar luteum* (Nymphaeaceae) e *Scirpus mucronatus* (Cyperaceae) (Menegus *et al.* 1992).

Os resultados dos trabalhos que mostram perda de viabilidade de sementes após períodos de anoxia poderiam ser explicados pelo fenômeno de injúria pós anoxia (Pfister-Sieber & Brändle 1994) ou à queda na fermentação (Okamoto & Joly 2000). Já a capacidade de algumas espécies serem tolerantes à ausência de oxigênio estaria relacionada às respostas metabólicas destas, como redução da demanda energética e controle da produção de metabólitos tóxicos, como etanol e lactato nesta condição, associadas à adaptações morfo-anatômicas, como raízes adventícias, aerênquimas ou lenticelas hipertrofiadas (Joly 1991, 1994).

Embora tenha sido constatada a protrusão da radícula em situação de anoxia, a germinação não levou ao desenvolvimento da plântula. É possível que produtos do metabolismo anaeróbico tenham causado danos ao embrião (Pfister-Sieber & Brändle 1994) ou mesmo que a protrusão tenha sido causada por um

fator apenas físico. Ou seja, o de alongamento poderia ter sido provocado pela entrada de água nas células, causando a expansão radicular, uma vez que o tecido próximo ao hilo da semente possui naturalmente suas células mais afrouxadas, como foi verificado nos cortes anatômicos realizados para o segundo capítulo deste trabalho, justamente com a função de facilitar a protrusão. Após a retirada das sementes da jarra anaeróbica, as mesmas foram mantidas sob normoxia e acompanhadas por mais 30 dias, não tendo sido notado nenhum sinal de que se mantivessem vivas. Ao contrário, a maioria entrou rapidamente em deterioração ao longo deste período, confirmando a suspeita de que o período de anoxia ao qual as sementes foram expostas lhes tenha sido letal. Este resultado é abordado também no segundo capítulo deste trabalho.

Hedychium, embora seja capaz de colonizar com sucesso áreas de solo encharcado, portanto, com menor disponibilidade de oxigênio, ocorre também em solos drenados, como foi observado em campo. Os resultados obtidos em laboratório apontam uma maior germinabilidade em condições normais de oxigenação, como ocorre naturalmente em solo drenado. Portanto, seria possível sugerir que a ocupação de ambientes brejosos por esta espécie não se trata de um aspecto preferencial, mas sim, resultante de sua vitória na competição por recursos com as espécies nativas, que não teriam tanto sucesso quanto o *Hedychium* sob condições desfavoráveis de disponibilidade de oxigênio no momento da germinação.

A principal vantagem da distância na disseminação de sementes é a ocupação de habitats diferentes daqueles onde os parentais se encontram (Howe 1986). Algumas espécies têm requerimentos especiais para a germinação e o estabelecimento, que são encontrados apenas em raros locais, como por exemplo, uma área perturbada do sub-bosque (Howe & Smallwood 1982). Para *Hedychium*, aparentemente, não existem requerimentos específicos para a ocorrência da germinação, mas ambientes sujeitos ao alagamento, tidos como desfavoráveis para as demais espécies, têm se mostrado como os mais propícios para sua ocupação.

Considerações finais

As sementes de *Hedychium coronarium* são indiferentes à luz, o que lhe permite ocupar ambientes bastante diversificados em relação à qualidade de luz, desde clareiras e áreas de borda, sob maior influência de luz, como o interior da mata, sob condições de maior sombreamento e restrição de luminosidade.

Há um atraso na germinação quando as sementes são expostas a baixas temperaturas, coincidindo com as condições encontradas pela espécie na época de sua dispersão, embora nesta época, os diásporos encontrem condições mais favoráveis em relação à aeração do solo para germinar.

A longevidade da semente, que permitiria a presença permanente de diásporos no ambiente, ampliando a possibilidade de encontrar condições favoráveis à germinação, associada à capacidade de germinar em condições de baixa disponibilidade de oxigênio, conferem ao *Hedychium* uma vantagem competitiva na ocupação de áreas sazonal ou permanentemente alagadas. Embora esta não seja a condição preferida pela espécie para germinar, da mesma maneira como outras espécies tolerantes, que também demonstram que condições de melhor aeração favorecem a germinação, a exemplo de *T. ovata*. (Lobo & Joly 1995). Por esta razão, aproveitar a época do ano em que o solo encontra-se menos encharcado para a frutificação seria uma eficiente estratégia para que a maioria das sementes possa encontrar condições de maior disponibilidade de oxigênio e obter a maior taxa de germinação possível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASKIN, C.C. & BASKIN, J. M. 1998. *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, San Diego, CA.
- BERTANI, A.; BRAMBILLA, I.; MENEGUS, F. 1980. Effect of anaerobiosis on rice seedlings: growth, metabolic rate and fate of fermentation products. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 31, n. 120, p. 325-331.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. 1994. *Seeds: physiology of development and germination*. 2ed. New York: Plenum Press, 445p.
- BHERING, M.C.; DIAS, D.C.F.S.; VIDIGAL, D.S.; NAVEIRA, D.S.P. 2006. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de pimenta. *Revista Brasileira de Sementes*, Pelotas, v.28, n.3; p.64-71.
- BORGHETTI, F. & FERREIRA, A. G. 2004. Interpretação de resultados de germinação. In: *Germinação – Do Básico ao Aplicado*. Artmed Ed. Porto Alegre – RS, p.209 – 222.
- BRASIL. 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. *Regras para análise de sementes*. Brasília-DF: LAVARV/ SNAD. 365p.
- BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2006. *Espécies Exóticas Invasoras*. Disponível em: <http://mma.gov.br/invasoras>. [Acesso em abril de 2006].
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. 1980. *Sementes - ciência, tecnologia e produção*. Campinas: Fundação Cargill, 326p.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. 2000. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, p.151-159.

- CHIRKOVA, T. 1978. Some regulatory mechanisms of plant adaptation to temporal anaerobiosis. In: Davies, D. and Cawford, R.(eds.) *Plant life in anaerobic environment*, Ann Arbor Science. Pub. Ann Arbor. Miami. p.137-154.
- CRAWFORD, R.M.M. 1992. Oxygen availability as an ecological limit to plant distribution. *Advances in Ecological Research* 23: 93-185.
- CRAWFORD, R.M.M. & BRÄNDLE, R. 1996. Oxygen deprivation stress in a changing environment. *Journal of Experimental Botany* 47: 145-159.
- DAHLGREN, R.M.T.; CLIFFRD, H.T. & YEO, P.F. 1985. *The families of the monocotyledons*. Springer-Verlag, Berlin.
- DAVIES, D. D. 1980. Anaerobic metabolism and the production of organic acids. In *The biochemistry of plants - a comprehensive treatise* (P. K. Stumpf &
- DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. 1976. O teste de tetrazólio para viabilidade da semente. Brasília: AGIPLAN, 103p E. E. Conn, eds). Vol 2: Metabolism and respiration. Academic Press, New York, p. 581-611.
- ENDRESS, P.K. 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge University Press, Cambridge.
- FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. 1999. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES, Cap. 8, p. 8.5-1 - 8.5.26.
- HOOKE, D.D. 1984. Adaptation to flooding with fresh water. In *Flooding and plant growth* (T.T. Kozlowski, ed.). Academic Press, London, p.265-294.
- HOWE, H. F. 1986. seed dispersal by fruit-eating birds and mammals. In: MURRAY, D. R. *Seed dispersal*. San Diego: Academic Press, p. 123-189.

- HOWE, H. F. & SMALLWOOD, J. 1982. Ecology of seed dispersal. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.13, p. 201-228.
- INSTITUTO HÓRUS DE DESENVOLVIMENTO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL. *Espécies Exóticas Invasoras: Fichas técnicas*. Disponível em: http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Hedychium_coronarum.htm. [Acesso em abril de 2006].
- JOLY, C. A. & CRAWFORD, R.M.M. 1982. Variation in tolerance and metabolic responses to flooding in some tropical trees. *Journal of Experimental Botany* 33: 799-809.
- JOLY, C. A.; CRAWFORD, R. M. M. 1983. Germination And Some Aspects Of The Metabolism Of *Chorisia Speciosa* Seeds Under Anoxia.. *Revista brasileira de Botânica*, v. 6, n. 2, p. 85-90.
- JOLY, C. A. 1991. Flooding tolerance in tropical trees. In Plant life under oxygen deprivation: ecology, physiology and biochemistry (M.B.Jackson, D.D. Davies & H. Lambers, eds.). SBP Academic Publishing, The Hague, p 23-34.
- JOLY, C.A. 1994. Flooding tolerance: a reinterpretation of Crawford's metabolic theory. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 102b: 343-354
- JOLY, C. A. & BRÄNDLE, R. 1995. Fermentation and adenylate metabolism of *Hedychium coronarium* J. G. Koenig (Zingiberaceae) and *Acorus calamus* L. (Araceae) under hypoxia and anoxia. *Functional Ecology* 9(3): 505-510.
- JOLY, C.A. & FELIPPE, G.M. 1979. Germinação e fenologia de *Zeyhera digitalis*: estudo preliminar. *Hoehnea* 8: 35-40.
- KENDRICK, R. E.; KRONENBERG, G. H. M. 1994. Photocontrol of seeds. In: *Photomorphogenesis in plants*. Dordrecht: Martinus Nijhoff, p.443-465.

- KENNEDY, R. A.; RUMPHO, M. E. & VANDER ZEE, P. 1983. Germination of *Echinochloa crus-galli* (Barnyard grass) seeds under anaerobic conditions. *Plant Physiology*, 72: 787-794.
- KENNEDY, R.A., RUMPHO, M. E. & FOX, T. C. 1992. "Anaerobic Metabolism In Plants" *Plant Physiology*, 100 (1): 1- 6.
- KISSMANN, K. G. & GROTH, D. 1991. "*Plantas invasoras e nocivas*". São Paulo: Basf. Brasileira. p.590 - 593.
- KRAMER, P.J. e T. KOZLOWSKI. 1979. *Physiology of Woody Plants*. New York, Academic Press. 811 p.
- LABOURIAU, L. G. 1983. *A germinação das sementes*. Washington: Organização dos Estados Americanos, 170 p. (Monografias Científicas)
- LIMA, C. M. R. de; BORGHETTI, F.: SOUZA, M. V. 1997. Temperature and germination of the leguminosae *Enterolobium contortisiliquum*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.9, n. 2, p. 97-102.
- LOBO, P.C. & JOLY, C.A. 1995. Mecanismos de tolerância à inundação de plantas de *Talauma ovata* St. Hil. (Magnoliaceae) uma espécie típica de Matas de Brejo. *Revista Brasileira de Botânica* 18(2): 177-183.
- LOBO, P.C. & JOLY, C.A. 1996. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Talauma ovata* St. Hil. (Magnoliaceae) uma espécie típica de Matas de Brejo. *Revista Brasileira de Botânica* 19(1): 35-40.
- LORENZI, H. 1982. "*Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais*". Nova Odessa. 425 p.
- MACEDO, J. F. 1997. "O gênero *Hedychium* Koenig (Zingiberaceae) no Estado de Minas Gerais". *Daphne*, 7(2):27-31.

- MAGUIRE, J. D. 1962. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 1:176-177.
- MANCINELLI, A. L. 1994. The physiology of phytochrome action. In: KENDRICK, R. E.; KRONENBERG, G. H. M. (Eds.) *Photomorphogenesis in plants*. Dordrecht: p.211-219.
- McMANMOM, M. & CRAWFORD, R.M.M. 1971. A metabolic theory of flooding tolerance: the significance of enzyme distribution and behavior. *New Phytologist* 70: 299-306.
- MENEGUS, F.; CATTARUZZA, L.; SCAGLIONI, L. & RAGG, E. 1992. Effects of oxygen level on metabolism and development of seedling of *Trapa natans* and two ecologically related species. *Physiologia Plantarum*, 86: 168-172.
- MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Disponível em: http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast [Acesso em maio de 2006].
- MOCQUOT, B., MOUCHES, C. & PRADET, A. 1981. Effect of anoxia on energy charge and proteins synthesis in rice embryo. *Plant Physiology* 68: 636-640.
- MOTTA, S. M.; DAVIDE, A. C.; FERREIRA, R. A. 2006. Longevidade de sementes de mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam. - Sterculiaceae) no solo em condições naturais. *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 28, nº 2, p.07-14.
- OKAMOTO, J. M. 1998. *Ecofisiologia da germinação e do metabolismo respiratório de quatro espécies do gênero Inga Mill. (Mimosaceae) submetidas à hipoxia e anoxia*. Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP. Dissertação de mestrado.
- OKAMOTO, J. M. & JOLY, C. A. 2000. Ecophysiology and respiratory metabolism during the germination of *Inga sessilis* (Vell.) Mart. (Mimosaceae) seeds subjected to hypoxia and anoxia. *Revista Brasileira de Botânica*. 23(1): 51-57.
- OLIVEIRA, E. C. & PEREIRA, T. S. 1989. Germinação de algumas espécies de monocotiledôneas. *Acta Biologica Leopoldensia* 11 (1) 61- 86.

- PEDRALLI, G. 2003. Macrófitas aquáticas como bioindicadoras da qualidade de água: alternativas para usos múltiplos de reservatórios. In: THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. (Eds.). *Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas*. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, p. 171-188.
- PFISTER-SIEBER, M. & BRÄNDLE, R. 1994. Aspects of plant behavior under anoxia and post-anoxia. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*. V.102. p 313-324.
- PIO CORRÊA, M. 1984. "Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas." Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Vol.6.
- PITELLI, R. A. 1998. Macrófitas aquáticas do Brasil. In: *WORKSHOP DE CONTROLE DE PLANTAS AQUÁTICAS*, Brasília. Anais... Brasília: 1998. p. 12-15.
- POPINIGIS, F. 1977. *Fisiologia da semente*. Brasília: AGIPLAN, 289p.
- RAMSAR, COP7. 1999. Document 24. *Invasive Species and wetlands*. The Ramsar Convention on Wetlands. Disponível em: http://www.ramsar.org/res/key_res_vii.14e.htm [Acesso em maio de 2008].
- RAYMOND, P., AL-ANI, A & PRADET, A 1985. ATP production by respiration and fermentation, and energy charge during aerobiosis and anaerobiosis in twelve fatty and starchy germinating seeds. *Plant Physiology* 79: 879-884.
- RODRIGUES, T.J.D.; RODRIGUES, L.R.A.; REIS, R.A. 1993. Adaptação de plantas forrageiras às condições adversas. In: *SIMPÓSIO SOBRE ECOSSISTEMA DE PASTAGENS*, 2., Jaboticabal, 1993. Anais... Jaboticabal: FUNEP, p.17-61.
- RUMPHO, M. E. & KENNEDY, R.A. 1981. Anaerobic metabolism in germinating seeds of *Echinochloa crus-galli* (Barnyard grass). *Plant Physiology*, 68: 165-168.
- SAN MARTIN-GAJARDO, I. & MORELLATO, L.P.C. 2003. Fenologia de Rubiaceae do sub-bosque em floresta Atlântica no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 26:299-309.

- SANTOS, D. L. dos & CARDOSO, V. J. M. 2001. Thermal-biological aspects on seed germination of *Cucumis anguria* L.: influence of the seed coat. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 24, p. 435-440.
- SILVA, A., CASTELLANI, E.D., AGUIAR, I.B., SADER, R. & RODRIGUES, T.J.D. 1997. Interação de luz e temperatura na germinação de sementes de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (guarantã). *Revista do Instituto Florestal* 9:57-64.
- SIMPSON, R.L.; LECK, M.A.; PARKER, V.T. 1989. Seed banks: General concepts and methodological issues. In: LECK, M.A.; PARKER, V.T.; SIMPSON, R.L. (Eds.). *Ecology of soil seed banks*. London: Academic Press, p.3-8.
- SMALL, J.G.C., POTGIETER, G.P., BOTHA, F.C. 1989. Anoxic seed germination of *Erythrina coffra*: ethanol fermentation and response to metabolic inhibitors. *J. Exp. Bot.* 40, 375–381
- SOKAL, R. R. & ROHLF, F. 1995. *Biometry*. New York: W. H. Freeman.
- STONE, C. P.; SMITH, C.W.; TUNISON, J.T. (Eds). 1992. *Alien plant invasions in native ecosystems of Hawaii: management and research*. Honolulu: University of Hawaii, Cooperative National Park Resources Study Unit, 887 p.
- TUNINSON, T. 1991. Weed Notes: *Hedychium coronarium*. Wildland Weeds Management
- VAN DER PJIL, L. 1982. *Principles of dispersal in higher plants*. Berlin, Springer-Verlag, 3 rd ed., 214p.
- WALTER, H. 1971. *Ecology of tropical and subtropical vegetation*. Van Nostrand Rainhold Company, New York.
- YOUNG, K. R.; EWEL, J. J.; BROWN, B. J. 1987. Seed dynamics during forest succession n Costa Rica. *Vegetation*, v. 71, p. 157-173.

Capítulo 2 - Desenvolvimento pós-seminal de *Hedychium coronarium* J König: as reservas da semente nos estágios iniciais do desenvolvimento sob diferentes condições de oxigenação.

INTRODUÇÃO

A germinação é um fenômeno biológico que começa com a absorção de água pela semente, fenômeno conhecido como embebição, e termina com o começo do alongamento do eixo embrionário, usualmente determinada pela protrusão da radícula (Bewley & Black 1994). Após a embebição, iniciam-se processos metabólicos utilizando as reservas da semente, que são geralmente constituídas por carboidratos, proteínas e lipídios (Karunagaran & Rao 1991; Bewley & Black 1994). A proporção dessa composição pode variar de espécie para espécie (Borges & Rena 1993; Bewley & Black 1994). Essas substâncias são então mobilizadas durante a germinação, e seus produtos de degradação são usados para produção de matéria-prima para a construção de novas células e tecidos e geração de energia (Mayer & Poljakoff-Mayber 1975).

O estabelecimento de dada espécie está ligado à capacidade de suas sementes germinarem rápida e uniformemente, a fim de vencer a concorrência com outras espécies presentes no local, ou pela capacidade de se manterem viáveis por períodos mais longos até que condições ambientais sejam propícias ao desenvolvimento das plântulas (Borges 2003). Para tanto, cada espécie lança mão de adaptações, como a mobilização de determinadas reservas para diferentes propósitos (Borges & Rena 1993; Borges 2003; Buckeridge *et al.* 2004).

Hedychium coronarium J. König (Zingiberaceae) é uma espécie herbácea rizomatosa, perene, originária da Ásia tropical (Macedo 1997; Pio Corrêa 1984). No Brasil, a espécie popularmente conhecida como lírio-do-brejo, é muito comum em toda a zona litorânea (Kissmann & Groth 1991), bem como habitando baixadas úmidas e pantanosas, margens de lagos, riachos e canais de drenagem, formando

densas populações (Lorenzi 1982). Sabe-se que com o encharcamento do solo há substituição da fase gasosa (ar) do solo pela fase líquida (água). Como consequência ocorre um déficit de disponibilidade de oxigênio no solo (Rodrigues *et al.* 1993). Essa disponibilidade de oxigênio pode variar de hipoxia à total anoxia. A presença de ar é um requisito básico para a germinação de sementes e estabelecimento de plântulas (Hook 1984). A germinação de sementes sob água pode ser benéfica ou desastrosa, dependendo da profundidade, duração da inundação, da temperatura da água e principalmente da espécie (Kramer & Kozlowski 1979).

Estudos com germinação são comumente realizados com espécies arbóreas nativas com enfoque para conservação (e.g. Andrade 2000, Albrecht *et al.* 1986, Cabral *et al.* 2003, Carneiro & Pires 1983, Borges 2003) e/ou com espécies de importância econômica (e.g. Corte *et al.* 2006, Pontes *et al.* 2006, Caçola *et al.* 2006) com objetivo de identificar características que promovam um melhor aproveitamento da espécie. São poucos os trabalhos que utilizam a disponibilidade de oxigênio no solo em seus experimentos com germinação (e.g. Okamoto & Joly 2000). Apesar do aumento de trabalhos com germinação, este número ainda é incipiente para responder questões relacionadas a adaptações da semente a seu habitat preferencial.

O objetivo deste trabalho foi verificar o tipo de reserva das sementes de *Hedychium* e comparar sua mobilização sob diferentes tratamentos de disponibilidade de oxigênio. Testamos a hipótese de que a espécie poderia consumir as reservas da semente com padrões diferenciados, de acordo com as condições de aeração do solo sob o qual germina.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécie estudada

Hedychium coronarium J. König (Zingiberaceae), popularmente conhecida como lírio-do-brejo, é uma espécie herbácea rizomatosa, perene, originária da Ásia

tropical (Macedo, 1997; Pio Corrêa, 1984). Invade agressivamente baixadas úmidas e pantanosas, margens de lagos, riachos e canais de drenagem, formando densas populações (Lorenzi 1982). No Brasil, a espécie é muito comum em toda a zona litorânea (Kissmann & Groth 1991).

Seguindo alguns dos critérios estabelecidos por Barroso *et al.* (1999), foi feita a seguinte descrição da semente de *Hedychium*: pequenas, cerca de 4 mm de comprimento por 3 mm de largura, com formato assimétrico (**figura 8a**), sob corte transversal, apresentam-se de esféricas a ovaladas, sob corte longitudinal, apresentam forma ovóide, de extremidades levemente anguladas (**figura 9**). A testa é glabra e apresenta ondulações quando observada à lupa. Sua coloração é avermelhada quando contida no fruto e castanho médio quando coletada e seca. A semente é oriunda de óvulo anátropo, com micrópila e hilo visíveis, sendo este pequeno e saliente; arilo de coloração vermelha.

Coleta

As sementes foram coletadas no Núcleo Picinguaba, PESM, no município de Ubatuba/SP (S 23° 28' 13,6"; W 045° 08' 14,6") em maio de 2005. Após serem levadas para o laboratório de Ecofisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, tiveram seus arilos removidos e foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,25% durante 10 minutos. As sementes submetidas à normoxia e à anoxia foram postas para germinar em placas de Petri, sobre papel filtro umedecido em água destilada. As sementes submetidas à condição de hipoxia foram postas para germinar em béqueres contendo 100ml de água destilada, cada um.

Para todos os tratamentos de disponibilidade de oxigênio, foram utilizados germinadores ARTLAB, com 3 lâmpadas fluorescentes brancas acopladas à porta, regulados com fotoperíodo de 12h e temperatura constante de 25° C +- 2° C.

As sementes germinadas foram retiradas das placas ou dos béqueres, e transferidas para frascos contendo os fixadores escolhidos, de acordo com o que se buscava observar, conforme será descrito no tópico a seguir. Também foram utilizadas sementes não embebidas (**figura 8a**), ou seja, que não haviam

absorvido água e, portanto, não haviam iniciado o processo de germinação, para que também fosse conhecida a estrutura e a composição das reservas da semente antes de sua germinação.

Estudo anatômico da semente, do embrião e estágio inicial da plântula.

Este estudo foi efetuado com a finalidade de conhecer a estrutura da semente madura, verificar se a protrusão da raiz ocorre por um processo físico ou fisiológico em condições anóxicas e observar o início da mobilização das reservas pelas sementes sob hipoxia e anoxia, comparando-as com as sementes germinadas sob condições normais de disponibilidade de oxigênio.

Os cortes foram realizados no eixo hipocótilo-radícula do embrião: i) de sementes maduras não embebidas (**figura 8a**); ii) de sementes recém-germinadas sob condições normais de disponibilidade de oxigênio, aqui chamada de normoxia (**figura 8b**); iii) de sementes recém-germinadas sob condição de menor disponibilidade de oxigênio, condição denominada como hipoxia (**figura 8b**); iv) de sementes submetidas à condição de ausência de oxigênio, denominada anoxia (**figura 8b**); v) de sementes germinadas em normoxia, já em estágio mais avançado de desenvolvimento, denominado como fase de plântula (ca. 1,5 cm a 2 cm. **Figura 8c**).

As sementes obtidas em cada tratamento foram fixadas em solução de FAA e conservadas em álcool 70%. Foram feitas lâminas permanentes com as sementes não embebidas, com as recém-germinadas e com as que se encontravam aderidas aos indivíduos na fase de plântula, incluídos em resina plástica (Historesin Leica), seguindo-se a técnica de (Gerrits & Smid 1983) e recomendações do fabricante; seccionados transversalmente e longitudinalmente em micrótomo rotativo. O material já incluído foi seccionado em micrótomo rotativo manual com navalha de aço. A espessura dos cortes foi de 10 micrômetros. Algumas secções foram coradas com Azul de Toluidina a 0,05% em tampão acetato pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964) por 3 minutos e lavadas em água corrente. As lâminas foram observadas em microscopia óptica e fotografadas, tanto com o uso

de filme fotográfico ISO 100, revelado e escaneado (imagens digitalizadas, portanto), como com o uso de câmeras digitais, diretamente, acopladas ao microscópio óptico.

Testes microquímicos - Reserva da semente e mobilização

O material, constituído por sementes germinadas ou não (as sementes não germinadas usadas são chamadas aqui de “não embebidas”) e submetidas aos diferentes tratamentos de disponibilidade de oxigênio, foi fixado em parte com FAA 50 (formaldeído, ácido acético, etanol 50% 1:1:18 v/v) por 24 horas (Johansen 1940) e em parte com FNT (Tampão fosfato, formalina, 9:1 v/v) por 48 horas. Após esses períodos os materiais foram desidratados e estocados em álcool etílico 70%; desidratados em álcool 90 e 100% e incluídos em resina plástica (Historesin Leica), seguindo-se a técnica de (Gerrits & Smid 1983) e recomendações do fabricante; seccionados transversalmente e longitudinalmente em micrótomo rotativo.

A fim de tornar possível a determinação do tipo de substância de reserva presente nas sementes de *Hedychium*, amostras foram submetidas a testes microquímicos que evidenciam polissacarídeos (incluindo mucilagem e amido), proteínas e compostos fenólicos hidrossolúveis; lipídios totais, ácidos e neutros (incluindo ácidos graxos livres). Os reagentes utilizados foram:

- a. Vermelho de rutênio para evidenciar mucilagens ácidas (Gregory & Baas 1989).
- b. Azul de alciano para evidenciar mucopolissacarídeos ácidos (Pearse 1985).
- c. Reação PAS (Periodic-Acid-Schiff's reagent) para evidenciar polissacarídeos gerais (McManus 1948).
- d. Preto de Sudão B para evidenciar lipídios totais (Pearse 1985).
- e. Vermelho de Sudão IV (alcoólico) para evidenciar lipídios totais (Pearse 1985).
- f. Sulfato azul do Nilo para evidenciar lipídios ácidos e neutros (Cain 1947, Jensen 1962).

- g. Acetato de cobre/ ácido rubiânico para evidenciar ácidos graxos (Ganter & Jollés 1970).
- h. Reagente de Lugol para evidenciar amido (Johansen, 1940).
- i. Azul de Bromofenol, para evidenciar proteínas.
- j. Xylidine Ponceau, para evidenciar proteínas (Vidal, 1970).
- k. Azul brilhante de Comassie, para detecção de proteínas totais (Fisher 1968).

RESULTADOS

Anatomia da semente e substâncias de reserva encontradas.

Caracterização morfo-anatômica da semente madura

O envoltório da semente é constituído por uma camada de células lignificadas, dispostas em paliçada e recobertas por uma espessa cutícula. Logo abaixo desta camada, encontra-se de uma a duas camadas de células parenquimáticas amassadas, de conteúdo aparentemente fenólico e/ou lipídico. Abaixo desta camada, há outra composta por células grandes, de parede delgada e conteúdo lipídico, seguida por camadas de células amassadas, também com compostos fenólicos e/ou lipídeos (**figura 10**).

A semente de *Hedychium* é albuminosa e apresenta como tecidos de reserva: perisperma, endosperma e embrião, que diferem quanto a estrutura celular e composição química (**figuras 9 e 10**).

O perisperma apresenta várias camadas de células alongadas, no sentido radial, de parede delgada, cuja reserva é constituída apenas de amido em grande quantidade, quando comparada com endosperma e embrião. O endosperma é formado por várias camadas de células isodiamétricas de parede delgada, contendo como reserva grãos de amido, ácidos graxos e proteínas (e.g. **figura 11A, C, E, H, J-N**).

O embrião do tipo linear ocupa cerca de $\frac{1}{4}$ da semente e apresenta-se em posição axial (**figura 9**). A germinação é do tipo criptocotiledonar, ou seja, o

cotilédone permanece encerrado na semente. As reservas encontradas no embrião foram amido, proteína e ácidos graxos, em menor quantidade em comparação ao encontrado no perisperma e endosperma (**figura 11B, D, F, I, N**).

Os resultados dos testes microquímicos aplicados nas sementes não embebidas, submetidas à normoxia hipoxia e anoxia, são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Resultado dos testes aplicados nos tecidos de reserva e envoltório da semente.

Teste aplicado	Substância evidenciada	Embrião				Perisperma				Endosperma			
		NE	N	H	A	NE	N	H	A	NE	N	H	A
Vermelho de rutênio	mucilagens ácidas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azul de alciano	mucopolissacarídeos ácidos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reação PAS	polissacarídeos gerais	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azul brilhante de Comassie	proteínas totais	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Azul de Bromofenol	proteínas	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Xylidine Ponceau	proteínas	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Vermelho de Sudão IV	lipídios totais	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Preto de Sudão B	Lipídios totais	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato azul do Nilo	lipídios ácidos e neutros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato de cobre/ácido rubiânico	ácidos graxos	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Reagente de Lugol	amido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = substância detectada; - =substância ausente; NE = semente não embebida; N=normoxia; H=hipoxia; A= anoxia.

Mobilização sob condições normais de disponibilidade de oxigênio durante a germinação

Sementes recém-germinadas apresentam pouca ou nenhuma mobilização de grãos de amido dos tecidos de reserva para o embrião (**figura 12 A-H**) porém, em estágio mais avançado (quando é atingida a fase de plântula de 2cm de altura), essa mobilização se torna bastante evidente, principalmente em relação ao perisperma (**figura 15A-E**). Com base nos resultados dos testes realizados para evidenciar ácidos graxos, há indícios de que ocorre, em pequena proporção, a mobilização desta substância do endosperma para o embrião ao longo do processo germinativo (**figura 12 O**), pois os resultados obtidos mostraram que não havia ácidos graxos no embrião da semente não embebida. Para as sementes não embebidas, apenas no endosperma houve reação positiva indicando presença de ácidos graxos (**figura 11J**). Também são visualizadas proteínas nas células do cotilédone nas sementes observadas na fase de plântula (**figura 15F-J**). Ao redor do eixo hipocótilo-radicular, são visíveis corpos lipídicos, contendo ácidos graxos.

Mobilização das reservas em sementes germinadas sob hipoxia

Sob hipoxia, foi estudado apenas o estágio de “semente recém-germinada”. É possível notar a mobilização de amido para o embrião, proveniente parcialmente do perisperma, mas também do amido presente no endosperma (**figura 13A-E**). Algum conteúdo protéico também poderia ser interpretado como mobilizado para o embrião, apenas com base nas lâminas observadas (**figura 13 F-K, M**).

As sementes colocadas sob anoxia

Sob anoxia, embora em algumas repetições do experimento houvesse ocorrido a protrusão da radícula, não ocorre mobilização visível das reservas do perisperma, como nas situações de normoxia e hipoxia. Os cortes mostram as estruturas de modo muito parecido ao apresentado nas sementes não embebidas (que não foram colocadas para germinar). No entanto, em relação à densidade de grãos de amido observada nas outras situações, houve uma redução no caso das

sementes submetidas à anoxia (**figura 14 A-E**). Poderíamos, então, inferir que ocorre o início da germinação, mas com a utilização de reservas provenientes de outra parte da semente, diferentemente do processo de germinação sob condições normais de oxigenação, embora a protrusão da radícula aparentemente tenha ocorrido devido ao alongamento celular após a entrada de água. Aparentemente, a semente morreu antes de finalizar a germinação. A presença de um forte odor também indica que foi iniciado algum processo metabólico, corroborando o resultado observado nas lâminas, mas que devido ao tempo prolongado de exposição à anoxia, levou os propágulos à morte.

DISCUSSÃO

A mobilização das reservas da semente para o embrião ao longo do processo de germinação tem sido mais bem estudada para espécies de poucos grupos, mais notadamente o das gramíneas, sendo estudados preferencialmente os mecanismos adotados por aquelas que têm aplicação e valor comercial (Bewley 1997). Espécies invasoras são pouco estudadas com relação a estes aspectos.

Hedychium apresenta o tegumento formado por células de conteúdo lipídico. Isto indica que a entrada de água deve ocorrer a partir da micrópila. Em muitas espécies, o tegumento, além da função de proteção durante a dispersão, já bem documentada, apresenta também a função de armazenagem e regulação futura das reservas (Murray 1988).

São encontrados na semente madura de *Hedychium* os dois tipos de tecidos de reserva, endosperma e perisperma, em conformidade com relatos na literatura mencionando a ocorrência simultânea dos dois tipos de tecido em espécies de monocotiledôneas, incluindo estudos com a família Heliconiaceae (Simão *et al.* 2006) e com a própria família Zingiberaceae (Liao & Wu 2000). Estes tecidos têm diferentes origens embrionárias, durante o desenvolvimento da semente, e, portanto, podem ser compostos por diferentes substâncias, e em diferentes proporções, de acordo com a espécie em questão. O perisperma, na

maioria das espécies, é derivado do tecido nucelar materno, e acaba por ser absorvido conforme o embrião amadurece. Poucas espécies o apresentam como um tecido persistente de reserva. Algumas espécies apresentam simultaneamente o endosperma e o perisperma, em diferentes proporções (Bewley & Black 1994). A maneira como os nutrientes são transferidos ao embrião dependem das estruturas do saco embrionário desenvolvidas enquanto a semente é formada e pode ser relacionada ao número de sinérgides, ao suspensor, ao endosperma celular ou nuclear e ao “endosperma líquido” (Murray 1988). A primeira divisão mitótica do zigoto dá origem ao embrião, propriamente dito e ao suspensor. Este último assume o papel de posicionar o embrião de maneira que este se encontre em condição nutricionalmente favorável (Bhalla *et al.* 1981).

O endosperma pode ser desenvolvido de duas maneiras em angiospermas: seguindo um padrão celular ou nuclear. O segundo padrão é classificado em 3 tipos. O primeiro, é endosperma formado e retido como um órgão de reserva na semente madura. O segundo é um tecido que se forma, porém é substancialmente degradado até o momento em que o embrião encontra-se formado e maduro. E no terceiro, as divisões nucleares são terminadas precocemente (Murray 1988). Em castanha o perisperma desenvolve-se primeiro como um tecido de reserva. Então o endosperma se desenvolve enquanto o perisperma senesce (Hawker & Buttrose, 1980). A espécie aqui estudada apresenta o endosperma bem desenvolvido na semente madura. Entretanto, o perisperma é o que parece suprir a demanda inicial por energia para o embrião durante a germinação, pois é visível sua degradação quando comparado nos três estágios analisados. Os processos que ocorrem após a emergência da radícula, como a mobilização da maior parte das reservas, não fazem parte da germinação, propriamente dita, sendo eventos classificados como pós-germinativos (Bewley & Black 1994).

De modo geral, as reservas de carboidratos, de lipídios e de proteínas são utilizadas na constituição de componentes estruturais no crescimento da plântula (Ziegler 1995), e os carboidratos que se encontram pré-formados nas sementes atuam como substrato para a respiração no período anterior ao início da

germinação (Bewley & Black 1994).

Algumas sementes possuem como principal material de reserva estoques de carboidratos, outras, armazenam como principal reserva corpúsculos protéicos e outras ainda são essencialmente lipídicas, por armazenarem energia na forma de óleos e ácidos graxos. A espécie estudada aqui possui carboidratos como principal reserva, sendo o amido o mais comum. Embora também tenha apresentado porções consideráveis de proteínas e também conterem ácidos graxos, baseado nos resultados dos testes, estas não parecem ser suas principais fontes energéticas para o início do desenvolvimento da plântula. Seria o mesmo caso de sementes de cereais com o milho e o arroz, por exemplo.

A diferença observada quanto à estrutura do amido nos dois tecidos estudados pode ser explicada por características estruturais dos amidos. O amido é composto por uma mistura de dois polissacarídeos, a amilose e a amilopectina. O primeiro é essencialmente linear, enquanto o outro é bem ramificado. Embora a proporção entre amilose e amilopectina seja mais ou menos semelhante na maioria dos amidos (25% para a primeira e 75% para a segunda), podem também ocorrer variações, de acordo com a espécie. Cada espécie que apresenta amido em suas sementes, também guarda características que permitem, inclusive, sua identificação botânica, relativas ao desenho das estrias, aos tamanhos e formas típicas de cada grão, também podendo ser estas características específicas para cada tecido. A reação da amilose com o iodo do reagente "Lugol", resulta numa coloração azul escuro. Já a amilopectina, em reação com o iodo, propicia o aparecimento da cor azul violácea ou púrpura. A amilose é mais hidrossolúvel que a amilopectina, devido à sua estrutura molecular (Ring *et al.* 1993).

A principal diferença entre a mobilização das reservas do endosperma e das reservas do embrião é que o tecido endospermico geralmente está morto na ocasião em que o grão se encontra maduro e as reservas são quebradas por enzimas sintetizadas pela camada de aleurona ou pelo próprio embrião (Ring *et al.* 1993).

O embrião é compreendido como o eixo embrionário e um ou dois cotilédones. O eixo embrionário inclui a radícula, o hipocótilo e os primórdios

foliares (plúmula). Em dicotiledôneas, estas partes são facilmente discernidas, porém em monocotiledôneas, identifica-las é um pouco mais difícil (Bewley & Black 1994). Sementes endospermicas freqüentemente apresentam cotilédones bastante delgados, que ocupam pouco espaço na semente madura, ao contrário de espécies que não apresentam endosperma e utilizam os cotilédones como estrutura de armazenamento de reservas. *Hedychium* possui o cotilédone bastante reduzido.

Com base no estágio estudado para a condição de hipoxia, as diferenças não são tão acentuadas neste estágio de “semente recém-germinada” entre os dois tratamentos de disponibilidade de oxigênio. Muitas substâncias passam a ser mobilizadas para o embrião somente num estágio mais avançado do desenvolvimento, e não logo após a germinação. Porém, nota-se que há uma sutil diferença entre a densidade de amido no perisperma e no endosperma para cada situação. Em normoxia, a primeira reserva utilizada é proveniente principalmente do perisperma, enquanto que sob hipoxia, também nota-se uma mobilização dos grãos de amido do endosperma. Em feijão de corda, num primeiro momento, ocorre síntese de proteínas no eixo embrionário, seguido pela diminuição no teor de proteínas no eixo embrionário, concomitantemente a um aumento do teor de aminoácidos (taxa de degradação de proteínas é maior que a de síntese, no início). A seguir, ocorre uma diminuição no teor de aminoácidos do eixo embrionário e aumento nos cotilédones, representando síntese de aminoácidos nos cotilédones devido às atividades enzimáticas e incorporação de aminoácidos em moléculas estruturais no eixo embrionário, resultando em crescimento (Bezerra *et. al.* 2003). Em relação ao amido, também observado por Bezerra *et. al.* 2003 no estudo com feijão de corda, na fase inicial da germinação, uma parte do amido é translocado dos cotilédones após hidrólise e sintetizado no eixo embrionário. Não existe amido no eixo embrionário de sementes quiescentes, segundo Xavier Filho (1988). A seguir, parte do amido do eixo é degradado em açúcares e utilizado na respiração. Ocorre então, uma leve diminuição no teor de amido dos cotilédones, sendo que nos eixos, esse teor mantém-se, indicando que

o que é consumido pelo embrião é repostado por translocação do que está no cotilédone. Não existe atividade hidrolítica das substâncias de reserva em cotilédones intactos antes da emergência da radícula (Bewley & Black 1994) e a taxa de degradação do amido é baixa nos primeiros estágios da germinação (Juliano & Varner 1969; Monerri et. al. 1986).

As imagens sugerem de que de fato ocorre um padrão diferenciado da mobilização das reservas, em relação ao perisperma e ao endosperma, de acordo com a disponibilidade de oxigênio no momento da germinação. A hipótese de que poderia haver alguma adaptação envolvendo uma diferenciação na utilização destas reservas deveria ter sido testada também através de outros métodos, quantitativos, preferencialmente, a fim de confirmar essa observação qualitativa. As fases estudadas não foram suficientes para descrever com maior nível de detalhamento este processo, por terem envolvido apenas o período muito inicial do desenvolvimento, ocasião em que boa parte das reservas segue intocada. Porém, os resultados observados abrem caminho para que novas investigações sejam iniciadas, neste sentido. Buckeridge *et al.* (2004) relata os passos envolvidos na mobilização das reservas, o que em breves linhas inicia-se com a embebição da semente, e segue com a produção e/ou ativação de enzimas já presentes e reações catalíticas, de modo ordenado e programado, ocorrendo de acordo com a posição das células que as contém. As mais próximas aos feixes vasculares são as primeiras a serem utilizadas, e esta ordenação tem relação com os processos de morte programada dos tecidos vegetais. Os processos de ativação e inativação de determinados tipos de enzimas, possivelmente são influenciados pela atmosfera que envolve as sementes. As privações de oxigênio, segundo as imagens obtidas, sugerem que reservas normalmente deixadas para fases posteriores sejam mobilizadas no lugar de outras, como uma estratégia alternativa da espécie para que alcance maior rendimento energético, sob esta situação, ou como uma maneira de contornar problemas ocasionados pela inativação de alguma enzima regulatória no decorrer da germinação sob anoxia. (Relembrando que o amido presente no endosperma é de qualidade diferenciada daquele encontrado no perisperma, portanto, infere-se que possivelmente é

mobilizado através de mecanismo distinto.). Dada a lacuna encontrada pela não aplicação de outros tipos de métodos de análise, neste momento, com o presente trabalho realizado, é possível apenas inferir que há uma diferença no padrão de mobilização das reservas de acordo com a condição sob a qual a semente germina, mas sem descrevê-las de maneira detalhada.

Em milho, portanto uma monocotiledônea como *Hedychium*, condições de alagamento do solo costumam ser bastante restritivas, porém já foram estudadas variedades tolerantes à situação de hipoxia quando em presença de cálcio no solo por ocasião da germinação de suas sementes (Vitorino 1999, Dantas *et al.* 2001, Alves *et al.* 2002). Verificou-se que este elemento atua na estrutura da parede celular, diminuindo os danos desencadeados pelo estresse de oxigenação, prevenindo o afrouxamento da parede celular, embora provoque uma diminuição no tamanho alcançado pelas plântulas (Dantas *et al.* 2001). Uma das variedades, chamada de “saracura”, apresenta um mecanismo de tolerância observado por Alves *et al.* (2002) que envolve estratégias morfológicas, como a formação de aerênquimas de tipo lisígeno tanto na parte aérea como nas raízes (Alves *et al.* 2002), e bioquímicos, como estudado por Sachs *et al.* (1980) em raízes primárias de plântulas de milho, que observou nas duas primeiras horas de estresse anaeróbico, a ocorrência de forte repressão da síntese de proteínas aeróbicas, acompanhada de progressiva indução da síntese de 20 polipeptídeos anaeróbicos. A maioria desses polipeptídeos tem sido identificada como sendo enzimas envolvidas na glicólise ou no metabolismo dos açúcares-fosfato, e enzimas envolvidas com o processo de afrouxamento de parede celular, como a xyloglucano *Endo*-transglicosidase, celulase e poligalacturonase (Peschke & Sachs 1994; He *et al.* 1996 e Dantas *et al.* 2001).

A morte dos propágulos após a protrusão da radícula sob a condição de anoxia condiz com o resultado obtido para as plantas adultas desta espécie, observados por Joly & Brandlê (1995), que apresentou tolerância dos rizomas a anoxia por até 15 dias, seguida pela morte da planta após este período. Isto demonstra que esta espécie, assim como a variedade de milho “saracura”, por exemplo, tolera apenas curtos períodos de anoxia e que esta característica

apenas lhe confere uma vantagem adaptativa em relação àquelas espécies que são intolerantes a esta condição, provocada pelo alagamento do solo.

Considerações finais

Seriam necessários novos estudos para determinar com maior precisão e clareza as diferenças no padrão de mobilização das reservas quando as sementes germinam sob condições de restrição de oxigênio, pois a maior parte das substâncias é mobilizada apenas em eventos pós-germinativos, no momento de estabelecimento da plântula. Portanto, seria necessário realizar o acompanhamento e as comparações entre os tecidos remanescentes das sementes germinadas sob as diferentes disponibilidades de oxigênio, enquanto estes estivessem ainda aderidos às plântulas, quando estas já se encontrassem mais desenvolvidas, a fim de tornar possível a visualização da mobilização das reservas com maior clareza e detalhamento.

Em face do resultado obtido para a condição de anoxia estudada, uma sugestão seria para que outros períodos, inferiores aos 30 dias testados, fossem também observados.

Embora estes resultados não sejam conclusivos a respeito da forma como se dá a alteração no padrão de mobilização das reservas, o presente trabalho sugere um caminho interessante para o estudo da capacidade de germinar sob anoxia para esta espécie. De acordo com o observado no material estudado, a condição de anoxia não é tolerada pela espécie pelo período estudado, que foi de 30 dias. A diferença na mobilização da reserva do endosperma, aliada à semelhança das imagens obtidas para as sementes não embebidas em relação aos demais tecidos, indica que a morte destes propágulos se deu num período bastante curto, possivelmente antes mesmo de ocorrer a protrusão da radícula, que pode ter sido continuada por um fenômeno físico e não fisiológico. Esta é a razão pela qual acredita-se que, mesmo sob condição de ausência de oxigênio, ocorra o início do processo germinação de *Hedychium*.

DISCUSSÃO GERAL

Conforme já foi visto, no primeiro capítulo, o trabalho demonstrou que a espécie tem como características, em relação à germinação, melhor desempenho sob condições de boa drenagem e aeração, mas que possui mecanismos para germinar sob condições de restrição de oxigênio, de acordo com o observado no segundo capítulo. Sob normoxia, cerca de 80% das sementes recém-coletadas germinaram, contra cerca de 30% em condição de hipoxia. A velocidade de germinação também foi bastante afetada sob restrição de oxigênio, sendo bastante inferior à observada em normoxia. Sob anoxia, apenas 2% das sementes iniciaram o processo de germinação quando recém-coletadas. Porém, com um mês de armazenamento, a taxa de germinação sob anoxia aumentou sensivelmente para cerca de 20%. Este fato poderia ser explicado pela possibilidade de a semente com mais idade apresentar espaços em seu interior, formados pela perda de água devida à dessecação, que poderiam, de alguma forma, guardar pequenas quantidades de ar e facilitar a germinação destas, em relação às sementes mais frescas. No entanto, esta seria apenas uma suposição, pois não foi realizado nenhum procedimento que permitisse verificar a existência de tais espaços gerados pela perda de umidade no interior da semente.

É uma espécie indiferente à luz para germinar, sendo considerada uma semente fotoblástica neutra. Quanto à temperatura, foi observada uma diminuição na velocidade de germinação quando expostas à temperatura equivalente à que ocorre no inverno (estação mais fria e seca, em Ubatuba, onde foram coletadas), mas a taxa de germinação final não diferiu estatisticamente daquelas que germinaram sob temperaturas mais altas, como as que ocorrem no restante do ano. A longevidade dos propágulos se manteve relativamente alta por cerca de um ano após a dispersão, demonstrando uma tendência à queda no decorrer deste período. Isto pode ser interpretado como um indício de que a espécie possa compor o banco de sementes até que ocorra um novo evento de dispersão. A viabilidade das sementes recém-coletadas, demonstrada pelo teste de tetrazólio, está de acordo com o observado na prática, quando estas foram postas para germinar sob condições normais de aeração e temperatura de 25° C +- 2° C.

No segundo capítulo, foi verificado que a principal substância de reserva das sementes de *Hedychium* é composta por amido. A semente possui dois tecidos de reserva e que estes diferem entre si quanto à composição. O perisperma é formado por amido e o endosperma contém amido e proteínas. A estrutura do amido do perisperma difere da estrutura do amido presente no endosperma. Os diferentes tratamentos de disponibilidade de oxigênio demonstraram que existe um padrão diferenciado de mobilização do amido para o embrião em cada situação, ainda que as sementes tenham morrido devido ao tempo excessivo de exposição à atmosfera anaeróbica, que foi de 30 dias, neste estudo. A mobilização do amido presente no endosperma das sementes que foram submetidas à anoxia comprova a capacidade destas de germinar em ausência de oxigênio, de acordo com o que foi observado nos testes de germinação do primeiro capítulo e inclui o *Hedychium* no restrito rol de espécies capazes de germinar sob ausência de oxigênio.

ILUSTRAÇÕES

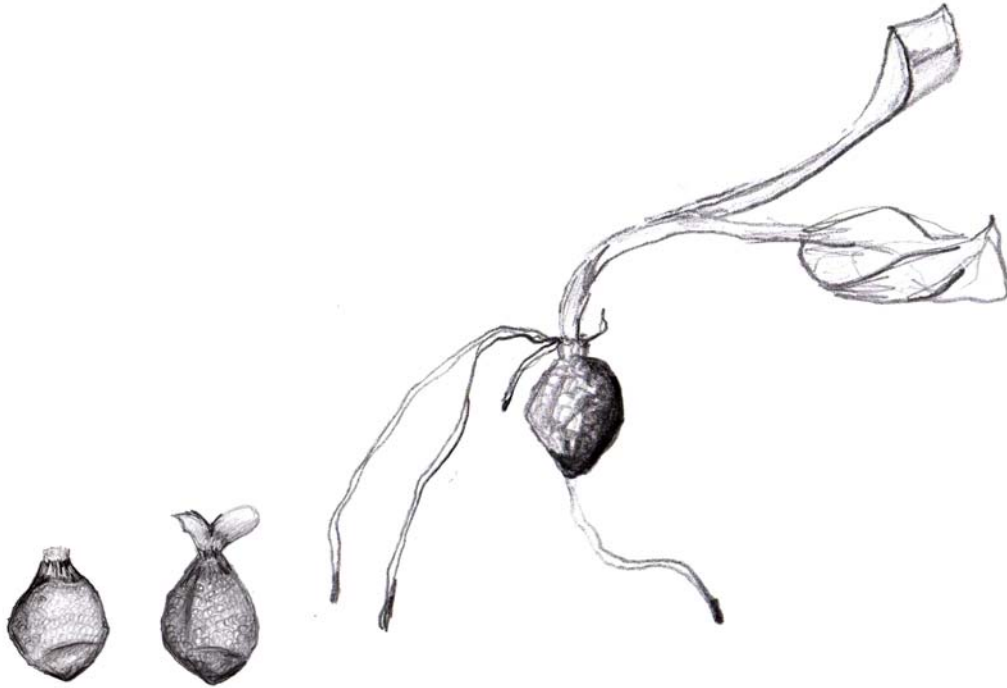


Figura 8: Desenhos dos estágios de desenvolvimento estudados: a) semente não embebida, b) semente recém-germinada e c) restos da semente aderida à plântula.

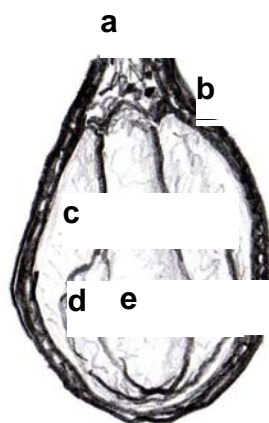


Figura 9: Desenho da semente sob corte transversal. a) micrópila, b) tegumento, c) perisperma, d) endosperma, e) eixo embrionário.

(Desenhos das figuras 8 e 9 feitos por Tiago Brito)

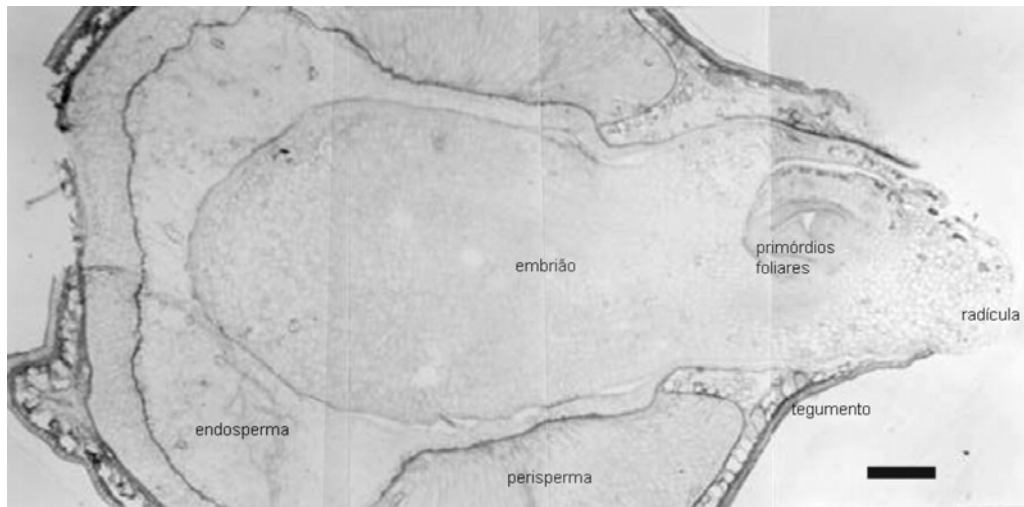


Figura 10: Estrutura da semente durante a germinação (sob condições normais de oxigenação). Barra = 70 μm .

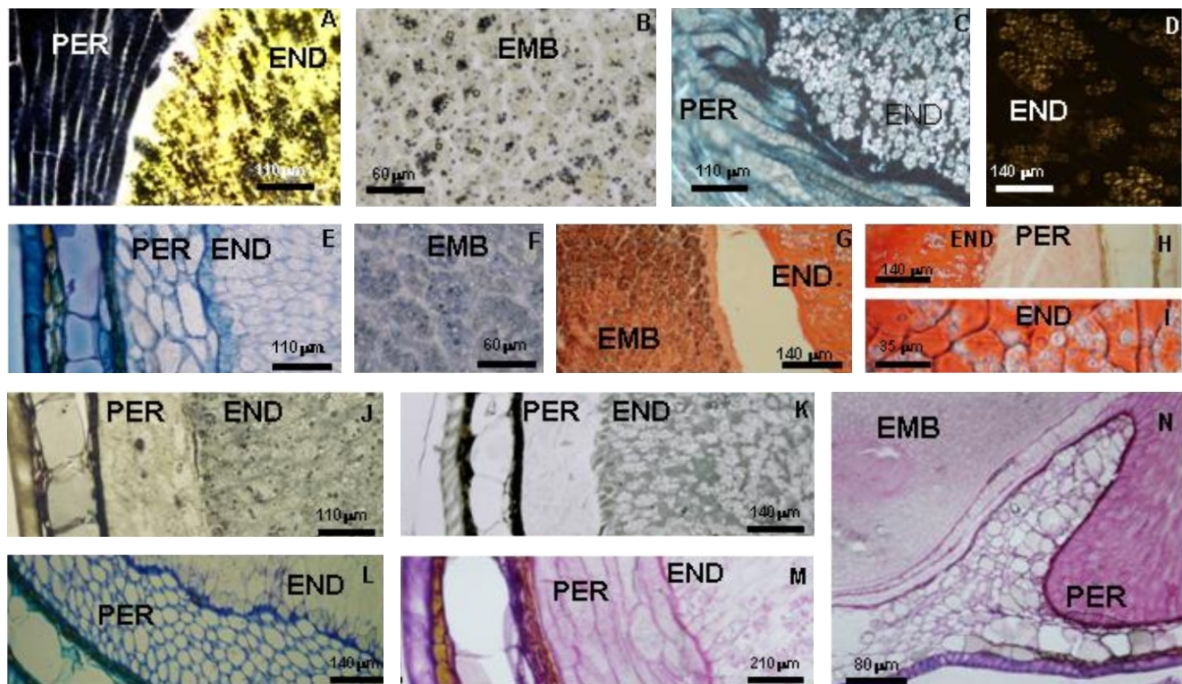


Figura 11: Sementes não embebidas. **A e B:** coloração com Lugol. **C e D:** uso de luz polarizada. **E:** coloração com Sulfato Azul do Nilo. **F:** coloração com Azul Brillhante de Comassie. **G, H e I:** coloração com Xylydine Ponceau. **J:** coloração com Sudan Black. **K:** coloração com acetato de cobre e ácido rubiânico. **L:** coloração com Azul de Toluidina. **M e N:** Reação de PAS. **PER** = perisperma, **END**= endosperma, **EMB**= embrião.

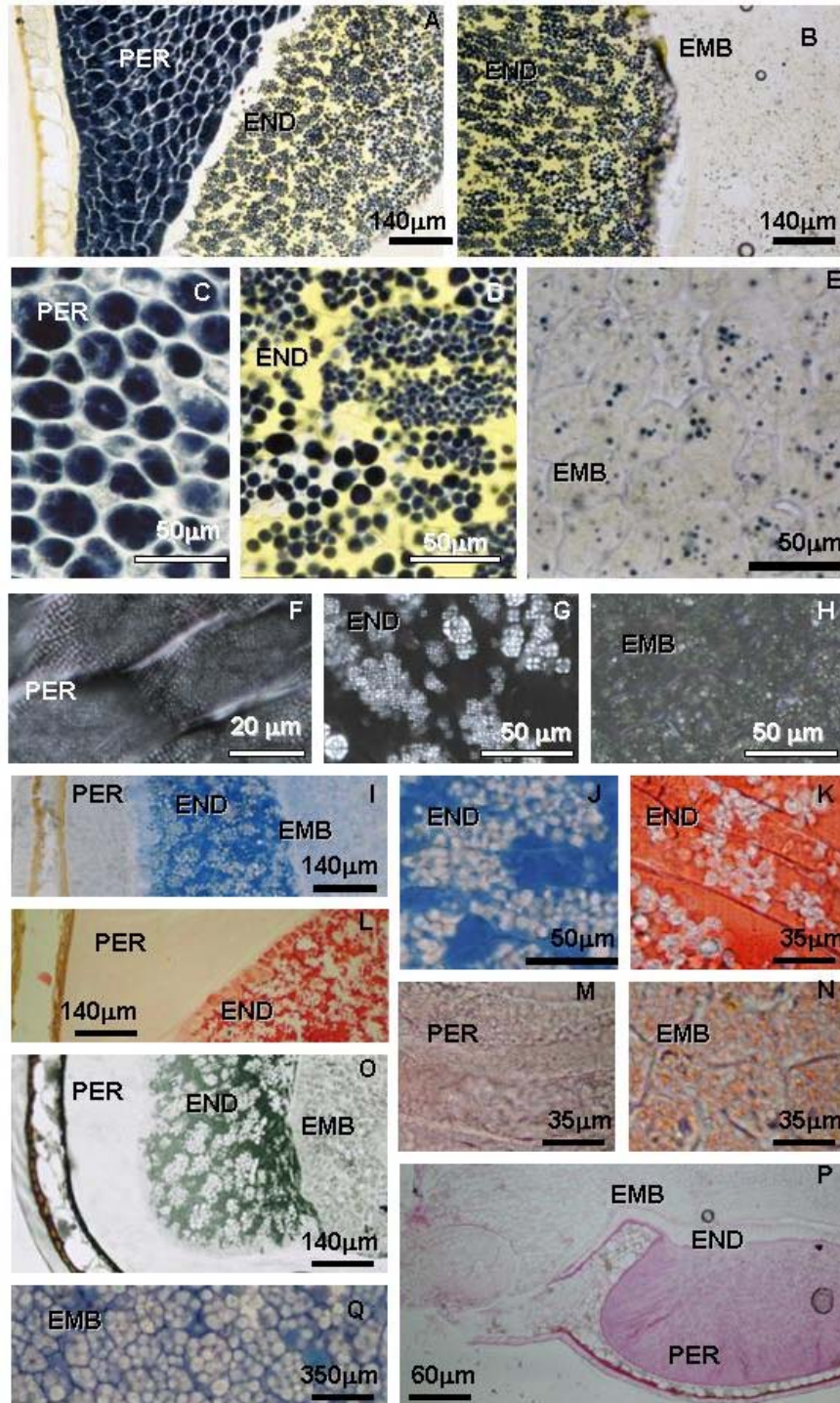


Figura 12: Sementes recém-germinadas sob condições normais de oxigenação (normoxia). **A – E:** Lugol. **F - H:** luz polarizada. **I e J:** Azul de Bromofenol. **K – N:** Xyloidine Ponceau. **O:** Acetato de cobre e ácido rubiânico. **P:** Reação de PAS. PER= perisperma, END= endosperma, EMB= embrião.

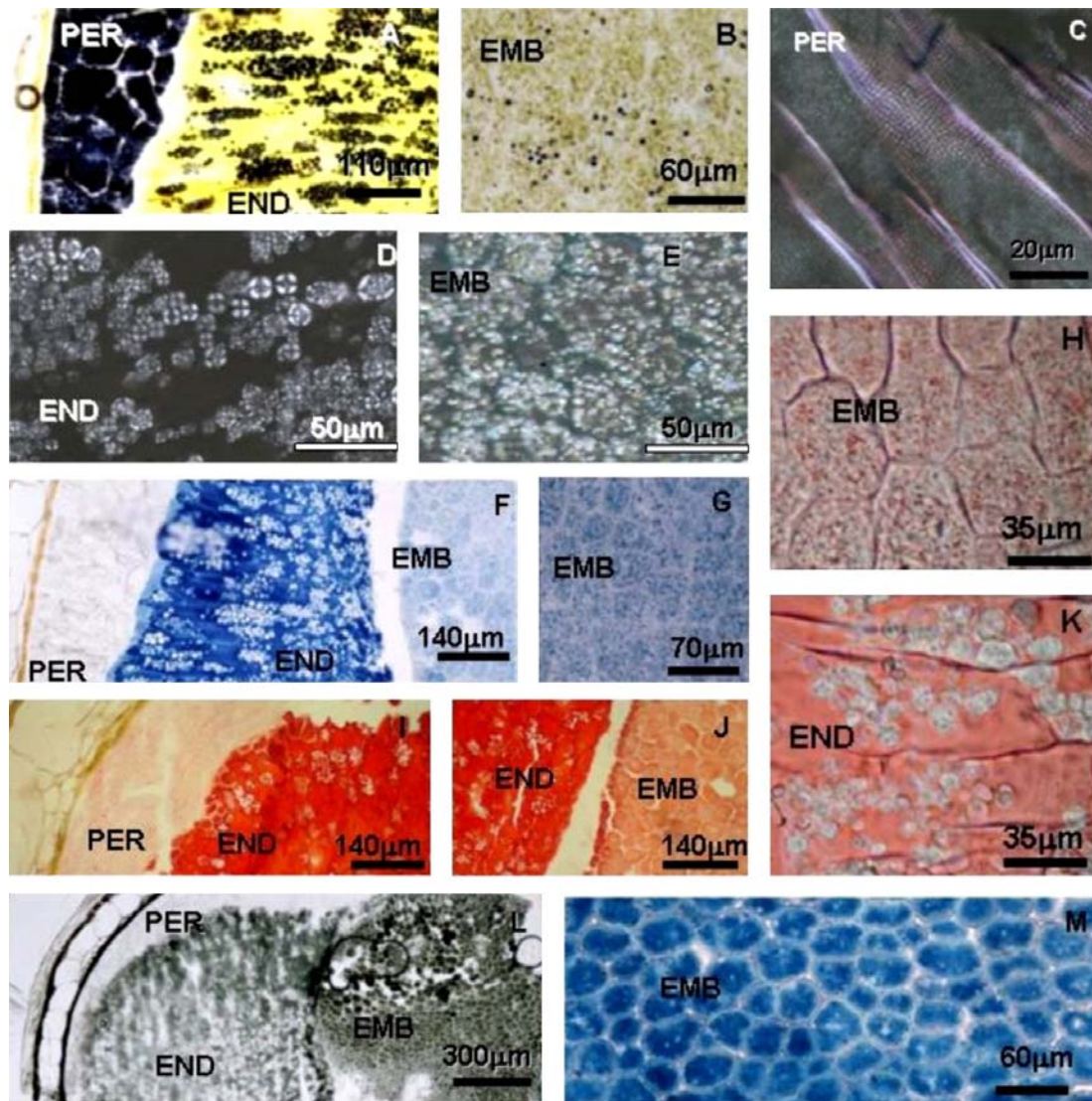


Figura 13: Sementes recém-germinadas sob hipoxia. **A e B:** Lugol. **C - E:** luz polarizada. **F e G:** Azul de Bromofenol. **H - K:** Xylidine Ponceau. **L:** Acetato de cobre e ácido rubiânico. **M:** Sulfato Azul do Nilo. PER= perisperma, END= endosperma, EMB= embrião.

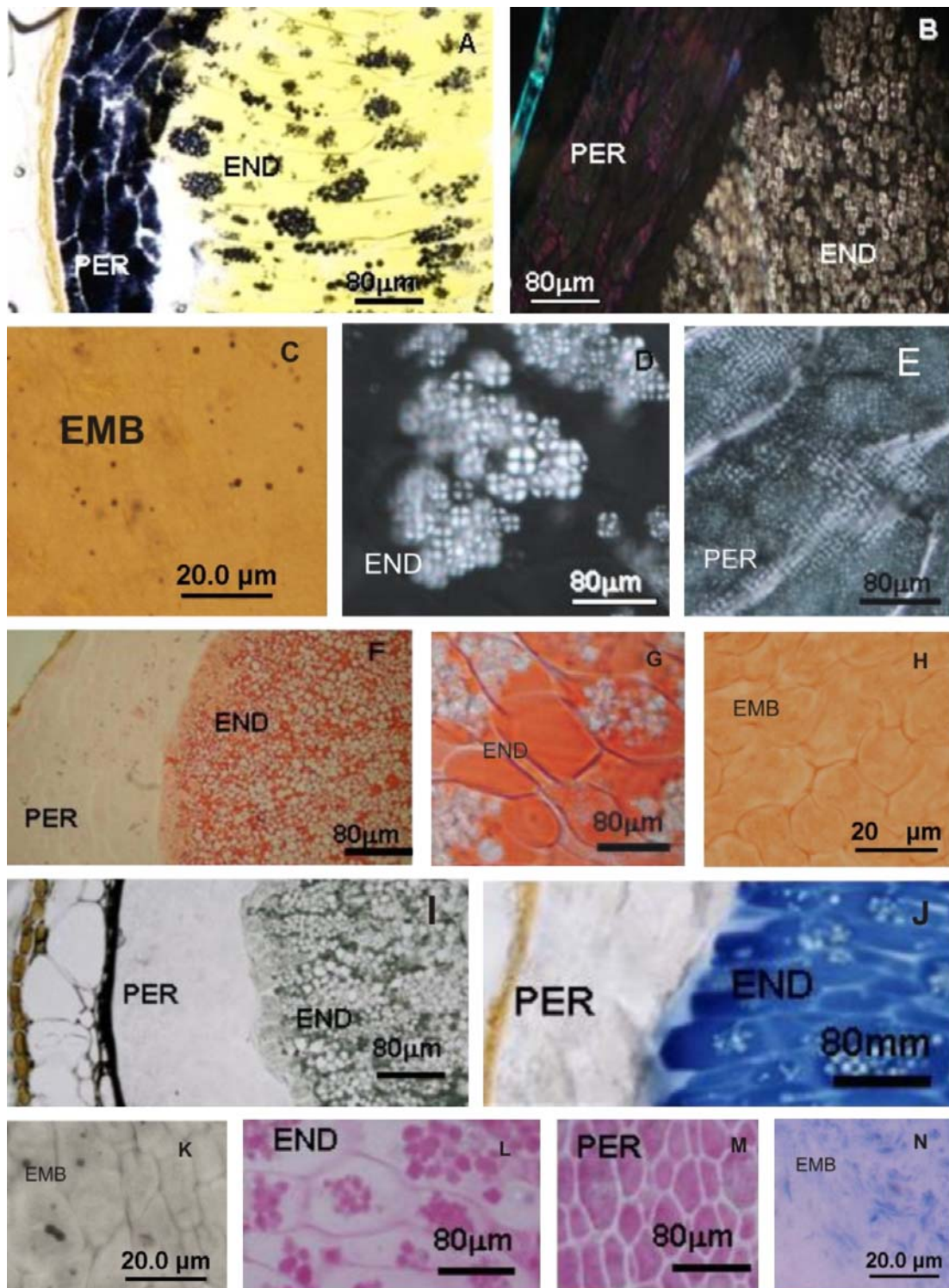


Figura 14: Sementes recém-germinadas sob condição de anoxia. **A e C.** Lugol. **B, D e E:** Luz polarizada. **F- H:** Xylidine Ponceau. **J e N:** Azul de bromofenol. **I e K:** acetato de cobre e ácido rubiânico. **L e M:** Reação de PAS. PER= perisperma, END= endosperma, EMB = embrião.

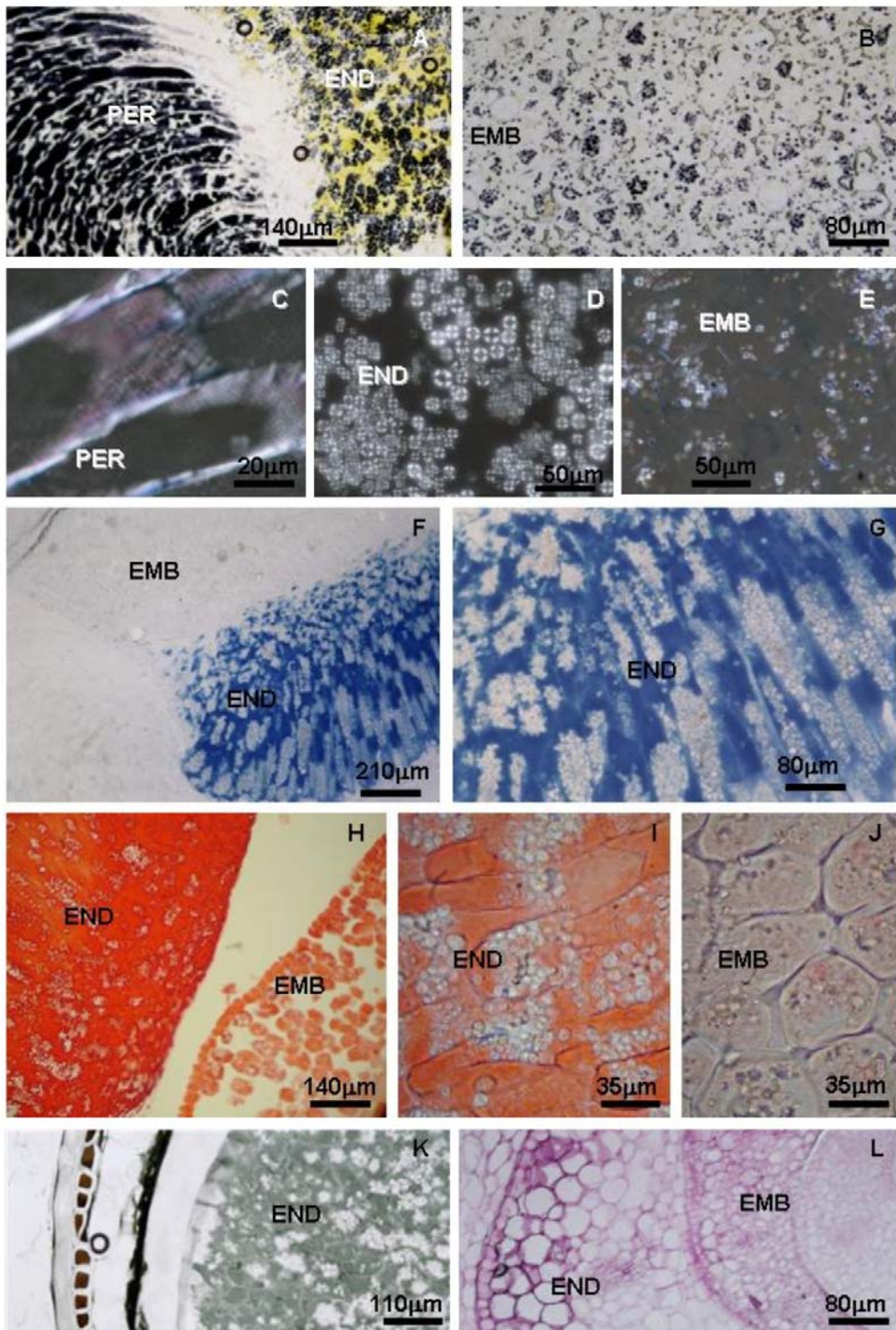


Figura 15: Estágio mais avançado de desenvolvimento: restos dos tecidos das sementes aderidas às plântulas, desenvolvidas sob condições normais de oxigenação (normoxia). **A e B:** Lugol. **C – E:** luz polarizada. **F e G:** Azul de bromofenol. **H – J:** Xylidine Ponceau. **K:** Acetato de cobre e ácido rubiânico. **L:** Reação de PAS. PER= perisperma, END= endosperma, EMB= embrião.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, R.N.B. & FERREIRA, A.G. 2000. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) - Myrtaceae. *Revista Brasileira de Sementes* 22(2): 118-125.
- ALBRECHT, J.M.F.; ALBUQUERQUE, M.C.F.E. & SILVA, M.V.F. Influência da temperatura e do tipo de substrato na germinação de sementes de cerejeira. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.8, n.1, p.49-55, 1986.
- ALVES, J. D. , MAGALHÃES, M.M., GOULART, P. F. P., DANTAS, B. F., GOUVÊA , J. A., PURCINO, R.P., MAGALHÃES, P. C., FRIES, D. D., LIVRAMENTO, D. E., MEYER, L. E., SEIFFERT, M. & SILVEIRA, T. 2002. Mecanismos de tolerância da variedade de milho "saracura" (BRS 4154) ao alagamento. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.1, n.1, p.41-52.
- BARROSO, G. A, MORIM, M. P., PEIXOTO, A L. & ICHASO, C. L. F. 1999. Frutos e Sementes - Morfologia Aplicada à sistemática de Dicotiledôneas. Viçosa-MG: Ed. da UFV.
- BEWLEY, J. D. 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, Vol. 9, 1055-1066, American Society of Plant Physiologists
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1994. *Seeds: physiology of development and germination*. 2ed. New York: Plenum Press, 445p.
- BEZERRA, M. A., ALVES, J.D., OLIVEIRA, L. E. M. de & PRISCO, J.T. 2003. Caracterização morfológica e mobilização de reservas durante os estágios iniciais de desenvolvimento de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Revista Ciência Agronômica*, v. 34, p. 253-259.

- BHALLA, P. L., SING, M. B. & MALIK, C. P. 1981. Studies on the comparative biosynthetic activities of embryo and suspensor in *Tropaeolum majus* L. Z. Pflanzenphysad. 103, 115-119.
- BORGES, I. D. 2003. *Avaliação de épocas de aplicação de cobertura nitrogenada, fontes de nitrogênio e de espaçamentos entre linhas na cultura do milho*. Lavras. Universidade Federal de Lavras. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). 73 p
- BORGES, E.E.L.& RENA, A.B. 1993. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B.de; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. & FIGLIOLIA, M.B. (coord.). *Sementes florestais tropicais*. Brasília: ABRATES, cap.3, p.83-135.
- BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H. P. dos; TINÉ, M. A. & AIDAR, M. P.M. 2004. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A G.; BORGHETTI, F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre:Artmed, 2004. p. 163-185.
- CABRAL, E.L.; BARBOSA, D.C. A. & SIMABUKURO, E.A. 2003. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (manso) Benth. e Hook. f. ex. S. Moore. *Acta Botanica Brasilica*, v.17, n.4, p.609-617.
- CAÇOLA, A. V.; AMARANTE, A. V. T. do; FLEIG, F. D. & MOTA, C. S. 2006. Qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze submetidas a diferentes condições de armazenamento e a escarificação. *Ciência Florestal*, Vol. 16, No. 4, p. 391-398.
- CAIN, A. J. 1947. The use of Nile blue in the examinations of lipids. *Quart. Jour. Microsc. Sci.*, 88:p. 383-394.
- CARNEIRO, J.W.P. & PIRES, J.C. 1983. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes de mamona. *Revista Brasileira de Sementes*, v.5, p.127-131.

- CORTE, V. B., BORGES, E. E. L.; PONTES, C. A.; LEITE, I. T. A. ; VENTRELLA, M. C. & MATHIAS, A. A. 2006. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Revista Árvore*, v. 30, p. 941-949.
- DANTAS, B.F.; ARAGÃO, C.A. & ALVES, J.D. 2001. Cálcio e o desenvolvimento de aerênquimas e atividade de celulase em plântulas de milho submetidas a hipoxia. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 58, p.251-257.
- FISHER, D. B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16:92- 96.
- GANTER, P. & JOLLÉS, 1970. G. Histochemie. Normale et Pathologique. 2v. Paris, Gauthier-Villars; GANT 611.018.
- GERRITS, P. O. & SMID, L. 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *J. Microsc.*, v. 132, n. 1, p. 81-85.
- GREGORY, M & BAAS, P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel J Bot* 38:125–174.
- HAWKER J. S. & BUTTROSE M. S. 1980. Development of the Almond Nut (*Prunus dulcis*(Mill.) D. A. Webb). Anatomy and Chemical Composition of Fruit Parts from Anthesis to Maturity *Annals of Botany* 46: 313-321.
- HE, C.J.; DREW, M.C.& MORGAN, P.W. 1996. Transduccion of ethylene signal required for cell death and lysis in teh root cortex of maize during aerenchima formation during hipoxia. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 112, p. 463-472.
- HOOKE, D.D. 1984. Adaptation to flooding with fresh water. *In Flooding and plant growth* (T.T. Kozlowski, ed.). Academic Press, London, p.265-294.

- JENSEN, W. A. 1962. *Botanical histochemistry*. San Francisco : W. H. Freeman and Company.
- JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. Mc Graw Hill, New York.
- JOLY, C. A. & BRÄNDLE, R. 1995. Fermentation and adenylate metabolism of *Hedychium coronarium* J. G. Koenig (Zingiberaceae) and *Acorus calamus* L. (Araceae) under hypoxia and anoxia. *Functional Ecology* 9(3): 505-510.
- JULIANO, B.O.& VARNER, J.E. 1969. Enzymic degradation of starch granules in the cotyledons of germinating peas. *Plant Physiology*, Rockville, v.44, p.886-892.
- KARUNAGARAN, D. & RAO, P.R. 1991. Mode and control of starch mobilization during germination of seeds of horse gram. *Plant Science*, Ireland, v.73, p.155-159.
- KISSMANN, K. G. & GROTH, D. 1991. "*Plantas invasoras e nocivas*". São Paulo: Basf. Brasileira. p.590 - 593.
- KRAMER, P.J. e T. KOZLOWSKI. 1979. *Physiology of Woody Plants*. New York, Academic Press. 811 p.
- LIAO, J-P. & WU, Q-G. 2000. A preliminary study of the seed anatomy of Zingiberaceae. *Botanical Journal of Linnean Society*. 134: 287-300.
- LORENZI, H. 1982. "*Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais*". Nova Odessa. 425 p.
- MACEDO, J. F. 1997. "O gênero *Hedychium* Koenig (Zingiberaceae) no Estado de Minas Gerais". *Daphne*, 7(2):27-31.
- MAYER, A. M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. 1975. *The germination of seeds*. 2. ed. Oxford: Pergamon Press Ltda., 192 p.
- McMANUS, J. F. A., 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* 23: 99–108.

- MONERRI, C.; GARCIA-LUIS, A. & GUARDIOLA, J.L. 1986. Sugar and starch changes in pea cotyledons during germination. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.67, p.49-54.
- MURRAY, D. R. 1988. *Nutrition of the Angiosperm Embryo*. Research Studies Press Ltd, Somerset, England.
- O'BRIEN, T. P., FEDER, N. & McCULLY, M. E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- OLIVEIRA, E. C. & PEREIRA, T. S. 1989. Germinação de algumas espécies de monocotiledôneas. *Acta Biologica Leopoldensia* 11 (1) 61- 86.
- PEARSE, R.S. 1985. A freeze-fracture study of the cell membranes of wheat adapted to extracellular freezing and to growth at low temperatures. *J. Exp. Bot.*
- PESCHKE, V.M. & SACHS, M.M. 1994 Characterization and expression of anaerobically induced maize transcripts. *Plant Physiology*, Bethesda, v.104, p 387-394.
- PIO CORRÊA, M. 1984. "*Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.*" Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Vol.6.
- PONTES, C. A. ; CORTE, V. B. ; BORGES, E. E. L. ; SILVA, A. G. & BORGES, R. C. G. 2006. Influência da temperatura de armazenamento na qualidade das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (sibipiruna). *Revista Árvore*, v. 30, p. 43-48.
- RING, S. G., NOEL, T. R. & BULL, V., J. 1993. The Structure of the starch polysaccharides and their organization in the starch granule. In: SHEWREY, P. R., & STOBART, K. (orgs) 1993. *Seed Storage Compounds – Biosynthesis, Interactions and Manipulations*. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. Oxford Science Press, Oxford.

- RODRIGUES, T.J.D.; RODRIGUES, L.R.A. & REIS, R.A. 1993. Adaptação de plantas forrageiras às condições adversas. In: *SIMPÓSIO SOBRE ECOSSISTEMA DE PASTAGENS*, 2., Jaboticabal, 1993. *Anais...* Jaboticabal: FUNEP, p.17-61.
- SACHS, M.M.; FREELING, M. & OKIMOTO, R. 1980. The anaerobic protein of maize. *Cell*, Cambridge, v.20, p.761-767.
- SIMAO, D.G., SCATENA, V. L. & BOUMAN, F. 2006. Developmental anatomy and morphology of the ovule and seed of *Heliconia*. (Heliconiaceae, Zingiberales). *Plant Biology* 8 (1): 143- 154.
- VAN DER PJIL, L. 1982. *Principles of dispersal in higher plants*. Berlin, Springer-Verlag, 3rd ed., 214p.
- VIDAL, B. C. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. *Annales D'histochimie*, Paris, v. 15, p. 289-293.
- VITORINO, P.G. 1999. *Caracterização da tolerância da variedade de milho Saracura-BR 154 a hipoxia, efeito do cálcio e modificações de parede celular*. 49 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- XAVIER FILHO, J. 1988. Estudos bioquímicos desenvolvidos com caupi. In: ARAÚJO, J.P.P. & WATT, E.E. (Org.). *O caupi no Brasil*. Brasília: IITA/ EMBRAPA, cap.23, p.679-693.
- ZIEGLER, P. 1995. Carbohydrate degradation during germination. Pp.447-474. In. KIGEL. J. & GALILI, G. (eds) *Seed development and germination*. Marcel Dekker Inc., New York.