

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**

**CONTEÚDO DE TOCOCROMANÓIS EM ESPÉCIES  
ARBÓREAS DE VÁRZEA DA AMAZÔNIA CENTRAL  
SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS**

**ASTRID DE OLIVEIRA WITTMANN**

Tese apresentada ao Programa Integrado de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em **BOTÂNICA**.

Manaus, AM

2007

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**

**CONTEÚDO DE TOCOCROMANÓIS EM ESPÉCIES  
ARBÓREAS DE VÁRZEA DA AMAZÔNIA CENTRAL  
SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS**

**ASTRID DE OLIVEIRA WITTMANN**

**Orientadora: Dra. Maria Teresa Fernandez Piedade**

**Co-orientador: Dr. Wolfgang Johannes Junk**

Tese apresentada ao Programa Integrado de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em **BOTÂNICA**.



Projeto INPA/Max-Planck de Cooperação Brasil-Alemanha

Manaus, AM

2007

W832 Wittman, Astrid de Oliveira

Conteúdo de Tococromanóis em Espécies Arbóreas de Várzea da Amazônia Central sob Condições Controladas/Astrid de Oliveira Wittmann. – Manaus: [s. n.], 2007. 126 p. : il.

Tese (doutorado) – INPA/UFAM, Manaus, 2007

1. Tococromanóis 2.  $\alpha$ -tocoferol 3. Fluorescência da clorofila *a*. 4. Espécies arbóreas 5. Várzea 6. Vitamina E. I. Título.

CDD 634.95

**Sinopse:**

Anualmente espécies arbóreas de Florestas Inundáveis da Amazônia Central sofrem estresse por alagamento durante longo período. No presente estudo foi realizado um *Scening* de vitamina E para 19 espécies arbóreas de várzea de modo a relacionar o poder antioxidante da vitamina E a posição ocupada pelas plantas no ambiente natural. Foi realizado ainda um experimento testando situações potencialmente estressantes de inundação artificial, supressão de luz e seca em três espécies sempre verdes, para medir tococromanóis, fluorescência de clorofila, anatomia da lâmina foliar e manutenção, perda e produção de folhas sob as condições controladas.

**Palavras-chave:** Tococromanóis 2.  $\alpha$ -tocoferol 3. fluorescência de clorofila 4. espécies lactescentes 5. várzea

## AGRADECIMENTOS

O trabalho de tese leva a autoria de uma só pessoa, mas além das instituições envolvidas, na verdade, muitas pessoas são co-autoras de um trabalho desta natureza e merecem ser reverenciadas. Assim, agradeço imensamente:

Ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais INPA/UFAM, especialmente à Coordenação e Secretaria do Curso de Botânica pelo apoio acadêmico que permite a realização deste curso.

Ao Programa CNPq/DAAD (Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico) por possibilitar a formação de recursos humanos de alto nível no exterior, bem como pela concessão das bolsas de estudos, curso de alemão (DAAD) e modalidade sanduíche (CNPq).

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), ao Projeto Inpa/Max-Planck, ao Instituto Max-Planck de Limnologia (MPIL) e à Universidade Christian Albrecht de Kiel (CAU), Alemanha, pelo suporte financeiro desta pesquisa.

À Diretoria de Ecossistemas do Departamento de Vida Silvestre do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), pela autorização de saída de material biológico do país. Licença sob número 0108128 BR.

À minha orientadora, Dra. Maria Teresa Fernandez Piedade pelos vários anos de caminhada juntas, desde o aperfeiçoamento até aqui. Mas, principalmente por ter despertado em mim o interesse pela ecologia e ecofisiologia das espécies arbóreas de áreas inundáveis.

Ao meu co-orientador Dr. Wolfgang Johannes Junk pelo apoio e incentivo de encarar dois invernos alemães pela busca de conhecimento sobre as espécies de florestas de várzea da Amazônia Central.

Agradeço especialmente ao Dr. Jon Falk por toda orientação antes e durante os experimentos com tococromanóis, pela paciência com meu alemão ruim, pelo apoio científico e pelo apoio estrutural concedido junto ao Departamento de Botânica, AG Biologia Molecular da Universidade de Kiel.

À Dra. Danielle Waldhoff pela discussão e ajuda com o desenho experimental, assim como pelas instruções sobre a utilização do Diving PAM 2000, e pelo apoio simpaticíssimo durante a realização dos experimentos na CAU.

À Dra. Karin Krupinska por me receber em seu grupo de trabalho na CAU, e por possibilitar minha participação nas valiosas discussões semanais do grupo de vitamina E.

À Dra. Christine Desel pela ajuda constante no dia a dia do laboratório, pelas dicas de uso do fotomicroscópio e lupas da universidade, além do incentivo para parte anatômica deste estudo.

À Dra. Gaby Andersen pelo treinamento na utilização do protocolo de extração de vitamina E.

Ao Dr. Jochen Schöngart por estar sempre disposto a discutir e dar qualquer ajuda.

Ao estudante de Biologia Pedro Simonini pela ajuda prestimosa durante a coleta de dados, tanta paciência com centenas e centenas de amostras (só mesmo um mineiro Uai!), foi mesmo uma ajuda inestimável.

Ao Técnico Jens Hermann, por toda ajuda e os ensinamentos com o HPLC, e outros equipamentos, por sempre dar um “jeitinho” alemão e consertar tudo que quebrava, nunca vi alguém trabalhar tanto e ao mesmo tempo ser tão bem humorado.

Aos doutores que fizeram parte da banca da aula de qualificação, por contribuírem com sugestões e críticas ao projeto: Angela Imakaua, Flávia Costa, Isolde Ferraz, Antônio Webber e Rogério Gribel.

Aos doutores que fizeram parte da banca avaliadora da tese: Antônio Carlos Siani, Cecília Verônica Nunez, Danielle Waldhoff, Fábio Rúbio Scarano, Marcos Silveira Buckeridge, Ricardo Antonio Marengo Mendoza e Sandra Colli, pela valorosa contribuição ao manuscrito, sugestões que servirão inclusive para futuras publicações.

À Rosvita Schreiner, pelos almoços diários na Mensa da Uni, onde discutíamos as teses e mais alguma coisa.

À Sammya D’Angelo pela ajuda em diferentes etapas deste trabalho, mas especialmente na fase final quando checou com tanta paciência as referências bibliográficas.

À Auristela dos Santos Conserva, por dividir o período inteiro de curso de doutorado, e principalmente as angústias do final de tese.

À Cristiane Ferreira que divide a sala e o estresse, que não é o “oxidativo”, mas o de final de tese, além de sempre discutir dúvidas e ajudar com arte nas figuras.

À Aline Lopes, por sofrer comigo durante a análise de dados e além disso, se preocupar com minhas perguntas estatísticas.

À Sônia Maciel da Rosa pela ajuda na interpretação e discussão sobre as estruturas anatômicas das fotos.

Aos colegas do Projeto Inpa/Max-Planck pela companhia diária que muitas vezes torna um dia pesado de trabalho em um dia divertido, Valdenei, Daniel, Robson, Maria Astrid, Joneide, Keilah, Josephina, Liene, Edivaldo, Teresinha, Nina e Araceli.

Aos técnicos do Projeto INPA/Max-Planck, a Conceição Lúcia Costa e Wallace Costa por estarem sempre dispostos a dar uma força quando é preciso, em especial ao Celso Rabelo Costa por resolver todos os “problemas” do projeto com a maior eficiência e satisfação.

Aos meus pais Celene Câmara de Oliveira e Pedro Rates de Oliveira (*in memoriam*), pelo amor que me dedicaram e por me ensinarem que a maior herança que alguém pode receber é a educação.

Aos meus irmãos, amigos e sobrinhos que estiveram na torcida de que tudo desse certo na trajetória de mais uma etapa profissional: Miguel Virgílio, Sigrid, Ma. Alice, Fábio, Nando, Anne, Neto, Adriane, Fabiana, Pedro, Ingrid, Gabriel, Lara e Victória.

Ao meu marido e companheiro Florian, por ter me apoiado nesta empreitada, estar sempre ao meu lado, e, além das discussões científicas, pela paciência durante os dias intermináveis na universidade, jamais teria conseguido sem o apoio irrestrito, o incentivo e o carinho que acompanharam este período.

À minha filha Sofia que muitas vezes sentiu a falta da mãe, em várias etapas do trabalho, mas especialmente na fase de redação desta tese, serei eternamente grata pelo carinho e pela paciência que demonstrou, só muito amor daqui pra frente pra compensar tanta ausência.

A Deus por me proteger diariamente, além de colocar pessoas e oportunidades maravilhosas ao longo de toda a minha vida.

*Ao Florian e a Sofia*

*Dedico*

## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xvi
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	xviii
<b>Capítulo 1.</b>	
<b>1. Descrição do Ambiente e Objetivo do Trabalho</b> .....	1
1.1 Descrição do Ambiente .....	1
1.2 A Sucessão em Ambientes de Várzea .....	3
1.3 Importância das Florestas de Várzea .....	3
1.4 Implicações dos Fatores Ambientais para a Vegetação .....	4
1.5 Efeito da Inundação Natural .....	5
1.6 Efeito da Inundação Artificial .....	6
1.7 Sistema Antioxidante .....	09
1.8 Vitamina E .....	11
1.9 Vitamina E & Espécies Arbóreas da Várzea .....	13
1.10 Objetivo do Trabalho .....	13
<b>Capítulo 2.</b>	
<b>2. Vitamina E &amp; Crescimento</b> .....	14
2.1 Introdução .....	14
2.2 Objetivos .....	16
2.2.1 Objetivo Geral .....	16
2.2.2 Objetivos Específicos .....	17
2.3 Hipóteses .....	17
2.4 Material & Métodos .....	18
2.4.1 Coleta de Diásporos .....	18
2.4.2 Espécies Seleccionadas .....	18
2.4.3 Transporte de Diásporos .....	19
2.4.4 Casa de Vegetação .....	19
2.4.5 Breve Descrição das Espécies Estudadas .....	20
2.4.6 Crescimento de Plântulas .....	28
2.4.7 Comparação com o Ambiente Natural .....	29

2.4.7.1 Weighted Mean Spatial Distribution Center (wMDSC) .....	29
2.4.8 Coleta de Material Foliar .....	31
2.4.9 Extração de Tococromanóis em Folhas .....	32
2.4.10 Extração de Tococromanóis no Látex .....	32
2.4.11 Análise de Dados .....	34
2.5 Resultados .....	34
2.5.1 Conteúdo de Tococromanóis em Folhas .....	34
2.5.2 Conteúdo de Tococromanóis e Taxa de Crescimento .....	40
2.5.3 Conteúdo de Tococromanóis no Látex .....	45
2.6 Discussão .....	46
2.6.1 Conteúdo de Tococromanóis em Folhas .....	46
2.6.2 Taxa de Crescimento .....	47
2.6.3 Conteúdo de Tococromanóis e Taxa de Crescimento .....	48
2.6.4 Conteúdo de Tococromanóis no Látex .....	49
2.7 Conclusões .....	50
<b>Capítulo 3.</b>	
<b>3. Experimento em Câmaras Climáticas</b> .....	51
3.1 Introdução .....	51
3.2 Objetivos .....	53
3.2.1 Objetivos Específicos .....	53
3.3 Hipóteses .....	53
3.4 Material & Métodos .....	54
3.4.1 Casa de Vegetação .....	54
3.4.1.1 Contagem e Marcação das Folhas .....	54
3.4.2 Câmaras Climáticas .....	56
3.4.2.1 Câmara Climática 1 .....	57
3.4.2.2 Câmara Climática 2 .....	60
3.4.2.3 Coleta de Material Foliar .....	61
3.4.3 Fluorescência da Clorofila <i>a</i> .....	62
3.4.4 Análise Microscópica da Anatomia Foliar .....	63
3.4.5 Raízes Adventícias em Folhas .....	64
3.4.6 Análise de Dados .....	64
3.5 Resultados .....	65

3.5.1	Conteúdo de $\alpha$ -tocoferol entre os Tratamentos .....	65
3.5.2	Conteúdo de $\delta$ -tocotrienol entre os Tratamentos .....	66
3.5.3	Conteúdo de $\alpha$ -tocoferol - Influência do Tempo .....	71
3.5.4	Conteúdo de $\delta$ -tocotrienol - Influência do Tempo .....	72
3.5.5	Fluorescência da Clorofila <i>a</i> .....	77
3.5.6	Análise Microscópica da Anatomia Foliar .....	83
3.5.7	Formação de Raízes Adventícias em Folhas .....	83
3.5.8	Manutenção, Perda e Produção de Folhas .....	87
3.6	Discussão .....	93
3.6.1	Conteúdo de $\alpha$ -tocoferol entre os Tratamentos .....	93
3.6.2	Conteúdo de $\delta$ -tocotrienol entre os Tratamentos .....	94
3.6.3	Conteúdo de $\alpha$ -tocoferol - Influência do Tempo .....	95
3.6.4	Conteúdo de $\delta$ -tocotrienol - Influência do Tempo .....	97
3.6.5	Fluorescência da Clorofila <i>a</i> .....	98
3.6.6	Análise Microscópica da Anatomia Foliar .....	99
3.6.7	Formação de Raízes Adventícias em Folhas .....	100
3.6.8	Manutenção, Perda e Produção de Folhas .....	101
3.7	Conclusões .....	102
<b>4.</b>	<b>Considerações Finais</b> .....	<b>104</b>
<b>5.</b>	<b>Referências</b> .....	<b>106</b>

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1 – A. diferentes formas de tocoferóis e tocotrienóis,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$ , variando conforme a posição dos radicais no anel. B. a estrutura química do tocoferol. C. a estrutura química do tocotrienol, mostrando que a diferença entre as moléculas são duplas ligações nas posições 3, 7 e 11 da cadeia. Adaptado de Munné-Bosch & Alegre (2002) e DellaPenna (2005). .....12

### Capítulo 2

Figura 1 – Esquema do gradiente de inundação nas florestas de várzea. A posição da planta no gradiente determina a duração do período de inundação. Neste exemplo há espécies de várzea alta que são inundadas 40 dias ao ano e espécies de várzea baixa inundadas 230 dias ao ano .....16

Figura 2 – Espécies utilizadas no experimento: 1. *Alchornea castaneifolia*, 2. *Annona cf. hypoglauca*, 3. *Apeiba glabra*, 4. *Cecropia latiloba*, 5. *Crataeva benthamii*, 6. *Crescentia amazonica*, 7. *Erythrina fusca*, 8. *Garcinia brasiliensis*, 9. *Laetia corymbulosa*, 10. *Macrobium acaciifolium*, 11. *Nectandra amazonum*, 12. *Pouteria glomerata*. Cada faixa vermelha da régua mede 10 cm .....27

Figura 3 – Espécies utilizadas no experimento: 13. *Pseudobombax munguba*, 14. *Psidium acutangulum*, 15. *Pterocarpus amazonum*, 16. *Simaba multiflora*, 17. *Tabaernamontana siphilitica*, 18. *Vitex cymosa*, 19. *Zygia latifolia*. Cada faixa vermelha da régua mede 10 cm. Os números correspondem aos números do texto da descrição das espécies. .... 28

Figura 4 – (A) Mapa do Brasil mostrando o Estado do Amazonas e a localização da Reserva de Desenvolvimento sustentável Mamirauá (RDSM). (B) Mapa da área da Reserva, mostrando a estação Jarauá, situada entre os rios Solimões e Japurá. Adaptado de Schöngart et al. (2003).....30

Figura 5 – Localização das áreas monitoradas no setor Jarauá. Cada área amostral consta de 1 ha de floresta inventariado. (A) Localização dos indivíduos dentro de cada

parcela e (B) Topografia do terreno de cada parcela. Adaptado de Wittmann (2001). .....	30
Figura 6 – (A) Gotas de látex fresco formadas após a retirada de cilindro da lâmina foliar de <i>Garcinia brasiliensis</i> ; (B) corte transversal da nervura central da folha de <i>G. brasiliensis</i> , mostrando as gotas de látex fresco e (C) detalhe das gotas de látex formadas após o corte transversal da lâmina foliar em <i>G. brasiliensis</i> .....	33
Figura 7 – Grupo de espécies cujo conteúdo de $\alpha$ -tocoferol é $\geq 6 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Os valores são médias com erro padrão (n = 3). .....	37
Figura 8 – Grupo de espécies cujo conteúdo de $\alpha$ -tocoferol é $< 6 > 2 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Os valores são médias com erro padrão (n = 3). .....	38
Figura 9 - Grupo de espécies cujo conteúdo de $\alpha$ -tocoferol é $\leq 2 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Os valores são médias com erro padrão (n = 3). .....	39
Figura 10 – Relação entre o conteúdo de $\alpha$ -tocoferol nas folhas e o wMSDC (nível de inundação), cada ponto representa uma das 18 espécies estudadas.....	40
Figura 11 - Grupo de espécies cujo crescimento em altura é lento ( $< 60 \text{ cm em } 210 \text{ dias}$ ).....	42
Figura 12 - Grupo de espécies cujo crescimento em altura é intermediário ( $\geq 60 \text{ cm em } 180 \text{ dias}$ ). .....	43
Figura 13 - Grupo de espécies cujo crescimento em altura é rápido ( $\geq 60 \text{ cm em } 150 \text{ dias}$ ).....	44
Figura 14 - Correlação entre o conteúdo de $\alpha$ -tocoferol e o crescimento em altura, cada ponto representa uma das 18 espécies estudadas (p = 0,02).....	45
Figura 15 - Conteúdo de tococromanóis (em escala logarítmica), observado no látex de três espécies, <i>Garcinia brasiliensis</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> e <i>Tabernaemontana siphilitica</i> . .....	46

## Capítulo 3

- Figura 1 – Plântulas em casa de vegetação, indivíduos de *Garcinia brasiliensis* (A), detalhe da marcação nas folhas de *Pouteria glomerata* (B) aspecto geral das duas espécies (C). .....56
- Figura 2 – Vista externa da Câmara Climática, mostrando painel de controle das condições ambientais à direita (A), e vista interna com as plântulas e os tanques para o experimento de inundação artificial (B). .....57
- Figura 3 – Esquema mostrando a situação das plantas durante o experimento. Plantas na casa de vegetação (A); os dois grupos de plantas na câmara climática 1, um sob inundação artificial total e escuro, e outro apenas sob condição de escuro (B); plantas na câmara climática 2, sob condições de seca (C); legenda indicando as três espécies utilizadas neste experimento (D). .....58
- Figura 4 – Tanques plásticos de 500 l onde foram alocadas as plantas para experimento de inundação artificial, antes do início da inundação (A), após os primeiros 10 cm de inundação (B), completamente submersas (C) e após 4 meses de inundação a descida gradativa da água (D). .....60
- Figura 5 – Plantio das folhas encontradas nos tanques com formação de raízes adventícias. Detalhe das folhas e da terra misturada ao poliuretano (A), e bandeja coberta com tampa perfurada para a manutenção da umidade (B).....64
- Figura 6 – Concentração de  $\alpha$ -tocoferol em *Garcinia brasiliensis*, valores médios com erro padrão (n = 4). Os números 0, 30, 120, 125, 139, 169 correspondem aos dias de coleta durante o experimento. Médias com letras iguais não são significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).....67
- Figura 7 – Concentração de  $\alpha$ -tocoferol em *Laetia corymbulosa*, valores médios com erro padrão (n = 4). Os números 0, 15, 120, 125, 139, 169 correspondem aos dias de coleta durante o experimento. Médias com letras iguais não são significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). .....68
- Figura 8 – Concentração de  $\alpha$ -tocoferol em *Pouteria glomerata*, valores médios com erro padrão (n = 4). Os números 0, 30, 120, 125, 139, 169 correspondem aos dias de

- coleta durante o experimento. Médias com letras iguais não são significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). .....69
- Figura 9 – Concentração de  $\delta$ -tocotrienol em *Garcinia brasiliensis*, valores médios com erro padrão (n = 4). Os números 0, 30, 120, 125, 139, 169 correspondem aos dias de coleta durante o experimento. Médias com letras iguais não são significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). .....70
- Figura 10 – Interferência do tempo, dentro de cada tratamento, sobre o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol na espécie *G. brasiliensis*. Em A de 0 a 90 dias e em B de 123 a 169, período que inclui a recuperação das plantas. ....73
- Figura 11 – Interferência do tempo, dentro de cada tratamento, sobre o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol na espécie *L. corymbulosa*. Em A de 0 a 21 dias e em B de 123 a 169, período que inclui a recuperação das plantas. ....74
- Figura 12 – Interferência do tempo, dentro de cada tratamento, sobre o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol na espécie *P. glomerata*. Em A de 0 a 30 dias e em B de 132 a 169, período de recuperação das plantas. ....75
- Figura 13 – Interferência do tempo, dentro de cada tratamento, sobre o conteúdo de  $\delta$ -tocotrienol na espécie *G. brasiliensis*. Em A de 0 a 90 dias e em B de 123 a 169, período que inclui a recuperação das plantas. ....76
- Figura 14 – Aspecto de uma planta de *G. brasiliensis* do tratamento seca, após dois dias de retorno à casa de vegetação (A), parte das folhas apresentavam ressecamento. A mesma espécie com duas folhas novas (seta), duas semanas após o retorno à casa de vegetação (B). A faixa cinza da escala corresponde a 10 cm de altura .....79
- Figura 15 – Valores médios de Fv/Fm no tratamento de inundação artificial, durante o experimento em *G. brasiliensis*. O eixo secundário de y mostra o nível da água nos tanques, a faixa cinza indica o período no qual as plantas ficaram no escuro (A). Valores médios de Fv/Fm, nos tratamentos de escuro, seca e casa de vegetação, a faixa cinza indica o período no qual as plantas do tratamento escuro ficaram sem luz (B). ....80
- Figura 16 – Valores médios de Fv/Fm no tratamento de inundação artificial, durante o experimento *L. corymbulosa*. O eixo secundário de y mostra o nível da água nos tanques, a faixa cinza indica o período no qual as plantas ficaram no escuro (A).

Valores médios de Fv/Fm, nos tratamentos de escuro, seca e casa de vegetação, a faixa cinza indica o período no qual as plantas do tratamento escuro ficaram sem luz (B). .....81

Figura 17 – Valores médios de Fv/Fm no tratamento de inundação artificial, durante o experimento em *P. glomerata*. O eixo secundário de y mostra o nível da água nos tanques, a faixa cinza indica o período no qual as plantas ficaram no escuro (A). Valores médios de Fv/Fm, nos tratamentos de escuro, seca e casa de vegetação, a faixa cinza indica o período no qual as plantas do tratamento escuro ficaram sem luz (B). .....82

Figura 18 – Corte transversal da lâmina foliar de uma planta de casa de vegetação da espécie *Garcinia brasiliensis* (A). Corte transversal da lâmina foliar de *G. brasiliensis* submersa há 140 dias (B). As setas indicam as seguintes estruturas: epiderme superior (es), epiderme inferior (ei), cutícula (ct), parênquima paliádico (pp), parênquima esponjoso (pe). .....84

Figura 19 – Corte transversal da lâmina foliar de uma planta de casa de vegetação da espécie *Laetia corymbulosa* (A). Corte transversal da lâmina foliar de *L. corymbulosa* submersa há 140 dias (B). As setas indicam as seguintes estruturas: epiderme superior (es), epiderme inferior (ei), cutícula (ct), hipoderme (hi), parênquima paliádico (pp), parênquima esponjoso (pe). .....85

Figura 20 – Corte transversal da lâmina foliar de uma planta de casa de vegetação da espécie *Pouteria glomerata* (A), Corte transversal da lâmina foliar de *P. glomerata* submersa há 140 dias (B). As setas indicam as seguintes estruturas: epiderme superior (es), epiderme inferior (ei), arênquima paliádico (pp), parênquima esponjoso (pe) e parênquima homogêneo (ph). .....86

Figura 21 – Folhas de *Laetia corymbulosa* mostrando raízes adventícias em planta submersa (A); detalhe da inserção da raiz na nervura da folha (B); inserção da raiz na nervura da folha sem retirada de cilindro da lâmina foliar (C) e folha encontrada no fundo do tanque, mostrando diferença de coloração da lâmina foliar (D). .....87

Figura 22 – Média do número total de folhas após um mês de retorno a casa de vegetação, para as plantas de *G. brasiliensis*, *L. corymbulosa* e *P. glomerata*, que se encontravam nos tratamentos de inundação artificial, escuro e seca. .....88

- Figura 23 – Média do número de folhas iniciais (existentes na planta antes do início do experimento-tempo inicial), folhas marcadas (remanescentes do tempo inicial) e folhas novas (produzidas após o tempo inicial). .....89
- Figura 24 – Plantas de *G. brasiliensis* imediatamente após a sua retirada dos tanques de inundação artificial (A); plantas do tratamento seca em casa de vegetação, após 3 semanas de retorno à casa de vegetação (B); plantas na câmara climática após 120 do tratamento de escuro (C) e plantas do tratamento seca dois meses após retorno à casa de vegetação (D). .....90
- Figura 25 – Planta de *L. corymbulosa* na câmara climática no tratamento seca (A), a mesma espécie lançando brotos e folhas novas ainda na câmara climática, quatro dias após o retorno à 12 horas de fotoperíodo (B), plantas do tratamento seca após duas semanas de retorno à casa de vegetação (C) e plantas do tratamento seca após um mês de retorno à casa de vegetação (D). .....91
- Figura 26 – Planta de *P. glomerata* na câmara climática no tratamento seca (A); a mesma planta lançando brotos laterais e folhas novas, uma semana após o retorno à casa de vegetação (B); após um mês de retorno à casa de vegetação (C) e plantas do tratamento seca dois meses (D). .....92

## RESUMO

Com mais de 1.000 espécies arbóreas registradas, as florestas de várzea são as florestas inundáveis mais diversas do mundo. A vegetação inundável que coloniza estes ambientes está inserida em um gradiente de diferentes níveis de inundação, que definem habitats desde permanentemente aquáticos, nas cotas mais baixas, até totalmente terrestres, nas cotas mais altas. Nestas áreas, a inundação anual média é de 10 m, entretanto, pode alcançar até 15 m de altura, o que, conforme a altura de relevo considerada, corresponde a um tempo de inundação que chega a 270 dias por ano.

No presente estudo foi realizado um *Screening* de vitamina E para 19 espécies arbóreas de várzea, de modo a relacionar o poder antioxidante da vitamina E à posição topográfica ocupada pelas plantas no ambiente natural. Três espécies Perenifólias foram escolhidas para experimento em condições controladas em câmaras climáticas: *Garcinia brasiliensis*, *Laetia corymbulosa* e *Pouteria glomerata*. As condições experimentais foram: 1) inundação artificial gradativa associada à supressão de luz por 120 dias, 2) escuro por 120 dias e 3) seca (umidade relativa de  $45\% \pm 5\%$ ). Os parâmetros investigados foram: o conteúdo de tococromanóis, a fluorescência de clorofila a, a anatomia foliar e a manutenção, a perda e a produção de folhas. Os resultados mostraram que o reservatório de  $\alpha$ -tocoferol está mais relacionado à taxa de crescimento das espécies do que à posição das plantas no gradiente de inundação em ambiente natural. O látex de *G. brasiliensis* possui 7 das 8 formas de vitamina E existentes. No experimento de câmaras climáticas, as maiores taxas de  $\alpha$ -tocoferol encontradas foram nas plantas do tratamento seca e da casa de vegetação. A espécie *G. brasiliensis* mostrou grande conteúdo de  $\delta$ -tocotrienol, sendo este o segundo registro deste composto ocorrendo naturalmente em folhas. A razão Fv/Fm da fluorescência de clorofila a em nenhum dos tratamentos decresceu abaixo de 0,5. As

plantas do tratamento seca ao atingirem valores um pouco abaixo de 0,6 perderam suas folhas. A anatomia das folhas das três espécies mostrou diferenças quando comparadas plantas inundadas por 120 dias com plantas de casa de vegetação. A seca se mostrou, para os parâmetros analisados, o tratamento de maior impacto sobre as plantas, enquanto que sob inundação artificial as plantas se mostraram altamente tolerantes, mantendo as folhas durante todo o experimento. Em todas as situações potencialmente estressantes, testadas para as três espécies, as plantas mesmo mostrando estratégias distintas, conseguiram sobreviver e mostraram rapidez de recuperação ao sair das condições experimentais impostas.

## ABSTRACT

With more than 1,000 registered tree species, Amazonian white-water (várzea) forests are the most species-rich floodplain forests worldwide. The floodplain vegetation colonizing such environments is subjected to a gradient of different levels of inundation, which define habitats from permanently aquatic, at the lowest positions, to almost terrestrial at higher positions. Annual flooding in these forests may reach the height of 15 m, although its mean amplitude is of 10 m, which corresponds to an inundation period of trees of up to 270 days per year.

The present study investigated the content of E Vitamins in leaves of 19 common tree species of Amazonian várzea in order to test for the relation between the antioxidant properties of E Vitamins and the occurrence of tree species along the flooding gradient.

Three evergreen species were selected to perform experiments in climatic chambers, *Garcinia brasiliensis*, *Laetia corymbulosa* and *Pouteria glomerata*, under the following experimental conditions: 1) gradual artificial inundation associated with light suppression,

2) darkness, and 3) drought (relative humidity =  $45\% \pm 5\%$ ); all of them over a 120 days period. Investigated parameters were: the content of tococromanols, chlorophyll fluorescence, leaf anatomy, and flushing and shedding of leaves. The results show that the  $\alpha$ -tocopherol concentration relates primarily to the growth rate of the species rather than their position at the flooding gradient in the natural environment. The latex of *G. brasiliensis* presented 7 of the 8 existing forms of E vitamins. Plants subjected to drought and plants that were located in the greenhouse showed the highest concentrations of  $\alpha$ -tocopherol. *G. brasiliensis* was characterized through very high  $\delta$ -tocotrienol concentrations, constituting the second record ever described in literature pointing out the occurrence of this E-vitamin in plant leaves. The Fv/Fm ratio of chlorophyll fluorescence never declined below the threshold of 0,5. When the Fv/Fm ratio of the species subjected to drought approached to values slightly below 0,6, the species shed their leaves. After 120 days of flooding, leaf anatomy of individuals of all the investigated species was different from that of individuals located in the greenhouse. From all potentially stressful conditions, drought demonstrated the highest impact, while under artificial inundation plants were highly tolerant, keeping their leaves all over the experimental period. Although using different strategies, the three tested species survived the potentially stressful conditions without major problems, recovering themselves efficiently after suppressing the experimental conditions.

## ZUSAMMENFASSUNG

Mit mehr als 1,000 taxonomisch beschriebenen Baumarten sind amazonische Weißwasser- (várzea) Überschwemmungswälder die artenreichsten Überschwemmungswälder weltweit. Die Vegetation dieser Überschwemmungsgebiete unterliegt Gradienten verschiedener

Überschwemmungshöhe und -dauer, von permanent aquatisch in topographisch tief gelegenen Bereichen bis nahezu terrestrisch in den topographisch hoch gelegenen Bereichen. Die periodische Überschwemmung kann Höhen bis zu 15 m erreichen, im Durchschnitt beträgt die Amplitude zwischen Hoch- und Niedrigwasser 10 m, was einer jährlichen Überschwemmungsdauer von Bäumen von bis zu 270 Tagen pro Jahr entspricht. Die vorliegende Arbeit untersucht den Gehalt an Vitamin E in Blättern von 19 Baumarten amazonischer várzea-Wälder. Es wird geprüft in welchem Zusammenhang die Menge des antioxidierenden Vitamin E mit der natürlichen Verbreitung der jeweiligen Baumart entlang des Flutgradienten steht. Drei immergrüne Arten, *Garcinia brasiliensis*, *Laetia corymbulosa* und *Pouteria glomerata* wurden weiterhin ausgewählt um Experimente unter kontrollierten Bedingungen in Klimakammern durchzuführen. Die zu testenden Bedingungen hierbei waren: 1) graduelle künstliche Überschwemmung und damit einhergehende Lichtverminderung, 2) absolute Dunkelheit, und 3) Trockenheit (relative Luftfeuchte =  $45\% \pm 5\%$ ); alle Bedingungen induziert über einen Zeitraum von 120 Tagen. Es wurden folgende Parameter untersucht: Gehalt an Tocochromanolen, Chlorophyllfluoreszenz, Blattanatomie, sowie Blattproduktion und -abwurf. Die Resultate zeigen, dass die Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol in Blättern eine enge Beziehung zur Wachstumsrate der jeweiligen Baumart aufweist. Keine signifikante Beziehung konnte dagegen zwischen dem  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt und der natürlichen Verbreitung der Art entlang des Flutgradienten erfasst werden. Der Latex von *G. brasiliensis* weist 7 von 8 möglichen Formen von Vitamin E auf. Pflanzen mit induziertem Trockenstress und Pflanzen im Gewächshaus wiesen die höchsten  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen auf. *G. brasiliensis* wies dagegen hohe Konzentrationen von  $\delta$ -Tocotrienol auf, diese Form von Vitamin E wurde erst einmal als natürlicher Bestandteil einer Pflanze nachgewiesen. Trotz dem Aussetzung der Pflanzen unter andauernd stresshafte Bedingungen sank die Fv/Fm

Ratio der Chlorophyllfluoreszenz in keinem Fall unter den Schwellenwert von 0,5. Vielmehr kam es vor allem bei den unter Trockenstress unterworfenen Arten zur Blattseneszenz wenn sich die Fv/Fm Ratio Schwellenwerten von etwas weniger als 0,6 annäherten. Nach 120 Tagen andauernder Überschwemmung war insbesondere die Blattanatomie der überschwemmten Pflanzen gegenüber den Gewächshauspflanzen verändert. Von allen potenziell stresshaften Bedingungen hatte der Trockenstress die gewichtigste Auswirkung auf die untersuchten Baumarten, demgegenüber erhielten die Arten beispielsweise ihre Blätter unter Submersion und Dunkelheit selbst über den Zeitraum von 120 Tagen. Alle Baumarten überlebten die induzierten stresshaften Bedingungen ohne größere Schädigung, und wiesen kurze Zeit nach Beendigung der Experimente ein effiziente Rekuperation auf.

## 1. Descrição do Ambiente e Objetivo do Trabalho

### 1.1 Descrição do Ambiente

A água é o fator preponderante na paisagem amazônica (Junk 1980), inundando vastas áreas marginais aos rios e às florestas a eles associados. Dentre as florestas periodicamente inundáveis, a várzea é o tipo mais comum na Amazônia (Prance 1980). Ela ocorre ao longo de todos os principais rios de água branca, o que, de acordo com Junk (1993), corresponde na região amazônica brasileira a uma área de cobertura de cerca de 200.000 km<sup>2</sup>, dois terços da área total das planícies inundáveis.

Uma característica específica das áreas inundáveis amazônicas que as distingue das demais é sua inundação periódica, que promove mudanças devido à existência de uma fase aquática e uma fase terrestre ao longo do ano (Junk 1984, Junk & Welcomme 1990).

Pires & Prance (1985) classificaram a vegeta o inundável em 7 diferentes tipos, com base no período de inunda o, colora o da água e tipo de solo e definiram as várzeas como florestas periodicamente inundáveis por rios de água branca e os igapós como as florestas periodicamente inundáveis por rios de águas pretas ou claras, embora, na Amazônia Central, a várzea seja um dos tipos de florestas mais representativos segundo estes autores.

As florestas de várzea são as florestas inundáveis mais diversas do mundo, com mais de 1000 espécies arbóreas (Wittmann *et al.* 2006). A vegeta o inundável que coloniza estes ambientes está inserida em um gradiente de diferentes níveis de inunda o, que definem habitats desde permanentemente aquáticos, nas cotas mais baixas, até totalmente terrestres, nas cotas mais altas (Junk 1989). Nestas áreas, a inunda o anual média é de 10 m (Junk 1989), entretanto, pode alcançar até 15 m de altura (Junk & Weber 1996), o que, conforme a altura de relevo considerada, corresponde a um tempo de inunda o que chega a 270 dias por ano (Wittmann *et al.* 2002, 2004).

Nas áreas alagáveis há um grande número de espécies de árvores altamente tolerantes   inunda o (Junk 1989), entretanto o comportamento fisiológico de cada espécie varia de acordo com a sua posi o e o nível de inunda o no gradiente (Revilla 1981, Worbes 1992, Parolin 1996). De acordo com Junk *et al.* (1989) e Wittmann & Junk (2003), cada planta tem uma posi o ótima no gradiente de inunda o, todavia, isto pode ser modificado por vários fatores, tais como estabilidade, estrutura e fertilidade do

substrato, nível do lençol freático e processos biogênicos, especialmente acumulação de material orgânico, fixação de nitrogênio e competição intraespecífica.

Na região amazônica, muitos trabalhos têm sido realizados em florestas inundáveis considerando populações ou comunidades vegetais de indivíduos adultos, na maioria das vezes definidos como árvores com DAP (diâmetro à altura do peito)  $\geq 10$  cm. Estes trabalhos enfocam diversos aspectos, tais como: distribuição e características estruturais e florísticas (Ducke & Black 1953, Rodrigues, 1961, Takeuchi 1962, Prance 1979, Pires & Prance 1985, Junk 1989, Ferreira 1991, Revilla 1991, Worbes *et al.* 1992, Klinge *et al.* 1995, Wittmann *et al.* 2002); acompanhamento sazonal da fenologia (Ferreira 1991, Ziburski 1991, Parolin 1996, Maia 1997, Oliveira 1998, Wittmann & Parolin 1999, Schöngart *et al.* 2002) e anatomia, fisiologia e idade (Worbes *et al.* 1992, Parolin 1996, Maia 1997, Waldhoff *et al.* 1998).

Poucos trabalhos têm sido realizados focalizando a regeneração florestal, abrangendo árvores com DAP  $\leq 10$  cm e maiores que 1 m de altura (Worbes 1986, Colonnello 1990, Ayres 1993, Nebel *et al.* 2001, Wittmann & Junk 2003), bem como nas fases iniciais de desenvolvimento das espécies, assim considerado o estágio de plântulas. É importante ressaltar que tomar como base unicamente os indivíduos adultos para explicar a distribuição e a resposta de todas as classes de tamanho das árvores pode levar a graves erros, porque muitos dos processos que afetam a distribuição, estrutura e dinâmica de uma população ou comunidade podem ocorrer muito cedo na vida da planta (Li *et al.* 1996, Zagt & Werger 1998).

Muitos autores tratando da regeneração arbórea em florestas neotropicais citam que a composição de espécies e a densidade de indivíduos jovens variam consideravelmente em resposta a diferenças nas condições ambientais em pequena escala e pela competição de espécies (Denslow 1980, Brunig 1983, Bongers *et al.* 1988). Em contraste com a terra firme, onde as necessidades da regeneração dos estágios iniciais de sucessão estão ligados principalmente à exigência de luz das plântulas em clareiras (Budowski 1965, Bazzaz & Pickett 1980, Whitmore 1990). A inundação é considerada como o fator mais limitante para o estabelecimento dentro das áreas inundáveis (Junk *et al.* 1989, Klinge *et al.* 1990, Puhakka & Kalliola 1993), sendo a estrutura e a composição de juvenis na várzea fortemente relacionada à altura e duração da inundação anual. Por isso, a diversidade de espécies nas florestas de várzea é menor do que na terra firme, provavelmente também em função da impossibilidade do estabelecimento das plântulas antes da subida das águas (Ayres 1993).

## 1.2 A Sucessão em Ambientes de Várzea

Para as florestas de várzea da Amazônia Central, Worbes *et al.* (1992) estabeleceram um padrão de sucessão relacionando tempo aproximado de desenvolvimento dos estágios com a idade das árvores. Segundo a classificação dos autores, o primeiro estágio é caracterizado por grupos monoespecíficos de **espécies pioneiras** como *Alchornea castaneifolia* e *Salix martiana*. Estas dominam as margens dos rios, com idades que chegam a 10 anos. Este estágio é seguido por espécies **secundárias iniciais**, como as do gênero *Cecropia* que atingem a idade de 10 a 30 anos. Posteriormente, como **secundárias tardias**, ocorrem espécies que podem alcançar idades de 20 a 60 anos, estágio caracterizado por *Crataeva benthamii* e *Pseudobombax munguba*, com indivíduos que podem atingir de 60 a 100 anos de idade. Esta última espécie seria a representante da transição entre o estágio sucessional das secundárias tardias e o estágio clímax. A presença de árvores de *Piranhea trifoliata*, espécie que chega à idade de 300 a 400 anos, representa uma típica **floresta clímax**. Worbes (1997) ressalta ainda que ao longo do gradiente de idade a diversidade aumenta continuamente de grupos monoespecíficos a estandes com mais de 100 espécies ha<sup>-1</sup>. Entretanto, o trabalho desse autor descreveu as etapas sucessionais em sítios onde só ocorria várzea baixa, e não levou em consideração as cotas de inundação. Complementando esses estudos, Wittmann *et al.* (2002) mostraram que a várzea alta é um estágio bem característico, no qual existe uma transição de espécies, desde espécies restritas à várzea, até algumas comuns na terra firme e nunca encontradas nas várzeas baixas. Assim, há nestes ambientes um estágio também considerado como clímax de várzea alta, onde a diversidade encontrada é maior do que nas demais áreas investigadas.

Além do gradiente de idade que mostra as substituições de espécies ao longo de cada estágio sucessional, é importante lembrar as cotas de inundação às quais as espécies estão sujeitas ao longo do ano, em função do relevo, independente do seu estágio, já que este fator que pode limitar a existência de muitas das espécies (Wittmann *et al.* 2002).

## 1.3 Importância das Florestas de Várzea

A várzea é um ambiente importante tanto do ponto de vista ecológico, quanto econômico para a região amazônica. Os frutos, sementes, folhas, invertebrados e outros

itens são a principal fonte trófica que sustenta a biota aquática. A entrada de material alóctone no sistema aquático sustenta uma grande biomassa de peixes que é capturada para consumo humano (Barthem 2001).

Além disso, a produção de madeira na Amazônia é 1/5 da produção nacional, e grande parte desta produção é retirada da várzea (Higuchi *et al.* 1994). Segundo Klenke & Ohly (1993), na Amazônia brasileira e peruana 60 a 90% da produção local de madeira vêm de ambientes inundados.

Neste contexto, estudos de crescimento de plântulas, bem como informações ecológicas e fisiológicas de espécies de várzea, são fundamentais para contribuir com projetos que visem à conservação e o manejo de áreas florestais na várzea.

#### **1.4 Implicações dos Fatores Ambientais para a Vegetação**

As plantas terrestres superiores são organismos obrigatoriamente aeróbicos, entretanto, a inundação ou a submersão, reduz a troca de gases entre os tecidos vegetais e a atmosfera, porque os gases, em particular o oxigênio, têm uma difusão 10.000 vezes menor na água do que no ar (Armstrong 1979).

A principal conseqüência de um solo inundado é a rápida diminuição na concentração de oxigênio, porque microorganismos e plantas submersas consomem o oxigênio disponível ocasionando uma baixa taxa de difusão na água (Kozłowski & Pallardy 1984). O oxigênio é vital no centro de geração de energia das células, e sua presença ou ausência determina a atividade metabólica e a produção de energia, pois este é um elemento requerido em diversas vias bioquímicas e na formação de esteróis e ácidos graxos (Dennis *et al.* 2000).

É importante distinguir entre inundação completa, inundação parcial e saturação do solo. Normalmente as injúrias causadas pela inundação ocorrem apenas com a saturação do solo, mas as plantas conseguem sobreviver. Entretanto, quando a inundação é total (submersão) a maioria das plantas morre (Gill 1970).

Enquanto a anaerobiose está sendo estabelecida como o principal fator de injúrias em caso de saturação do solo e inundação parcial (por baixa inundação), fatores como intensidade de luz e interferência na função estomatal também são críticos quando a inundação é alta e cobre completamente as plantas (Gill 1970).

Vale lembrar que, mesmo o solo estando completamente alagado, pode não estar ocorrendo a falta completa de oxigênio (anoxia), pois podem ocorrer concentrações

consideráveis de O<sub>2</sub> nas camadas próximas à superfície da água, possibilitando, desta forma, que as plantas sobrevivam nestes ambientes (Kozlowski 1984). Contudo, na região amazônica a duração da inundação e a profundidade da coluna de água à qual as plantas das florestas de várzea estão sujeitas é em média 6-7 m (Wittmann *et al.* 2002, 2004), o que torna impossível a retirada de oxigênio da superfície da água.

Com a finalidade de responder questões sobre tolerância à inundação periódica, alguns trabalhos têm sido feitos com espécies da região amazônica, no campo, durante a fase aquática, ou por meio de inundação artificial, no caso de estudos que seriam difíceis de se realizar em condições naturais.

### 1.5 Efeito da Inundação Natural

Em estudo com *Macrobium acaciifolium* no ambiente natural, em florestas de várzea e de igapó, a espécie foi acompanhada sob inundação parcial no início da fase aquática por Schlüter & Furch (1992), que verificaram o desenvolvimento de lenticelas e, paralelamente, a respiração das raízes decresceu a valores muito baixos, e após poucos dias a respiração aumentou abruptamente alcançando o nível máximo após 50 dias de inundação. Durante este período, a energia do metabolismo é obtida por vias anaeróbicas, o que pode ser detectado pelo aumento das concentrações de etanol, lactato, alanina e malato nas raízes. Entretanto, a produção de etanol, alanina e lactato resultam em um ganho direto de energia, e a função da síntese de malato é provavelmente atuar como um sumidouro para o CO<sub>2</sub> excessivo. O decréscimo na respiração após 50 dias de inundação indicou que a via anaeróbica de energia para esta espécie foi apenas uma solução transitória.

Fernandez-Corrêa & Furch (1992) analisaram a tolerância à inundação em folhas de espécies de duas florestas que sempre inundam, uma em águas pretas, igapó, outra em águas brancas, várzea. Os parâmetros observados foram: o potencial da água, análises microscópicas e medidas de fotossíntese nas espécies *Symmeria paniculata* e *Bonafousia muricata*. O potencial de água das folhas que ficaram inundadas durante meses foi o mesmo observado para folhas recém brotadas durante a fase terrestre. Os estômatos são protegidos da infiltração de água por uma vasta cera epicuticular, por vestíbulos profundos e/ou altas células em coroa, mas, o ar detido nos vestíbulos dos estômatos possibilita, mesmo em baixo da água, uma pequena taxa de fotossíntese quando a densidade da corrente dos quantas é adequada. Em resumo, a fotossíntese embaixo da água é

possibilitada por um mecanismo de troca de gases que os autores chamaram de “respiração de plastrão reversa”.

Algumas observações do ponto de vista fisiológico e anatômico que servem para produzir um sistema de bloqueio ao estresse resultante da depleção de oxigênio foram feitas por Schlüter *et al.* (1993) em raízes de plântulas de *Astrocaryum jauari*, notadamente a produção de tecido aerenquimatoso. Contudo, o mecanismo pelo qual o transporte do ar das raízes para a parte aérea da planta está se processando, ainda permanece desconhecido. Esta espécie ocorre tanto na várzea quanto no igapó.

Em 11 espécies comuns em várzea e igapó Waldhoff *et al.* (2002) analisaram a morfologia e anatomia foliar e encontraram características descritas como coreáceas e/ou xeromórficas, como por exemplo, células grandes na epiderme, paredes celulares exteriores da epiderme espessas, cutícula espessa, parênquima esponjoso compacto com alguns pequenos espaços intercelulares, estômatos aprofundados na epiderme, feixes vasculares transcorrentes envolvidos por forte cinto esclerenquimático. Sete das onze espécies mostraram alto grau de esclerofilia, o que sugere que estas espécies podem experimentar estresse hídrico no ambiente. Aparentemente manter folhas submersas não requer adaptações anatômicas ou morfológicas adicionais.

Waldhoff (2003), analisou a estrutura interna de folhas maduras de 6 a 11 meses de idade, de 23 espécies arbóreas comuns à várzea e ao igapó da Amazônia Central, por meio de microscópio de varredura. As espécies diferenciaram-se no seu comportamento foliar (perenifólias e decíduas) assim como no destino das folhas submersas (mantê-las ou não). Como no estudo anterior de Waldhoff *et al.* (2002), as folhas de todas as espécies apresentaram várias características descritas na literatura como xeromórficas. Não foi encontrada uma tendência que pudesse diferenciar as espécies perenifólias das decíduas quanto à anatomia e morfologia foliar, assim, como não foi encontrada diferença entre folhas de várzea (rica em nutrientes) e de igapó (pobre em nutrientes). Como folhas xeromórficas e/ou coreáceas são o padrão típico para florestas tropicais, as estruturas encontradas neste estudo não foram consideradas pelo autor como adaptações a condição de inundação.

## **1.6 Efeito da Inundação Artificial**

Dentre os trabalhos realizados para avaliar os efeitos da inundação de plântulas em áreas inundáveis da região amazônica, destacam-se Coutinho & Struffaldi (1971), que

realizaram experimentos observando a resistência de sementes e plântulas de *Parkia auriculata* à submersão. As plântulas quando submersas pararam quase que completamente de crescer, mas permaneceram vivas mesmo após sete meses de submersão, enquanto que as plântulas controle cresceram cerca de 4,4 cm por mês.

Ao estudar a germinação e o crescimento de plântulas de uma espécie arbórea típica de terra-firme *Parkia pendula*, Scarano & Crawford (1992) submeteram plântulas com um mês de idade a duas condições de inundação: a) total e b) até o nível do solo. Foram utilizadas 10 plântulas por tratamento. Sob inundação parcial as plântulas cresceram apenas durante as primeiras três semanas e, cinco semanas depois de retiradas da inundação, subseqüentemente todas morreram. Também neste estudo a submersão cessou o crescimento das plântulas. Quando completamente submersas, as plântulas morreram após três semanas de tratamento. Isto demonstra que tal espécie seria incapaz de colonizar um ambiente periodicamente inundável como a várzea ou o igapó que, por sua vez, são colonizados por outra espécie do gênero *Parkia*.

Com a finalidade de observar o efeito da inundação em espécies abundantes da Amazônia Central, Waldhoff & Furch (1998) escolheram espécies de diferentes estágios sucessionais: *Cecropia latiloba* e *Senna reticulata* (pioneiras), *Crataeva benthamii*, *Psidium acutangulum*, *Pseudobombax munguba*, *Vitex cymosa* e *Symmeria paniculata* (não pioneiras). Estas espécies foram submetidas, durante 5 meses, a condições normais (controle), seca, inundação do sistema radicular e submersão da planta inteira. Sob condições de seca as plantas diminuíram o crescimento, mas todas mantiveram as folhas saudáveis. As plantas sob inundação parcial mostraram várias adaptações: nas primeiras semanas *C. latiloba* e *S. reticulata* mostraram grande formação de lenticelas hipertrofiadas; após muitas semanas *C. latiloba* e *C. benthamii* demonstraram o fenômeno de dimorfismo do caule (turgescência do caule na superfície da água). As espécies *C. latiloba*, *S. reticulata* e *C. benthamii* formaram raízes adventícias, que cresceram muito rápido em um curto espaço de tempo, e entre 2 a 3 meses havia um enorme tapete de raízes. As plantas totalmente submersas perderam as folhas, mas lançaram novos brotos tão logo voltaram às condições normais. Comparando os cloroplastos das folhas que ficaram submersas por uma semana com o controle, em *C. benthamii*, os autores concluíram que é muito provável que a fotossíntese ocorra em baixo da água, pois seu conteúdo de amido foi relativamente alto, e não houve deformações das grana, nem do sistema lamelar. Neste experimento a fotossíntese mostrou-se teoricamente possível por um suficientemente alto fluxo de quantum (acima de  $10\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Para a espécie *Nectandra amazonum*, Waldhoff *et al.* (2000) compararam medidas de fluorescência da clorofila *a* sob diferentes condições em câmaras climáticas controladas. Esta espécie foi monitorada em 5 condições hidrológicas diferentes: 1) controle (200 mL água/dia), 2) inundação ao nível do solo, 3) parcialmente inundada (20-30 cm de inundação), 4) completamente inundadas e 5) seco (50 mL água/dia). Nesta espécie não houve indício de dano no aparato fotossintético em quaisquer dos tratamentos e o valor mínimo da razão  $F_v/F_m$  foi observado nas plantas sob inundação total: 0,66, ficando acima do valor descrito em literatura para danos reversíveis ( $\leq 0,5$ ).

Parolin (2001a) submeteu plântulas de seis espécies de várzea e seis espécies de igapó à inundação experimental. Os resultados mostraram que as espécies de várzea produziram respostas morfológicas, como raízes adventícias e lenticelas, perderam e produziram folhas; já as espécies de igapó não produziram alterações morfológicas e as plântulas não perderam as folhas. Ao final da inundação a taxa de crescimento aumentou para as 12 espécies e as que estavam inundadas recuperaram o crescimento em altura alcançando o mesmo tamanho das plantas controle entre 5 a 12 semanas. O crescimento em altura foi maior nas seis espécies de igapó, com valor médio de 64,1 cm, enquanto que para as espécies de várzea esse valor foi de apenas 10,4 cm. Segundo o autor isso se deve ao tamanho das sementes que nas espécies de várzea tinham em média 0,5 g e nas espécies de igapó 29,5 g; assim, espécies com sementes grandes produzem plântulas com maior potencial de crescimento. Todavia, o maior incremento de biomassa foi encontrado nas espécies pioneiras de várzea, *Cecropia latiloba* e *Senna reticulata*.

Em experimentos com 120 dias de inundação artificial em plântulas de *Himatanthus sucuuba* realizados por Ferreira (2002), as adaptações produzidas por plântulas provenientes de sementes de várzea e de terra firme foram comparadas. Os resultados revelaram alterações na anatomia, morfologia e atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH). O alagamento parcial induziu a formação de raízes adventícias e lenticelas hipertrofiadas, assim como a atividade da ADH que foi semelhante nas plântulas dos dois ambientes. As plântulas que se encontravam sob inundação total formaram grandes aerênquimas, mas os caracteres morfológicos externos não mostraram alterações; já as plântulas da terra firme mostraram acentuado decréscimo na atividade da ADH a partir do trigésimo dia de inundação. Nestas plantas, ao final do experimento, a taxa de mortalidade foi de 100%. As plântulas de várzea sobreviveram até o final do experimento e nelas foram encontrados os maiores valores da atividade de ADH, valores estes que permaneceram altos até o final do experimento.

Em estudo com a mesma espécie *Himatanthus sucuuba*, Ferreira (2006), analisou a tolerância de plântulas de sementes oriundas da várzea e da terra firme, quanto à saturação hídrica do solo. A elevada resistência da espécie à anoxia foi associada à disponibilidade de açúcares solúveis em suas raízes, onde as concentrações de glucose, frutose e sacarose foram mais elevadas nas raízes das plântulas das populações da várzea. Contudo, em ambas as populações (várzea e terra firme), foram encontradas concentrações elevadas de sacarose no tratamento controle, com posterior redução deste açúcar durante o período alagado. Estes resultados indicam que *H. sucuuba* é uma espécie que se previne das alterações nas condições ambientais, sendo que essa prevenção ocorre de maneira mais efetiva na população da espécie que coloniza a floresta de várzea.

### **1.7 Sistema Antioxidante**

No gradiente de inundação, durante o início de descida das águas, enquanto uma árvore tem apenas parte de seu tronco inundada, as plântulas ainda estão completamente submersas. Quanto menor é sua altura, mais prolongado é o tempo de submersão, quanto maior a submersão maior o tempo de exposição a condições de hipóxia ou anóxia (Junk 1989, Parolin 1998).

O déficit de oxigênio induz em várias espécies de plantas a diminuição das taxas metabólicas, mecanismos de remoção de produtos tóxicos, oxidações endógenas e síntese de enzimas adaptativas para, entre outros, preservar a integridade das membranas dos efeitos dos produtos finais do metabolismo anaeróbico (Crawford 1978, Crawford & Braendle 1996). É sabido que a integridade da membrana celular durante a falta de oxigênio está entre os fatores chaves para a sobrevivência das plantas. Sob condições de anoxia o decréscimo na integridade da membrana é um sintoma de injúria. A síntese de lipídios é dependente de energia e dificilmente pode ocorrer sob condições de anoxia. Assim, a preservação dos lipídios da membrana é a forma mais eficiente de manter as membranas funcionais (Blokhina *et al.* 2003).

Oxidações endógenas levam à formação de radicais livres, que podem levar à peroxidação dos lipídeos nas membranas, o que é um processo metabólico natural sob condições normais, mas, sob condições de estresse, pode se transformar em um processo destrutivo. A severidade deste processo pode levar à morte celular e conseqüentemente à destruição dos tecidos (Crawford 1978, Jordão Jr. *et al.* 1998, Blokhina 2000).

O radical livre é um átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons não pareados que apresentam alto poder de reação com outras moléculas. Utiliza-se também o termo **espécies reativas de oxigênio (ERO)**, coletivo que inclui não somente radicais de oxigênio como o radical superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila (OH), ou oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), mas, também alguns derivados não radicalares, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). As ERO, especialmente OH e  $^1O_2$ , são altamente reativas e na ausência de mecanismos protetores podem causar dano na estrutura e função das células (Asada 1994, 1999).

O estresse oxidativo tem sido definido como um distúrbio no estado de equilíbrio no sistema de pró-oxidantes e antioxidantes, nas células intactas. Esta definição implica no fato de que a célula deve ter um sistema onde exista um equilíbrio entre a produção e a eliminação de ERO durante o metabolismo aeróbico normal (Jordão Jr. *et al.* 1998).

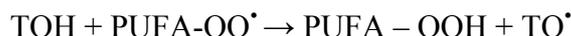
Dependendo da quantidade de ERO formadas e da severidade da peroxidação dos lipídeos, as células podem responder de três formas diferentes: a) indução de síntese de antioxidantes como resultado de sinalização de estresse para sobreviver, b) indução de morte celular programada pela sinalização intracelular, ou c) grandes danos estruturais e metabólicos representados pela necrose (Girotti 1998).

Blokhina (2000) descreve que para proteger as células dos radicais livres sob condições de estresse, nos tecidos vegetais ocorre um **sistema antioxidante**; fazem parte deste sistema as enzimas supressoras de ERO que são a superóxido dismutase (SOD), a catalase e as peroxidases. Além disso há uma rede de antioxidantes de baixa massa molecular que são o ascorbato, a glutathione, os compostos fenólicos e os **tocoferóis**, grupo de compostos que compõem a **vitamina E**. Em adição, algumas enzimas são ainda necessárias para a regeneração de formas ativas de antioxidantes, tais como a ascorbato peroxidase, dehidroascorbato redutase e glutathione redutase.

Uma substância antioxidante é aquela capaz de inibir a oxidação ou, então, qualquer substância que, mesmo presente em baixa concentração, comparada ao seu substrato oxidável, diminui ou inibe a oxidação daquele substrato. Do ponto de vista biológico, pode-se definir antioxidantes como aqueles compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam a oxidação das macromoléculas ou estruturas celulares. Isto implica que os diferentes antioxidantes podem atuar em níveis e com modo de ação distintos (Jordão Jr. *et al.* 1998).

Dentre os antioxidantes envolvidos neste sistema nos tecidos vegetais, os tocoferóis são os únicos que possuem a função de desintoxicação de vários tipos de ERO, pois absorvem o oxigênio singlete pela reação direta com o radical  $OH^\bullet$ , podendo reparar os

ácidos graxos polinsaturados (polyunsaturated fatty acid: PUFA), produzindo um radical tocoferoxila não reativo (TO<sup>•</sup>) (Kagan 1989, Kamal-Eldin & Appelqvist 1996):



A razão ótima da concentração de TOH (tocoferol) e PUFA-H nas membranas é estimada em 1: 1000, onde uma molécula de tocoferol é capaz de proteger 1000 moléculas de lipídio (Buettner 1993). Desta forma, tem sido sugerido que uma parte fundamental da ação biológica dos tocoferóis reside na habilidade de preservar fisicamente as estruturas da membrana (Fryer 1992). Adicionalmente, além de sua importância para os tecidos de plantas como antioxidantes, os tocoferóis possuem também funções não antioxidantes ainda pouco conhecidas (Blokhina 2000).

## 1.8 Vitamina E

O termo vitamina E é usado para designar compostos fenólicos conhecidos como tococromanóis que são um grupo de 8 compostos, 4 tocoferóis e 4 tocotrienóis, os quais são formados por um anel do grupo cromanol e uma cadeia prenil. Estas são moléculas lipossolúveis e têm papel importante na nutrição e saúde humana (Janiszowska & Pennock 1976, Munné-Bosch & Alegre 2002, DellaPenna & Pogson 2006).

Os isômeros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  de tocoferóis e tocotrienóis são portanto os oito homólogos naturais da vitamina E, que diferem em sua estrutura e atividade biológica, e variam em número e posição dos radicais metil acoplados ao anel cromanol (Munné-Bosch & Alegre 2002) (figura 1). Até o momento, o  $\alpha$ -tocoferol tem sido considerado o biologicamente mais ativo, inclusive no que diz respeito a sua atividade como antioxidante (Jordão Jr. *et al.* 1998).

Muito embora os tococromanóis sejam sintetizados exclusivamente em organismos fotossintetizantes, e estejam presentes em todas as partes dos vegetais, seu papel nas plantas tem sido menos estudado do que em humanos (Janiszowska & Pennock 1976, DellaPenna & Pogson 2006).

As diferentes formas de vitamina E podem ser encontradas em todas as partes da planta (Franzen *et al.* 1991, Goffman *et al.* 1999, DellaPenna 1999, Grusak & DellaPenna 1999). Os tocoferóis e tocotrienóis são produzidos nas células da planta no compartimento dos plastídeos, local para a síntese de diversos grupos de prenil-lipídeos (Munné-Bosch & Alegre 2002). Sua função mais bem conhecida é de atuar como antioxidantes (Fryer, 1992, Munné-Bosch & Alegre 2002, Blokhina *et al.* 2003, Sattler *et al.* 2004). Fukuzawa *et al.*

(1982) realizaram experiência *in vitro* e estimaram que uma molécula de  $\alpha$ -tocoferol é capaz de neutralizar até 120 moléculas de oxigênio livres antes de ocorrer degradação.

Todas as plantas superiores que têm sido examinadas contém  $\alpha$ -tocoferol, e este composto é normalmente encontrado em folhas ou onde a fotossíntese ocorra (Janiszowska & Pennock 1976).

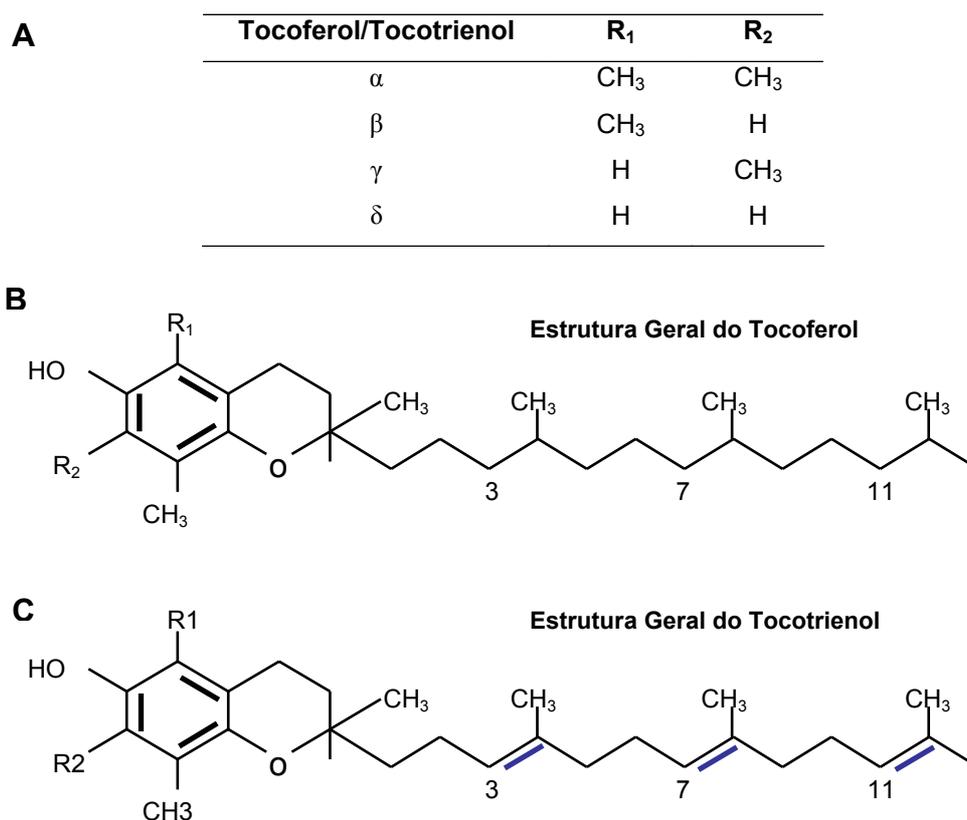


Figura 1. A. diferentes formas de tocoferóis e tocotrienóis,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$ , variando conforme a posição dos radicais no anel. B. a estrutura química do tocoferol. C. a estrutura química do tocotrienol, mostrando que a diferença entre as moléculas são duplas ligações nas posições 3, 7 e 11 da cadeia. Adaptado de Munné-Bosch & Alegre (2002) e DellaPenna (2005).

O estresse oxidativo em plantas contribui para uma sinalização intracelular (Desikan *et al.* 2000, Pandey *et al.* 2000). Conseqüentemente, é dito que o  $\alpha$ -tocoferol tem influência sobre o estresse oxidativo nos cloroplastos, e pode também afetar a sinalização

intracelular (Munné-Bosch & Alegre 2002). Os mesmos autores descrevem o papel crucial destes compostos para a regulação do estresse em plantas. Aumentando o nível de estresse das plantas, aumenta a produção de tocoferóis. Isto tem sido observado em plantas que sofrem alta quantidade de radiação, déficit de água, baixas temperaturas, salinidade, ozônio e poluentes (Lichtenthaler 1979, Smirnov 1993, DeLong & Steffen 1997, García-Plazaola *et al.* 1999, Munné-Bosch & Alegre 2000).

### **1.9 Vitamina E & Espécies Arbóreas da Várzea**

Várias espécies de florestas alagáveis amazônicas não perdem as folhas mesmo quando submersas por até 9 meses em condições naturais (Waldhoff *et al.* 1998). Em folhas submersas, a profundidades inferiores a 1 m, o aparato fotossintético foi encontrado em estado funcional, ao menos parcialmente por vários meses. Contudo, sob tais condições, a fotossíntese só ocorre em níveis baixos ou moderados de luz (Fernandez-Corrêa & Furch 1992). Isto pode indicar que processos destrutivos se estabelecem sob condições de luz elevada, quando as folhas ainda estão aclimatadas às condições de submersão, no período final da inundação.

Processos fotodestrutivos são mediados pela produção de ERO, que podem atacar compartimentos celulares como membranas e proteínas. Contudo, estes processos podem ser impedidos pelos antioxidantes tais como  $\alpha$ -tocoferol (Blokhina 2000).

### **1.10 Objetivo do Trabalho**

Considerando a função da vitamina E como antioxidante (Blokhina 2000, Munné-Bosch & Alegre 2002, Blokhina *et al.* 2003 Dellapenna 2005), o presente estudo visa analisar o reservatório de  $\alpha$ -tocoferol em plantas de 19 espécies arbóreas de florestas de várzea da Amazônia Central sob condições experimentais controladas, e relacionar seu poder antioxidante à posição ocupada pelas plantas no ambiente natural. Além disso, testar experimentalmente situações potencialmente estressantes de inundação artificial, supressão de luz e seca em três espécies perenifólias, para medir tococromanóis, fluorescência da clorofila a, anatomia da lâmina foliar, bem como monitorar a perda, manutenção e produção de folhas novas sob condições controladas.

## 2. Vitamina E & Crescimento

### 2.1 Introdução

Nas áreas alagáveis da região Amazônica há um grande número de espécies de árvores altamente tolerantes à inundação (Junk 1989), podendo, entretanto, o comportamento fisiológico de cada espécie variar de acordo com a sua posição e o nível de inundação no gradiente (Revilla 1981, Worbes 1992, Parolin 1996).

O crescimento e a tolerância de plântulas à inundação é refletido na zonação de espécies de árvores ao longo do gradiente de inundação, onde espécies tolerantes crescem nas cotas mais baixas e espécies menos tolerantes crescem nas cotas mais altas (Ferreira 1997, 2000, Wittmann & Junk 2003).

Nas florestas de várzea as espécies arbóreas apresentam uma série de respostas ao pulso de inundação anual, que envolvem alterações morfológicas, fisiológicas e anatômicas (Waldhoff *et al.* 1998, Parolin *et al.* 2000, Parolin 2001a, Parolin 2001b, Ferreira 2002, Ferreira 2006, Oliveira-Wittmann *et al.* 2006). Durante a fase aquática há uma redução do crescimento, também expressa na formação de anéis anuais de crescimento (Worbes *et al.* 1992, Schöngart *et al.* 2002). Muitas espécies perdem completamente as folhas no período de submersão (Junk 1980, 1984, Wittmann 1996, Worbes 1997, Schöngart *et al.* 2002), enquanto outras mantêm-nas também sob a água (Waldhoff *et al.* 1998). Estas folhas parecem funcionar normalmente na próxima época seca, até que sejam substituídas por folhas novas (Junk 1980).

Espécies perenifólias têm sido foco de estudos fisiológicos na várzea, sobretudo aquelas que mantêm as folhas submersas por longo período. Além de não perderem as folhas, a clorofila também não é degradada embaixo da água, e para algumas espécies têm sido inclusive medida atividade fotossintética em folhas submersas (Furch 1984, Fernandes-Corrêa & Furch 1992, Schlüter *et al.* 1993, Waldhoff *et al.* 1998, Waldhoff & Furch 1998, Waldhoff *et al.* 2002).

Uma série de fatores estão envolvidos na manutenção de folhas funcionais durante e após a submersão, entretanto, alguns metabólitos podem ter papel chave nesta manutenção (Fernandes-Corrêa & Furch 1992, Schlüter *et al.* 1993). Dentre os metabólitos que podem atuar na manutenção de folhas, este estudo se propõe investigar o  $\alpha$ -tocoferol como um dos possíveis auxiliares. Este composto é uma das iso-formas da vitamina E,

composta por  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  - tocoferóis e  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  - tocotrienóis (Munné-Bosch & Alegre 2002).

Os tocoferóis estão presentes em sementes, folhas, flores, frutos, raízes, tubérculos, cotilédones, hipocótilo e caules de plantas superiores. A forma predominante é o  $\alpha$ -tocoferol, exceto nas sementes, que mostram também  $\alpha$ , ou  $\gamma$ -isoformas (Goffman *et al.* 1999, DellaPenna 1999). Segundo Franzen *et al.* (1991) os tocotrienóis não estão usualmente presentes nas partes verdes de plantas superiores, embora traços de  $\alpha$ -tocotrienol tenham sido encontrados em folhas de algumas espécies. Tais compostos costumam aparecer em grande quantidade nas sementes (Goffman *et al.* 1999, Grusak & DellaPenna 1999), sendo que Whittle *et al.* (1966) observaram grande quantidade de  $\delta$ -tocotrienol no látex comercial de *Hevea brasiliensis*.

Além da atuação específica do  $\alpha$ -tocoferol como um bioindicador de estresse (Hormaetxe *et al.* 2005), muitas revisões têm dado foco especial a este metabólito, por causa da recente descoberta do seu papel crucial na manutenção do fotossistema II (PSII) no centro de reações (Trebst 2003), na estabilidade da membrana (Havaux *et al.* 2003), na sinalização intracelular (Munné-Bosch & Falk 2004) e no transporte da sacarose (Hofius *et al.* 2004).

O  $\alpha$ -tocoferol é o principal composto da vitamina E, e não é somente essencial para a sobrevivência das plantas como também é requerido na dieta humana. Seu uso diminui a incidência de muitas doenças degenerativas, o risco de doenças cardiovasculares e algumas formas de câncer (Bramley *et al.* 2000, Hofius & Sonnewald 2003, Rippert *et al.* 2004, Schneider 2005). Como as plantas são a maior fonte de vitamina E para a dieta humana, nos últimos anos muito esforço tem sido investido para aumentar o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol nos tecidos das plantas através de engenharia genética (Grusak & DellaPenna 1999, Dörmann 2003, Hofius & Sonnewald 2003, Rippert *et al.* 2004).

Contudo, Booth & Hobson-Frohock (1961) sugeriram que o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol é inversamente proporcional à taxa de crescimento. Janiszwska & Pennock (1976) afirmam que o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol é variável, mas em regra geral plantas de crescimento rápido apresentam pouco conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol, enquanto que plantas de crescimento lento ou Perenifólias contêm grande quantidade de  $\alpha$ -tocoferol.

Para as florestas inundáveis da Amazônia, Parolin (2002) propõe duas estratégias de estabelecimento relacionando taxa de crescimento à posição das plantas no gradiente de inundação. Uma em que as plantas situam-se em cotas baixas, são **tolerantes à submersão**

**prolongada** e apresentam crescimento lento (várzea baixa), e outra, de **escape da submersão**, em espécies restritas a cotas elevadas (várzea alta), que necessitam de crescimento rápido para manter pelo menos uma parte do corpo fora da água.

Com base nestas duas postulações, decidiu-se por testar o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol das folhas relacionando a posição topográfica ocupada pelas plantas no gradiente de inundação, bem como a taxa de crescimento de cada espécie.

## 2.2 Objetivos

### 2.2.1 Objetivo Geral

Verificar o cont duo de  $\alpha$ -tocoferol em 19 espécies arbóreas freqüentes nas florestas de várzea da Amazônia Central, as quais situam-se em diferentes cotas ao longo de todo o gradiente de inundação (figura 1).

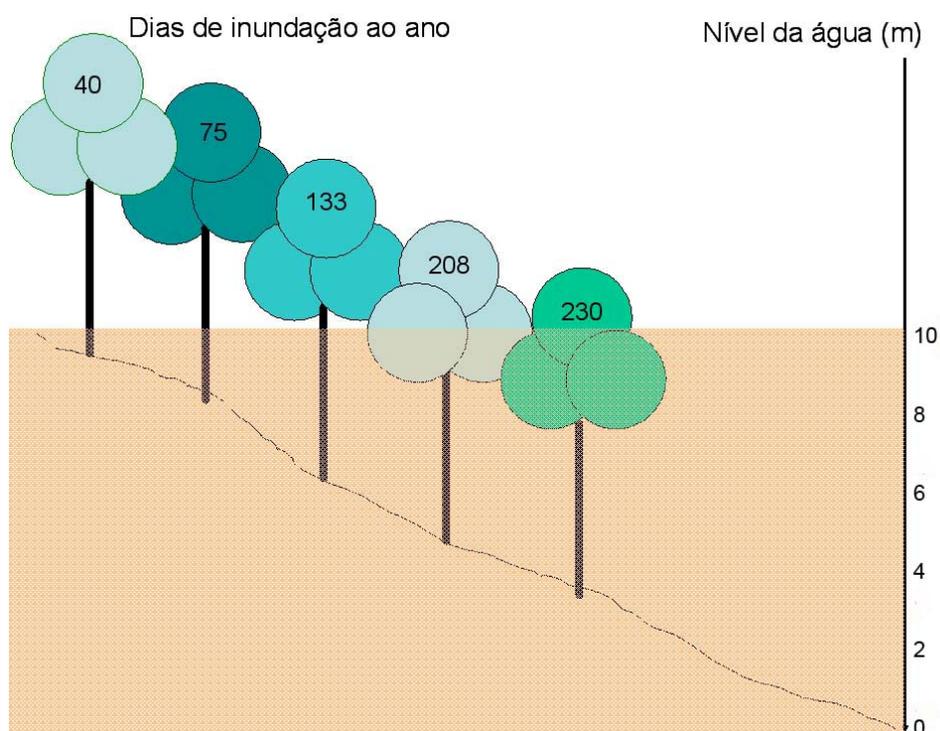


Figura 1. Esquema do gradiente de inundação nas florestas de várzea. A posição da planta no gradiente determina a duração do período de inundação. Neste exemplo há espécies de várzea alta que são inundadas 40 dias ao ano e espécies de várzea baixa inundadas 230 dias ao ano.

### 2.2.2 Objetivos Específicos

a) testar a teoria de Janiszwska & Pennock (1976), para 19 espécies arbóreas de florestas de várzea da Amazônia Central, analisando o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol em relação a taxa de crescimento destas espécies.

b) testar a proposição de Parolin (2002) para 19 espécies arbóreas da várzea da Amazônia Central, que postula que a taxa de crescimento está associada à posição das plantas no gradiente de inundação.

c) verificar se o tempo de inundação ao qual cada espécie está sujeita no ambiente natural está relacionado ao conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol;

d) avaliar se existe relação entre o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol produzido por estas espécies e a estratégia de manutenção (Perenifólias) ou perda de folhas (caducifólias) durante a submersão.

e) investigar a ocorrência de tococromanóis no látex fresco de 3 espécies lactescentes.

### 2.3 Hipóteses

Considerando a posição ocupada por cada espécie no gradiente de inundação, pressupõe-se que:

a) Espécies cuja distribuição no ambiente natural ocorre em cotas de inundação mais baixas (= maior tempo de alagamento), mostrarão maior conteúdo de vitamina E do que aquelas cuja distribuição é em cotas mais elevadas, independente das taxas de crescimento das respectivas espécies.

b) Espécies que mantêm as folhas em condições de submersão, durante a fase aquática, têm conteúdo de vitamina E maior do que aquelas que perdem as folhas durante a inundação.

c) O látex de *Hevea brasiliensis* mostrará maior conteúdo de tococromanóis do que o das demais espécies investigadas.

## 2.4. Material & Métodos

No Brasil foi feita a coleta de material biológico necessária para a realização dos experimentos sob condições controladas que foram conduzidos na Alemanha. Estes experimentos e análises foram feitos em casa de vegetação, câmaras climáticas e laboratórios do grupo de Biologia Molecular de Plantas, no Departamento de Botânica da Universidade Christian-Albrecht em Kiel, em convênio com o Instituto Max-Planck de Limnologia de Plön.

### 2.4.1 Coleta de Diásporos

A coleta de sementes esteve vinculada ao período natural de produção de frutos das árvores, que, na maioria dos casos, nas florestas de várzea, está sincronizada com a sazonalidade do nível do rio (Goulding 1983, Ayres 1993, Kubitzki & Ziburski 1994, Mannheimer *et al.* 2003).

Deste modo, as coletas de frutos maduros foram feitas entre os meses de junho a setembro de 2003, período de águas altas nas florestas de várzea na Ilha da Marchantaria (3° 15'S e 60°00'W) e nos municípios do Careiro (3° 16'S e 59° 59' W) e de Iranduba (3° 17'S e 60°03'W), Estado do Amazonas. Alguns frutos foram coletados flutuando na água próximo à árvore-mãe e outros pegos diretamente da copa.

De cada uma das espécies foram coletados frutos de pelo menos três árvores distintas, e foi possível reconhecer os frutos maduros pela coloração do pericarpo.

Ainda no campo os frutos foram colocados em sacos plásticos de 2 kg devidamente identificados, contendo um pouco de água do rio, e transportados para Manaus. No laboratório do projeto INPA/Max-Planck, os frutos foram colocados em recipientes plásticos de 35 cm de diâmetro com coluna de água de 20 cm, em temperatura ambiente, onde permaneceram até a ocasião do transporte para a Alemanha. A água dos recipientes foi trocada semanalmente para impedir o desenvolvimento de larvas de insetos e evitar a deterioração dos frutos.

### 2.4.2 Espécies Seleccionadas

Do material coletado no campo para a realização dos experimentos na Universidade de Kiel foram seleccionadas 22 espécies de árvores pertencentes a 19 famílias botânicas

(tabela 1), todas abundantes nas florestas de várzea da Amazônia Central (Wittmann *et al.* 2002 e 2006, Schöngart 2003).

Com o objetivo de testar o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol em função da posição ocupada pela espécie no gradiente de inundação, as espécies foram coletadas de forma a representar a distribuição natural observada no gradiente ambiental, desde as cotas mais baixas como é o caso de *Alchornea castaneifolia*, até aquelas que ocorrem nas cotas mais elevadas da planície de inundação, como é o caso de *Apeiba glabra*.

A saída de material biológico do país foi autorizada pela Diretoria de Ecossistemas, Departamento de Vida Silvestre do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), sob número 0108128 BR.

#### **2.4.3 Transporte de Diásporos**

Os diásporos foram acomodados em sacos plásticos hermeticamente fechados de 16,5 cm x 14,9 cm (ziploc), com cerca de 15 mL de água para manutenção da umidade. Estes foram devidamente etiquetados, em seguida foram arrumados em caixa de poliestireno de 75 L para o transporte aéreo até a Alemanha. A caixa de poliestireno foi fechada e viajou no compartimento de carga da aeronave.

#### **2.4.4 Casa de Vegetação**

As sementes foram semeadas em bandejas plásticas germinadoras em terra “TKS2 Instant”, composta de trufa de *Sphagnum* pouco decomposta, cuja composição era de 200–500 mg/l de nitrogênio (N), 200–500 mg/l de fosfato ( $P_2O_5$ ) e 300 – 600 mg de potássio ( $K_2O$ ), pH ( $H_2O$ ): 5,5–7,0, pH ( $CaCl_2$ ) 5,0–6,5. Todas as bandejas receberam rega com água de chuva duas vezes ao dia, no início da manhã e ao final da tarde. Após a germinação as plântulas foram transplantadas para vasos de cerâmica com volume de 0,2853 cm<sup>3</sup>, contendo terra com igual composição descrita acima. Dada a duração do trabalho, inicialmente os indivíduos foram chamados plântulas e posteriormente plantas. Neste sentido, variações entre as espécies foram observadas também, notadamente em relação ao tempo de germinação mais ou menos prolongado.

Das 22 espécies iniciais, apenas 19 produziram plântulas em número suficiente para a realização dos experimentos e suas necessárias réplicas.

As plântulas formadas a partir das sementes transportadas, foram divididas em três grupos e dispostas em duas casas de vegetação distintas. Um grupo de plantas foi escolhido ao acaso para ter seu crescimento acompanhado e um segundo grupo, contendo exemplares de todas as espécies, foi selecionado para coletas de material foliar para realizar um “screening” de vitamina E. Em uma segunda casa de vegetação foram colocadas as plântulas de três espécies perenifólias que fariam parte de outro experimento em câmaras climáticas (capítulo 3).

As casas de vegetação em que se encontravam as plantas tinham temperatura de 28°C ( $\pm 3^\circ\text{C}$ ), a umidade relativa do ar em 80%, e radiação luminosa de 12 horas diárias. A partir de 120 dias do início do experimento iniciou o verão no Hemisfério Norte e o fotoperíodo diário foi naturalmente aumentado, uma vez que a casa de vegetação, com telhado de vidro, não impedia a penetração da luz natural, que ficou em torno de 18 horas diárias.

#### 2.4.5 Breve Descrição das Espécies Estudadas

A descrição das espécies foi feita de acordo com informações contidas no “Manual de Árvores da Amazônia Central – Taxonomia, Ecologia e Uso” (Wittmann *et al.* em prep.). Fotos das espécies encontram-se nas (figuras 2 e 3).

##### 1. *Alchornea castaneifolia* (Hum. & Bonpl.) A. Juss.

Nome vulgar: Oeirana, Oeirana da Folha Grossa. Família: Euphorbiaceae

Arvoreta pioneira ocorre nas cotas mais baixas, freqüente nas margens dos rios, presente em formações monoespecíficas com dossel aberto. Espécie bem adaptada a altas taxas de sedimentação, formando novos estratos de raízes secundárias em cima dos depósitos sedimentares anuais. Apresenta alto potencial de reprodução vegetativa. Esta espécie não produz látex. As folhas são simples, alternas, variando em tamanho, com pecíolos alongados e lâmina serrada. Possui estípulas. As flores são verde amareladas, pequenas e em panículas. Os frutos são cápsulas ovais, trilobadas, deiscentes,  $\varnothing 3 \times 1$  cm.

Uso: A casca e as folhas apresentam propriedades analgésicas, antiinflamatórias, antivirais e antelmínticas.

##### 2. *Annona cf. hypoglauca* Mart.

Nome vulgar: Biribirana, Biribarana e Graviola da Várzea. Família: Annonaceae

Árvore do dossel médio a superior da várzea baixa. Frequente nas cotas de inundação entre 5-6 m, ao longo das margens dos rios e paranás. Rara em florestas de várzea alta. A base do tronco com raízes tabulares. Os ramos com espinhos. As folhas simples, alternas, dísticas. As flores brancas em racemos terminais, floração em massa durante o pico da cheia. Os frutos são vagens segmentadas, com 4-8 sementes,  $\varnothing$  12.0 x 2.5 cm.

Uso: Não Reportado

### 3. *Apeiba glabra* Aubl.

Nome vulgar: Pojó, Bolacheira, Boieira, Mutamba e Pente de macaco. Família: Tiliaceae

Árvore ocasional do dossel superior a emergente da várzea alta. A base do tronco com raízes tabulares. As folhas são simples, alternas, regularmente arranjadas, esbranquiçadas na face inferior, com três nervuras principais saindo da base. Entre as nervuras principais existem glândulas e tufo de pêlos. O pecíolo é pulvinado. As folhas jovens podem ser levemente serrilhadas. As flores amarelas, fragrantas. Os frutos são cápsulas pretas com espinhos lenhosos, parecendo um ouriço do mar,  $\varnothing$  8.0 cm.

Uso: A madeira é usada para a construção de barcos e embalagens.

### 4. *Cecropia latiloba* Miq

Nome vulgar: Embaúba. Família: Cecropiaceae

Árvore do estágio secundário inicial da várzea baixa, frequente em formações mono-específicas ao longo dos rios e paranás, em cotas de inundação entre 4-6 m. A base é reta, ou com pequenas raízes adventícias. O tronco é oco e facilmente reconhecível pela formação de internós. As folhas arranjadas em espiral, simples, palmadas, segmentadas (8-9), geralmente grandes, com pecíolo longo. A triquília varia de branca a marrom. As flores em espigas brancas envolvidas por uma espata vermelha. Os frutos de verde a purpúreos alcançam comprimentos até 10 cm, mas são geralmente mais curtos e mais grossos do que em *C. membranacea*. Nesta espécie a hidrocoria e a ictiocoria foram confirmadas (Ziburski 1991, Roubach & Saint-Paul 1994).

Uso: Não Reportado

### 5. *Crataeva benthamii* Eichler

Nome vulgar: Catoré. Família: Caparaceae

Árvore do dossel médio, freqüente em estágios secundários tardios da várzea baixa. A base do tronco reta a acanalada. Os ramos jovens são verdes com lenticelas brancas. As folhas são compostas, alternas, trifolioladas, com pecíolo alongado. As flores têm pétalas brancas, multi-estaminadas, com estames roxos. Os frutos são cápsulas redondas verdes a marrons, com exocarpo lenticelado,  $\varnothing$  até 10 cm.

Uso: Não Reportado

#### 6. *Crescentia amazonica* Ducke

Nome vulgar: Cuieira. Família: Bignoniaceae

Árvore do dossel médio a inferior da várzea baixa. Freqüente na várzea do baixo Rio Solimões. A base do tronco é reta. As folhas são simples, alterno-espiraladas, com comprimento de até 30 cm, saindo de uma a três em pseudoverticílios dos ramos. As flores são grandes, de brancas a purpúreas, saindo diretamente dos troncos ou ramos, com o cálice dividido. Os frutos são cápsulas secas ovais, permanecendo verdes quando maduros, com polpa branca e numerosas sementes de cor negra,  $\varnothing$  20 x 10 cm.

Uso: A casca do fruto após secagem é utilizada como vasilha pelos ribeirinhos, além de muito utilizada em artesanato.

#### 7. *Erythrina fusca* Lour.

Nome vulgar: Assacurana e/ou Molongó. Família: Fabaceae

Árvore secundária freqüente da várzea alta, ocorrendo na beira dos rios e paranás. A base do tronco é digitada, ou com raízes adventícias e pequenas raízes tabulares. As folhas são alternas, compostas, trifolioladas, com pecíolo e peciólulo pulvinado. As flores são vermelho-laranja em racemos terminais. Os frutos são bagas compridas, marrons,  $\varnothing$  20 x 2 cm, contendo várias sementes.

Uso: A madeira é utilizada para a confecção de canoas, pranchas de *surf* e embalagens. O exudato da casca, folhas e flores são usadas na medicina popular como antelmíntico, relaxante, narcótico e antibiótico.

#### 8. *Garcinia brasiliensis* Mart.

Nome vulgar: Bacuri, Bacuripará liso. Família: Clusiaceae

Árvore do estrato médio da várzea baixa, tolerando inundações até 6 m de profundidade. A ocorrência é ocasional. A copa é simétrica e piramidal. A base do tronco é reta. Possui látex amarelo. As folhas são simples, carnosas, opostas, com venação

secundária paralela. As flores são axilares, brancas e fragrantas. Os frutos têm casca amarela e lisa, são de redondos a ovóides, carnosos,  $\varnothing$  4 x 2 cm, contendo de uma a três sementes.

Uso: O fruto é comestível, muito apreciado, e serve ainda para fabricação de suco e geléia. As sementes têm propriedades antiinflamatórias, anticancerígenas e narcóticas.

### 9. *Laetia corymbulosa* Spruce ex Benth

Nome vulgar: Sardinheira, Turimã. Família: Flacourtiaceae

Árvore do estágio secundário inicial da várzea baixa, freqüente no baixo Rio Solimões. Ocorre em cotas de inundação entre 4-6 m. Base do tronco reta a levemente digitada. As folhas são simples, alternas, dísticas, com margem serrilhada e o pecíolo engrossado, levemente acanalado. As flores são brancas em inflorescências axilares. Os frutos são bagas carnosas, de casca amarela e lisa quando maduros,  $\varnothing$  2.5 x 1.5 cm, contendo várias sementes envoltas por polpa branca.

Uso: O extrato das folhas e da casca tem propriedades anticancerígenas.

### 10. *Macrobium acaciifolium* Benth

Nome vulgar: Arapari, Faveira arapari. Família: Fabaceae

Árvore do dossel médio a superior da várzea baixa, freqüente na beira de lagos e paranás, tolerando inundações de até 7 m de profundidade. A base do tronco é acanalada, com raízes tabulares pequenas. As folhas são compostas, alternas, imparipinadas, muitos pares com folíolos opostos, pulvinados. As flores axilares em racemos, brancas a amareladas. Os frutos são vagens ovais, marrons a amarelas,  $\varnothing$  5 x 10 cm, contendo uma única semente marrom, de formato circular e achatada.

Uso: A madeira é utilizada para embalagens, móveis, carpintaria e construção civil em geral.

### 11. *Nectandra amazonum* Nees

Nome vulgar: Louro, Louro chumbo. Família: Lauraceae

Árvore secundária freqüente da várzea baixa, em cotas de inundação entre 4-6 m. A base do tronco reta. As folhas são simples, elíptico-lanceoladas, alternas a subopostas, esbranquiçadas na face inferior, com nervura principal e secundárias proeminentes. O pecíolo é pulvinado, levemente acanalado. As inflorescências são ramificadas, as flores são

brancas. Os frutos são de roxo a pretos quando maduros, bagas com cúpulas lenhosas e lenticeladas,  $\varnothing$  6 x 3 cm.

Uso: Não Reportado

#### 12. *Pouteria glomerata* (Miq) Radlk.

Nome vulgar: Abiurana, Laranjinha, Maçã do pacu. Família: Sapotaceae

Árvore freqüente do estrato médio de estágios secundários tardios de várzea baixa. A base do tronco é reta, ou levemente acanalada. Possui látex branco, leitoso, não abundante. As folhas são simples, arrançadas em espiral e agrupadas no ápice, esbranquiçadas e com a nervura central proeminente na face inferior. As flores são brancas em inflorescências axilares. Os frutos são bagas marrom-amareladas,  $\varnothing$  10 x 5 cm, com várias sementes marrons envolvidas por uma polpa amarela.

Uso: Não Reportado

#### 13. *Pseudobombax munguba* (Mart. & Zucc.)

Nome vulgar: Mungubeira. Família: Bombacaceae

Árvore do estágio secundário inicial da várzea baixa, muito abundante em cotas de inundação entre 4-6 m. Base do tronco digitada. As folhas são compostas, palmadas, com pecíolo longo e pulvinado. A nervura primária e secundária são proeminentes e de cor amarela. As flores são multiestaminadas brancas e terminais. Os frutos são cápsulas loculicidas com casca ligeiramente rugosa de cor marrom-avermelhada, com inúmeras sementes marrons envoltas por pelos brancos (paina). A frutificação ocorre no pico da cheia. A dispersão é feita pelo vento, água, e provavelmente por peixes.

Uso: A madeira é leve e utilizada para confecção de brinquedos, artesanato, e isolamento acústico. Os pêlos do fruto são impermeáveis e usados para estofamento de coletes salva-vidas e travesseiros.

#### 14. *Psidium acutangulum* DC

Nome vulgar: Goiaba, Goiaba araquá. Família: Myrtaceae

Árvore freqüente do dossel médio a inferior de florestas secundárias da várzea baixa. A base do tronco é reta. Os ramos jovens densamente lenticelados. As folhas simples, opostas, com pecíolo curto e acanalado. Estípulas intrapeciolares. As flores são brancas, grandes, multiestaminadas em inflorescências axilares. Os frutos são bagas ovais

verde-amareladas a marrons quando maduras, com polpa branca a amarela contendo inúmeras sementes,  $\varnothing$  7 x 4 cm.

Uso: O fruto é usado para suco e geléias, mas devido a acidez raramente é consumido pelos habitantes das áreas inundáveis.

#### 15. *Pterocarpus amazonum* (Mart. Ex Benth) Amshoff

Nome vulgar: Tachí, Tachí branco, Mututi branco. Família: Fabaceae

Árvore do estrato superior, freqüente em estágios secundários da várzea baixa. Na base do tronco existem raízes tabulares. Os ramos jovens são lenticelados. As folhas são compostas, imparipinadas, com folíolos alternos, pecíolos e peciólulos pulvinados. As flores têm pétalas amarelas em inflorescências terminais. O pedúnculo da inflorescência é grosso e oco e serve como casa de formigas. Os frutos são vagens circulares, marrons quando maduros contendo uma semente e com  $\varnothing$  8.0 cm.

Uso: Árvore utilizada como ornamental em algumas cidades brasileiras.

#### 16. *Simaba multiflora* A. Juss.

Nome vulgar: Cajurana e/ou Marupá. Família: Simaroubaceae

Árvore do estrato inferior de florestas secundárias tardias da várzea baixa, frequente em cotas de inundação entre 5-6 m. Folhas alternas, compostas, imparipinadas, com 3-4 pares de folíolos subsésseis opostos a subopostos. Nervura primária levemente proeminente na face inferior, venação secundária impressa e translúcida. Flores brancas em inflorescências terminais. Frutos são drupas carnosas, vermelhas a roxas quando maduras,  $\varnothing$  4.5 x 2.5 cm, contendo uma semente.

Uso: Frutos com propriedades anticancerígenas. O extrato da casca e das raízes têm propriedades contra malária.

#### 17. *Tabarnaemontana siphilitica* (L. f.) Leewenb.

Nome vulgar: Bonafusia. Família: Apocynaceae

Arvoreta do dossel inferior da várzea baixa. Ocasional. A base do tronco é digitada a acanalada. As folhas são simples, opostas, subsésseis, levemente onduladas. O pecíolo é pulvinado. A nervura primária e as secundárias fortemente proeminentes na face inferior. Os ramos jovens possuem pêlos. O ápice é protegido pelas bases peciolares. As flores com tubo de corola, brancas, em inflorescências multiflorais e terminais. Os frutos encontram-se em pares, deiscentes, verde a marrons quando maduros, com  $\varnothing$  2.5 x 1.0 cm.

Uso: O látex do tronco, das raízes e das folhas, têm propriedades antipiréticas e antiinflamatórias.

#### 18. *Vitex cymosa* Bert. Ex Spreng

Nome vulgar: Tarumã. Família: Lamiaceae

Árvore do estrato médio de florestas secundárias de várzea baixa, freqüente. Característica para florestas degradadas, tolerando inundações de 5 - 6 m de altura, e alcançando idades de até 100 anos (Worbes *et al.* 1992). A base do tronco é levemente digitada. As folhas são opostas, palmadas, com 5 folíolos. As flores azuis a purpúreas, zigomórficas,  $\varnothing$  2.0 x 0.5 cm. A floração na várzea ocorre durante o pico da cheia entre os meses de maio e junho. Os frutos são indeiscentes, redondos, globosos, variando de roxos a pretos quando maduros,  $\varnothing$  2.5 cm.

Uso: Na América Central, a madeira é usada para construção civil. O extrato da casca tem propriedades analgésicas. Árvore é usada como ornamental em algumas cidades do sudeste brasileiro.

#### 19. *Zygia latifolia* (L.) Fawcett & Rendle

Nome vulgar: Ingá de macaco. Família: Leguminosae

Árvore ocasional do estrato médio de florestas de várzea baixa. A base do tronco é reta, muitas vezes ramificada. Os ramos jovens são levemente acanalados. As folhas são compostas, paripinadas, com 3-4 pares de folíolos pulvinados e levemente assimétricos. Há uma glândula redonda (nectário extra-floral) entre cada par de folíolos. As flores são de brancas a vermelho-rosadas em inflorescências terminais, mostrando cauliflora. Os frutos são vagens encurvadas de até 40 cm de comprimento, contendo várias sementes marrons arredondadas e achatadas de  $\varnothing$  2.0 cm.

Uso: Não Reportado



Figura 2: Espécies utilizadas no experimento: 1. *Alchornea castaneifolia*, 2. *Annona* cf. *hypoglauca*, 3. *Apeiba glabra*, 4. *Cecropia latiloba*, 5. *Crataeva benthamii*, 6. *Crescentia amazonica*, 7. *Erythrina fusca*, 8. *Garcinia brasiliensis*, 9. *Laetia corymbulosa*, 10. *Macrobium acaciifolium*, 11. *Nectandra amazonum*, 12. *Pouteria glomerata*. Cada faixa vermelha da régua mede 10 cm.



Figura 3: Espécies utilizadas no experimento: 13. *Pseudobombax munguba*, 14. *Psidium acutangulum*, 15. *Pterocarpus amazonum*, 16. *Simaba multiflora*, 17. *Tabaernamontana siphilitica*, 18. *Vitex cymosa*, 19. *Zygia latifolia*. Cada faixa vermelha da régua mede 10 cm. Os números correspondem aos números do texto da descrição das espécies.

#### 2.4.6 Crescimento de Plântulas

Imediatamente após a germinação, 10 indivíduos de cada espécie foram escolhidos ao acaso para medidas de crescimento em altura durante 7 meses (210 dias), excetuando-se a espécie *Pouteria glomerata*, pois sua germinação iniciou 6 meses após a sementeira. As medidas foram feitas com fita métrica desde o colo até a gema apical. No total foram monitoradas 190 plântulas de 19 espécies. As condições de rega das plantas foram as mesmas descritas anteriormente para os diásporos.

### 2.4.7 Comparação com o Ambiente Natural

Com base nos inventários de Wittmann (2001) e Schöngart (2003), onde foram levantados 10 ha em sítios de diferentes cotas de inundação em florestas de várzea da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDSM), e 3 ha próximos a cidade de Manaus, as espécies deste estudo foram relacionadas às cotas de inundação nas quais são encontradas em seu ambiente natural. No estudo destes autores cada parcela de 1 ha foi subdividida em 16 parcelas de 625 m<sup>2</sup>, onde se realizou um inventário florestal dos indivíduos adultos. Cada parcela foi mapeada usando-se um teodolito e medindo-se todos os indivíduos  $\geq 10$  cm de diâmetro à altura do peito (DAP), na localização x e y na topografia, com resolução de 10 cm. Isto resultou em modelos de terrenos digitais com alta resolução, que indicaram a posição exata dos *plots*, de cada indivíduo marcado, bem como o nível médio de inundação anual ao qual cada espécie está sujeita. Para ilustrar esse procedimento, é mostrado como exemplo o mapa e os *plots* da RDSM (figuras 4 e 5).

Para a maioria das espécies observações sobre a fenologia vegetativa são citadas por Schöngart *et al.* (2002) e Oliveira-Wittmann (dados não publicados), que realizou experimentos de campo e observou a perda ou manutenção de folhas em plântulas de 6 espécies por 2 ciclos anuais de inundação.

#### 2.4.7.1 Weighted Mean Spatial Distribution Center (wMDSC)

Nos inventários realizados por Wittmann (2001) foi calculado o wMDSC (Ebdon 1998), por espécie em 5 ha. Para isso o nível da inundação em cada indivíduo foi medido.

Considerando todos os indivíduos de uma mesma espécie encontrados nos sítios amostrais, calculou-se a inundação média para aquela espécie; indivíduos dominantes recebem então um peso maior no cálculo, pois são indivíduos bem estabelecidos na população. Desta forma o wMDSC expressa o nível “ótimo” de inundação na distribuição vertical dos indivíduos de uma espécie.

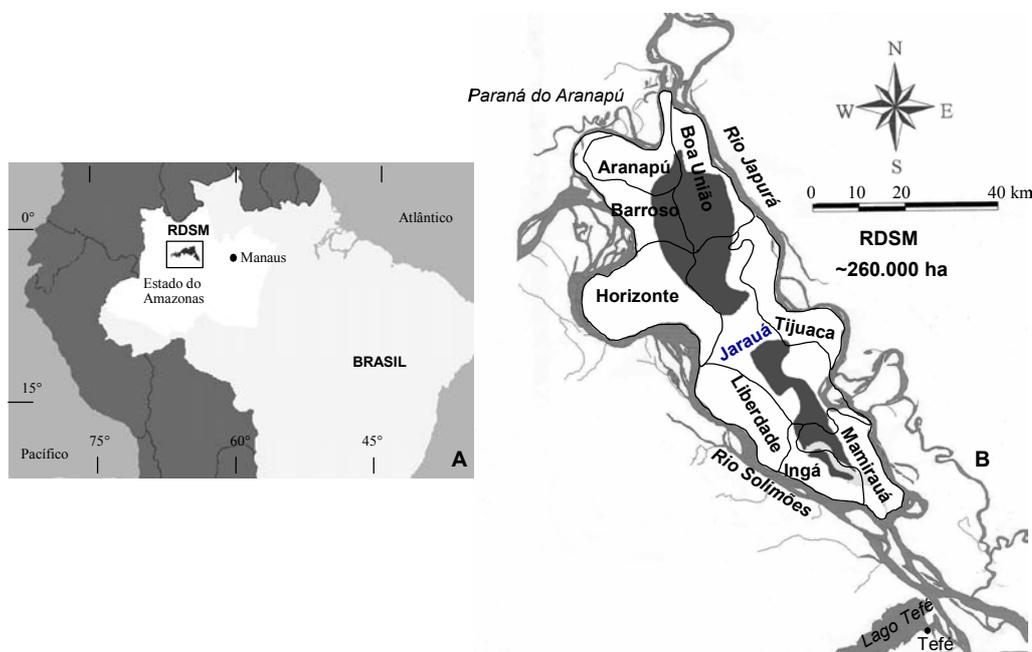


Figura 4. (A) Mapa do Brasil mostrando o Estado do Amazonas e a localizao da Reserva de Desenvolvimento sustentável Mamirauá (RDSM). (B) Mapa da área da Reserva, mostrando a estao Jarauá, situada entre os rios Solimões e Japurá. Adaptado de Schngart et al. (2003).

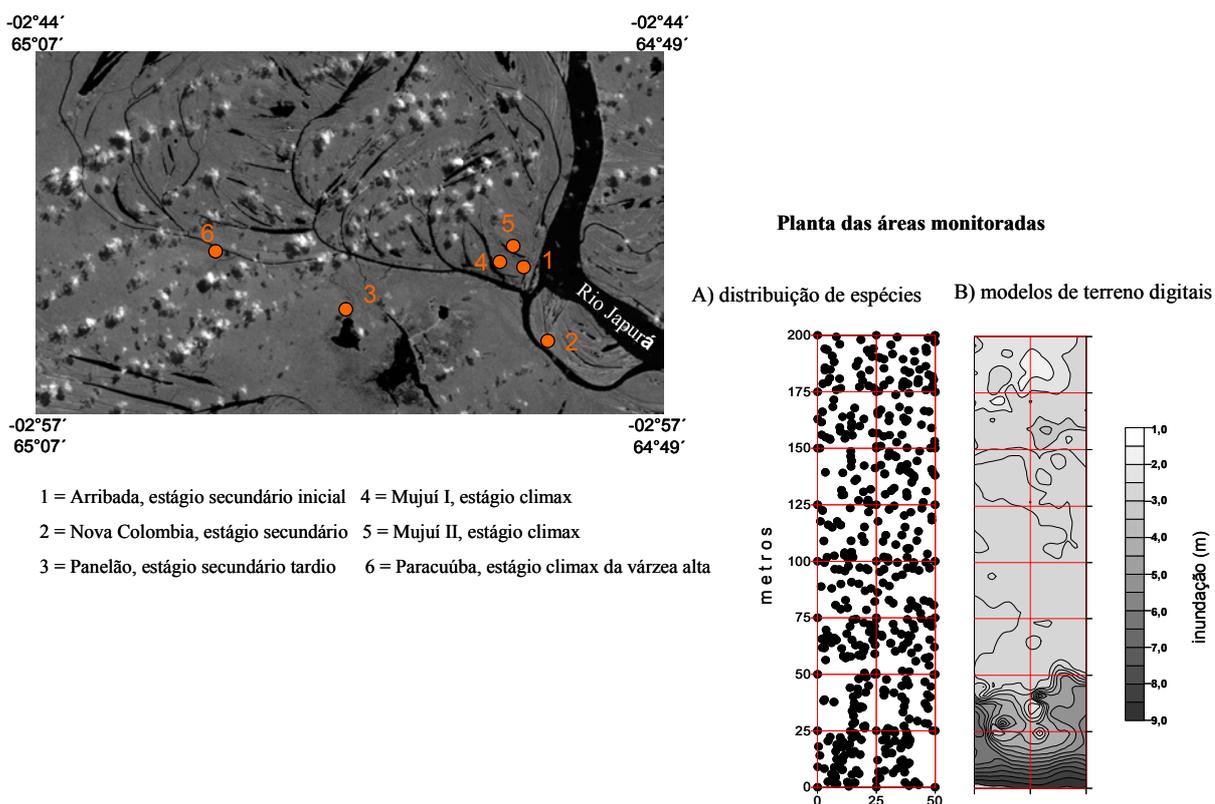


Figura 5. Localizao das áreas monitoradas no setor Jarauá. Cada rea amostral consta de 1 ha de floresta inventariado. (A) Localizao dos indivíduos dentro de cada parcela e (B) Topografia do terreno de cada parcela. Adaptado de Wittmann (2001).

#### 2.4.8 Coleta de Material Foliar

A coleta de material foliar obedeceu ao seguinte critério: foram selecionadas em cada planta folhas maduras com tamanho e características semelhantes, de aspecto saudável, sem manchas, ataque de parasitas ou qualquer alteração visível da lâmina foliar.

De cada espécie foram escolhidos três indivíduos. Em cada indivíduo o material foi coletado de três folhas, e de cada folha foram coletados dois cilindros que, somados, formavam uma área de 1,57 cm<sup>2</sup> de lâmina foliar. Assim, de cada espécie foram amostradas nove folhas. Ao total foram analisadas no screening 171 amostras das 19 espécies.

O procedimento padrão, após a coleta de material foliar, foi o seguinte: as amostras retiradas da folha foram colocadas em tubos de Eppendorf de 2μl devidamente identificados e imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido. Após serem retirados do nitrogênio, os tubos de Eppendorf foram armazenados em freezer a uma temperatura de -80°C. Este é o procedimento para a extração de vitamina utilizado tradicionalmente para as espécies *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, *Zea mais* L., *Nicotiana tabacum* L. (Falk *et al.* 2002 e 2003). Todavia não se sabia se este método utilizado para tais espécies seria apropriado para as espécies em estudo. Desta forma foram feitos alguns testes modificando o procedimento para efeito de comparação com os resultados obtidos no método tradicional. Foram eles:

Teste A – após a retirada do material foliar, os tubos de Eppendorf foram mergulhados em nitrogênio líquido por 30 minutos e em seguida o material foliar foi processado imediatamente sem passar pelo armazenamento no freezer a -80°C.

Teste B – após 3 horas da adição do n-Heptano aos tubos de Eppendorf de 2 μL, as amostras foram retiradas do freezer a -20°C e analisadas em High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Teste C – para as espécies nas quais apenas traços de α- tocoferol foram encontrados, acrescentou-se aos tubos de Eppendorf 50 μL de α, β, γ e δ-tocoferol em concentração conhecida de 1:20. O objetivo era testar se alguma substância presente na folha quebrava as moléculas de tococromanóis existentes durante a extração.

Teste D – diferentes diluições de n-Heptano foram testadas para as diferentes espécies, mas os melhores resultados foram obtidos com 500 μL de n-Heptano.

Ao final dos testes ficou estabelecido que a metodologia de Falk *et al.* (2003) é adequada às espécies amazônicas do presente estudo, alterando-se apenas o volume de n-Heptano como descrito no teste D.

#### **2.4.9 Extração de Tococromanóis em Folhas**

Para realizar a extração de tococromanóis foram adotados os seguintes passos:

Inicialmente, as amostras retiradas do freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  eram imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido e a cada uma delas eram adicionadas 3 bolas de vidro de tamanho variando de 1,7 a 2,3 mm. Em seguida as amostras foram moídas (moinho MM 301 Retsch, Hann-Alemanha) durante 15 minutos e foi adicionado ao material moído 500  $\mu\text{L}$  de n-Heptano. Finalmente o material foliar foi incubado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  por um período mínimo de 12 horas.

Após o período de 12 horas de extração, os tubos de Eppendorf foram centrifugados em 13,2 rpm, a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 7,5 minutos. De cada cápsula com material já centrifugado, eram retirados 80  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para a análise em HPLC a 328 nm.

O aparelho HPLC consiste em uma bomba (LC-10ATVP Liquid Chromatograph, Shimadzu, Duisburg-Alemanha) e um sistema de provas (SIL-10ADVP Autosampler, Shimadzu, Duisburg-Alemanha). Para a armazenagem de dados foi utilizado o “Class VP 5.0” software da Shimadzu. O volume de injeção do material para leitura das diferentes formas de vitamina E pelo aparelho foi de 20  $\mu\text{L}$ .

Para calibração do sistema para verificar a identidade dos picos individuais, soluções padrões de tocoferol e tocotrienol da Merck (Darmstadt, Alemanha) foram usadas.

O conteúdo de tocoferol foi calculado de acordo com a área dos picos formados nos cromatogramas, considerando-se: a área do cilindro da lâmina foliar utilizado, a diluição de n-Heptano e o volume de material usado para a leitura do aparelho de acordo com Falk *et al.* (2003).

#### **2.4.10 Extração de Tococromanóis no látex**

Durante a coleta de material foliar para a realização do *screening*, observou-se que três das 19 espécies estudadas são lactescentes (figura 6), todavia, apenas duas possuem látex abundante, *Garcinia brasiliensis* e *Tabaernamontana siphilitica*. Assim, usando-se o

mesmo número amostral do *screening*, realizou-se um experimento para medir o conteúdo de tococromanóis no látex destas duas espécies.

Além disso, há na literatura uma citação de tococromanóis observados no látex de *Hevea brasiliensis* (Whittle *et al.* 1966). Esta é uma espécie que também ocorre nas florestas de várzea da Amazônia Central. Assim, visto que, havia exemplares desta espécie em casa de vegetação da Universidade de Kiel, realizou-se a coleta do látex fresco de *H. brasiliensis*, para efeito de comparação dos conteúdos de vitamina E entre as 3 espécies.

A coleta de material foi feita através do gotejamento de látex em tubos de Eppendorf de 2  $\mu$ L. Foram escolhidas três plantas por indivíduo; de cada planta foram retiradas 3 folhas e estas foram quebradas ao meio para aproveitar as gotas que se formam em sua nervura central.

Imediatamente após a coleta do material foi acrescentado 500  $\mu$ L de n-Heptano em cada um dos tubos de Eppendorf. O procedimento de extração seguiu os mesmos passos descritos acima para o *screening*.

A massa do látex de cada espécie foi determinada previamente para expressar o conteúdo de tococromanóis em gramas.

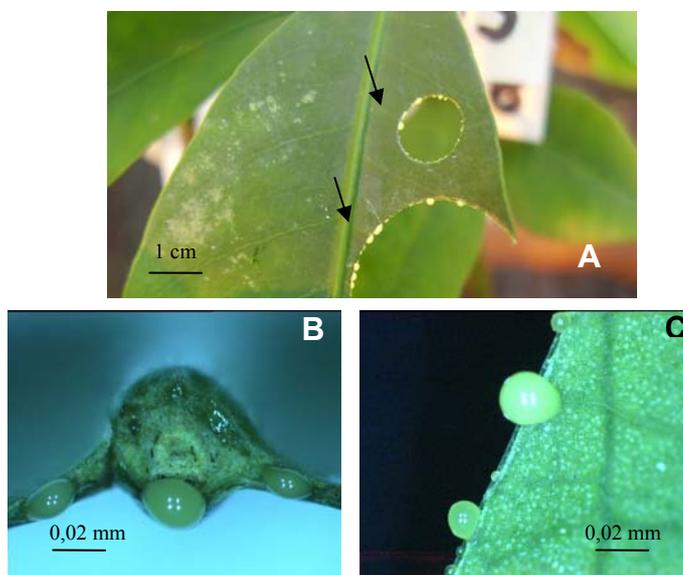


Figura 6. (A) Gotas de látex fresco formadas após a retirada de cilindro da lâmina foliar de *Garcinia brasiliensis*; (B) corte transversal da nervura central da folha de *G. brasiliensis*, mostrando as gotas de látex fresco e (C) detalhe das gotas de látex formadas após o corte transversal da lâmina foliar em *G. brasiliensis*.

### 2.4.11 Análise de Dados

Para relacionar o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol com o wMDSC, bem como com o crescimento em altura, foi feito um teste t (5% de probabilidade) no programa STATISTICA versão 8.0, utilizando-se as médias mensais de crescimento dos 3 últimos meses de observação.

## 2.5 Resultados

### 2.5.1 Conteúdo de Tococromanóis em Folhas

A única forma de vitamina E comum a todas as espécies estudadas foi o  $\alpha$ -tocoferol, como também foi esta a de maior conteúdo encontrado. Poucas espécies apresentaram outras formas de tococromanóis além do  $\alpha$ -tocoferol e, para estas, foram evidenciados apenas traços. Deste modo, serão apresentados apenas os resultados do conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol para todas as espécies.

O conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol variou entre as diferentes espécies de 0,1 a 10,7  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Para destacar estas diferenças, e de acordo com a quantidade encontrada, as espécies foram agrupadas em três categorias: **a)** espécies com o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol  $\geq 6 \mu\text{g cm}^{-2}$ ; **b)** espécies com o conteúdo  $< 6 > 2 \mu\text{g cm}^{-2}$ ; e **c)** espécies cujo conteúdo foi  $\leq 2 \mu\text{g cm}^{-2}$  (figuras 7, 8 e 9).

Em relação à cota média de inundação no ambiente natural calculada de acordo com Wittmann (2001), existem espécies que ocorrem desde 2,4 m como é o caso de *Annona* cf. *hypoglauca*, até 5,5 m como no caso de *Crescentia amazonica* e *Tabernaemontana siphilitica*. Nota-se ainda que 42,1% das espécies estudadas, encontram-se em cotas cuja inundação alcança entre 5,0 e 6,0 m de altura, o que corresponde a um tempo médio de inundação de 176 a 231 dias/ano, ou seja, em torno de 6 meses ao ano. Observa-se que estas espécies estão distribuídas nas três categorias criadas conforme o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol (tabela 1).

As espécies com maior conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol foram *Crescentia amazonica*, cujo valor médio na planta 3 foi maior que 10  $\mu\text{g cm}^{-2}$  e *Tabernaemontana siphilitica* na qual a planta 2 mostra valor próximo a 10  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , ambas espécies perenifólias (figura 7).

Embora não haja dados sobre a fenologia foliar de duas espécies, *Erythrina fusca* e *Apeiba glabra*, pode-se dizer que nas três categorias criadas para as espécies conforme o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol encontrado, existem tanto espécies perenifólias quanto decíduas (tabela 1).

Os valores mais baixos foram observados na espécie *Crataeva benthamii*, menores que  $0,1 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Valores mínimos foram encontrados na espécie *Cecropia latiloba*, para a qual algumas das folhas apresentaram valores não detectáveis pelo aparelho (HPLC), o que impossibilitou uma média de conteúdo por planta para esta espécie.

A relação entre o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol e o wMSDC, não se mostrou estatisticamente significativa, ou seja, não há relação entre o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol e a posição ocupada pela planta no gradiente de inundação (figura 10).

Tabela 1. Espécies estudadas em relação ao número de indivíduos encontrados ( $\geq 10$  cm DAP) em uma área total de 7,25 ha de inventários na RDS Mamirauá e perto de Manaus (Wittmann 2001, Schöngart 2003). O wMSDC, nível de médio de inundação calculado por espécie. A fenologia foliar está de acordo com Schöngart *et al.* (2002), bem como observações de campo de Oliveira-Wittmann (dados não publicados).

<b>Espécie</b>	<b>TOTAL (n amostral)</b>	<b>wMSDC (m)</b>	<b>wMSDC (dias ano<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fenologia Vegetativa</b>
<i>Psidium acutangulum</i>	26	<b>6,04</b>	<b>231</b>	Decídua
<i>Alchornea castaneifolia</i>	41	<b>5,89</b>	<b>228</b>	Decídua
<i>Vitex cymosa</i>	154	<b>5,85</b>	<b>219</b>	Decídua
<i>Tabernaemontana siphilitica</i>	21	<b>5,51</b>	<b>208</b>	Perenifólia
<i>Crescentia amazonica</i>	41	<b>5,51</b>	<b>208</b>	Perenifólia
<i>Macrobium acaciifolium</i>	13	<b>5,44</b>	<b>201</b>	Decídua
<i>Garcinia brasiliensis</i>	10	<b>5,2</b>	<b>176</b>	Perenifólia
<i>Crataeva bentharii</i>	175	<b>5,19</b>	<b>186</b>	Decídua
<i>Simaba multiflora</i>	15	<b>5,02</b>	<b>176</b>	Decídua
<i>Pouteria glomerata</i>	55	<b>4,87</b>	<b>170</b>	Perenifólia
<i>Laetia corymbulosa</i>	151	<b>4,84</b>	<b>167</b>	Perenifólia
<i>Pseudobombax munguba</i>	191	<b>4,77</b>	<b>155</b>	Decídua
<i>Zygia ampla</i>	12	<b>4,62</b>	<b>149</b>	Decídua
<i>Nectandra amazonum</i>	75	<b>4,6</b>	<b>148</b>	Decídua
<i>Pterocarpus amazonum</i>	16	<b>4,5</b>	<b>137</b>	Decídua
<i>Cecropia latiloba</i>	228	<b>4,43</b>	<b>133</b>	Perenifólia
<i>Annona hypoglauca</i>	2	<b>3,25</b>	<b>75</b>	Decídua
<i>Apeiba glabra</i>	17	<b>2,07</b>	<b>41</b>	-
<i>Erythrina fusca</i>	3	<b>2,0</b>	<b>35</b>	-

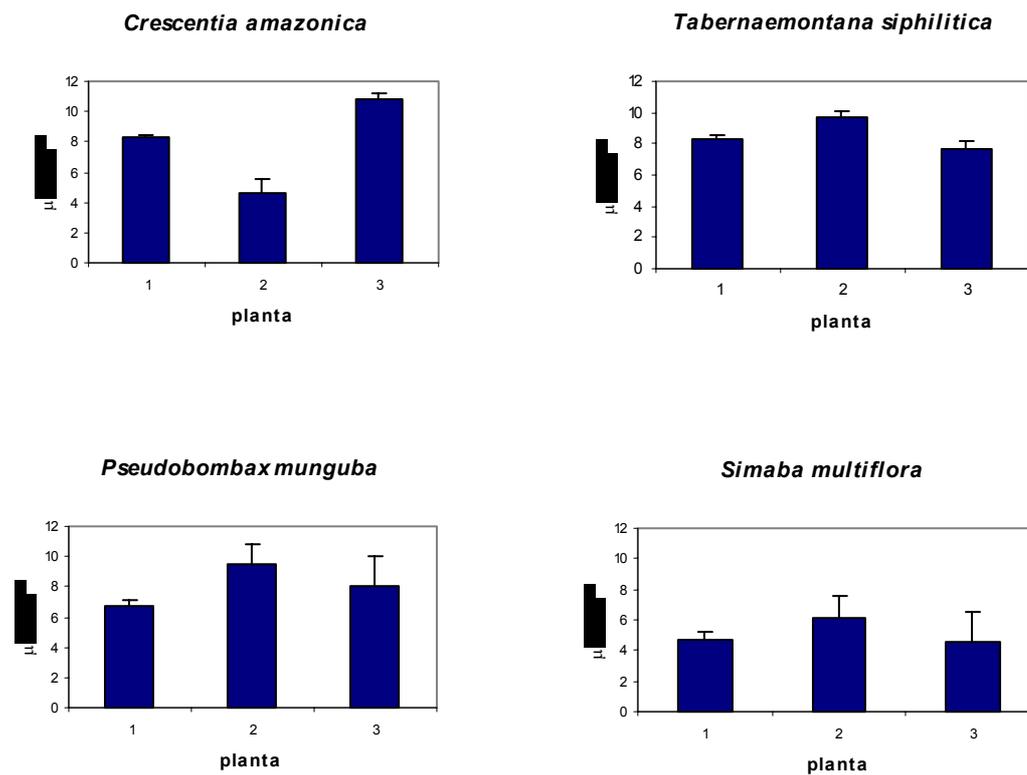


Figura 7. Grupo de espécies cujo conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol é  $\geq 6 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Os valores são médias com erro padrão ( $n = 3$ ).

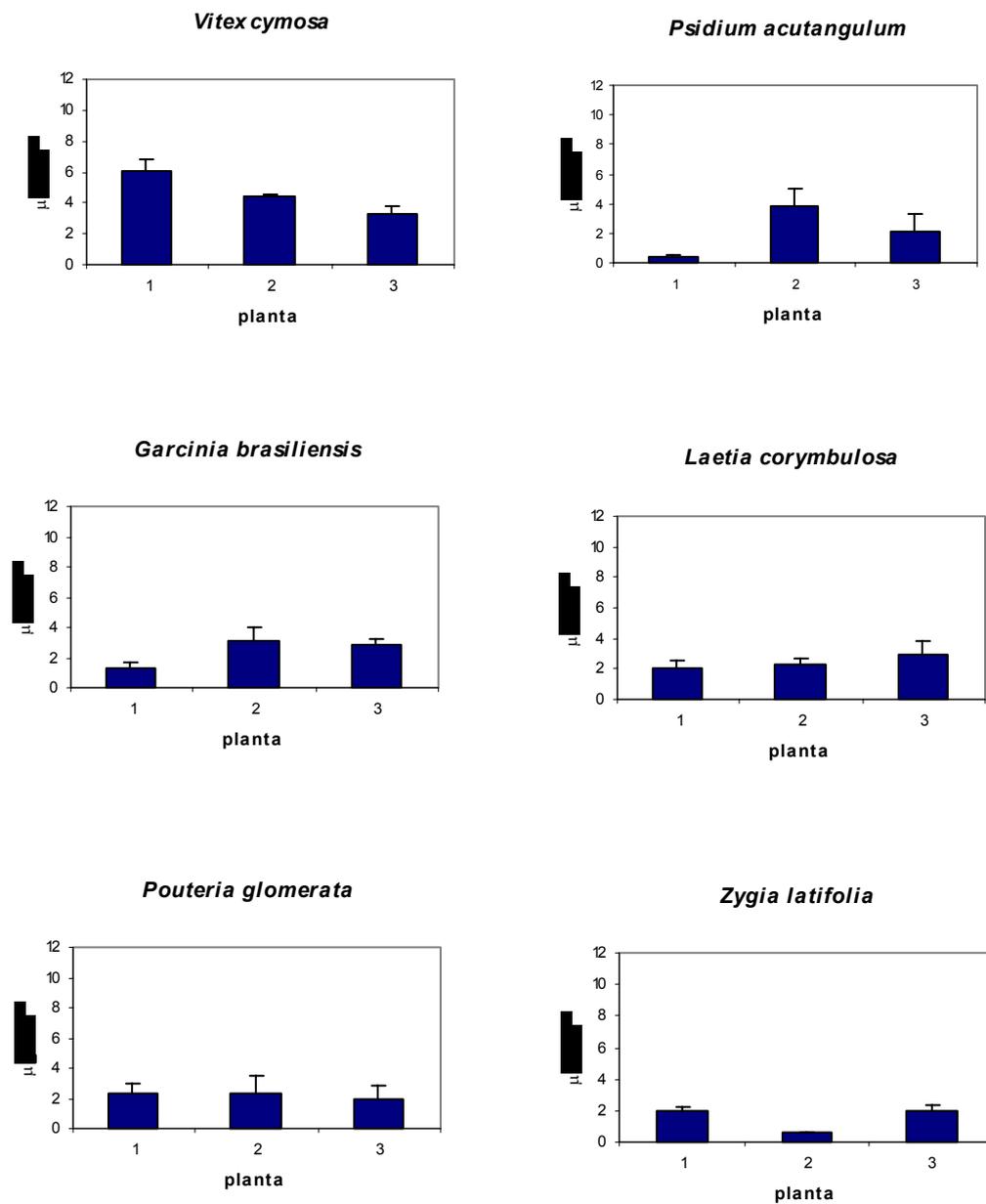


Figura 8. Grupo de espécies cujo conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol é  $< 6 > 2 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Os valores são médias com erro padrão ( $n = 3$ ).

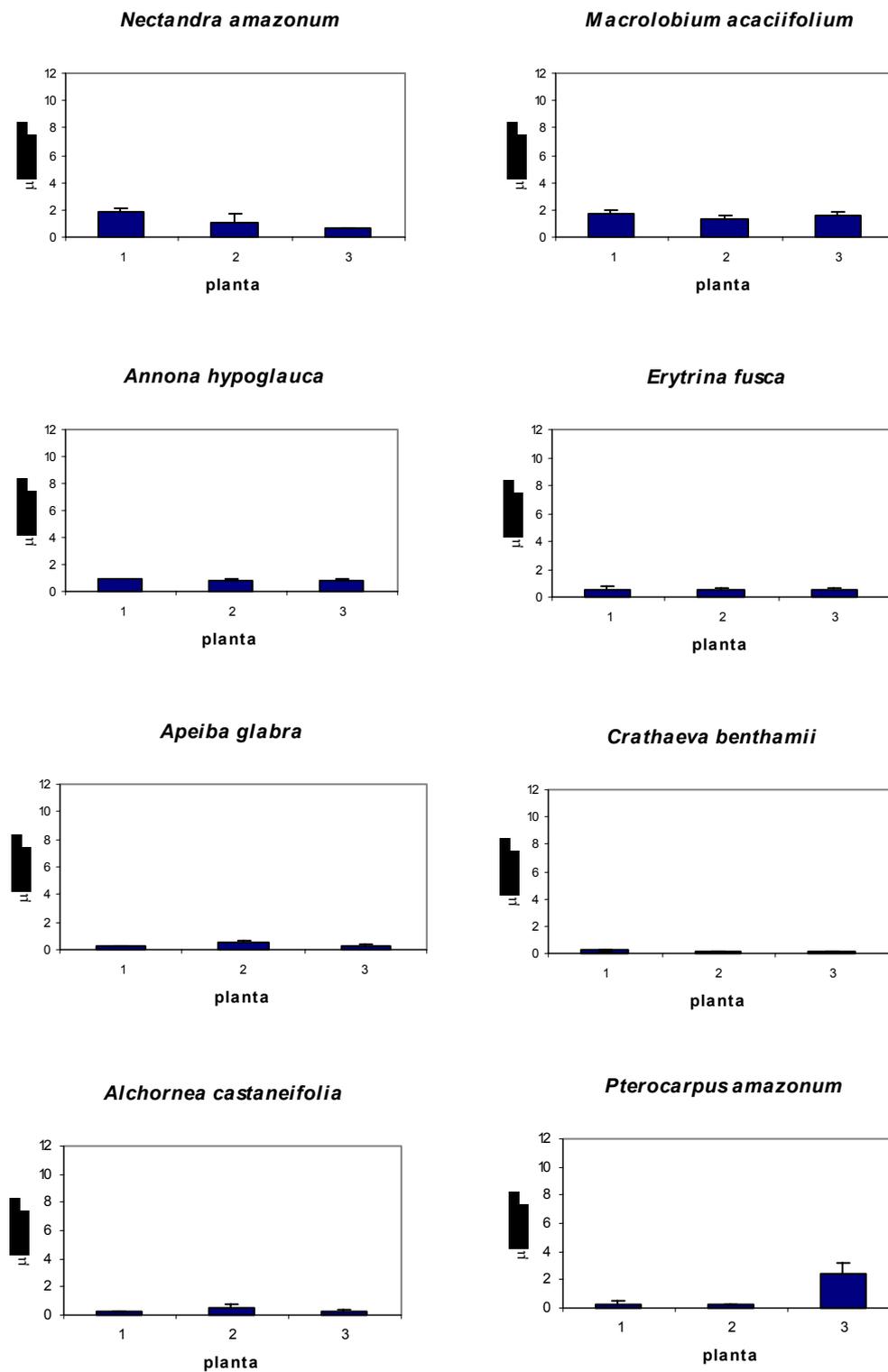


Figura 9. Grupo de espécies cujo conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol é  $\leq 2 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Os valores são médias com erro padrão ( $n = 3$ ).

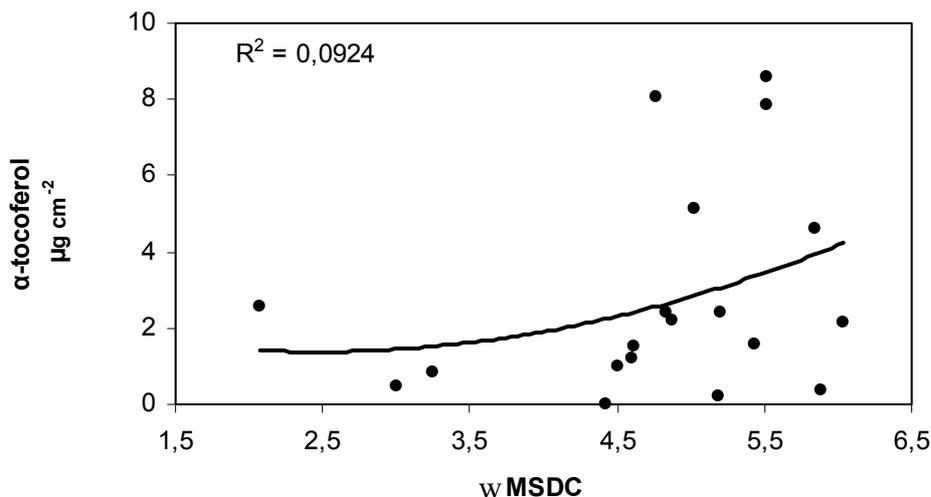


Figura 10. Relação entre o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol nas folhas e o wMSDC (nível de inundação), cada ponto representa uma das 18 espécies estudadas.

### 2.5.2 Conteúdo de Tococromanóis e Taxa de Crescimento

As espécies estudadas foram agrupadas em 3 grupos distintos: a) **crescimento lento**: aquelas que em 210 dias de observação eram menores que 60 cm de altura, b) **crescimento intermediário**: quando as espécies em 180 dias de observação tinham uma altura menor ou igual a 60 cm e c) **crescimento rápido**: espécies cujo crescimento em altura foi maior ou igual a 60 cm em 150 dias de observação (figuras 11, 12 e 13).

A escolha da altura em 60 cm foi baseada nos dados de incremento em altura obtidos por Parolin (2001a), para 6 espécies comuns das florestas de várzea. A maior altura observada foi 60 cm após 180 dias de observação para a espécie *Nectandra amazonum*, nas plantas do controle. O experimento foi realizado em Manaus e, segundo a autora, em condições ambientais que reproduziam a temperatura e umidade natural em que as espécies se encontram no campo.

A relação entre taxa de crescimento e conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol mostrou-se estatisticamente significativa ( $p = 0,02$ ) (figura 14). A espécie de crescimento mais rápido foi *Cecropia latiloba* que em 150 dias já apresentava mais de 1 m de altura, esta foi a espécie onde se observou menor conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol, uma vez que nem foi possível fazer uma representação gráfica de seu conteúdo. As demais espécies de crescimento rápido foram *Erythrina fusca*, *Nectandra amazonum*, e *Macrolobium acaciifolium*,

espécies que também se encontram no grupo de menor conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol (figuras 9 e 13).

As espécies com maior conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol *Crescentia amazonica*, *Tabernaemontana siphilitica*, *Pseudobombax munguba* e *Simaba multiflora*, encontram-se no grupo de espécies considerado de crescimento lento (figuras 7 e 11).

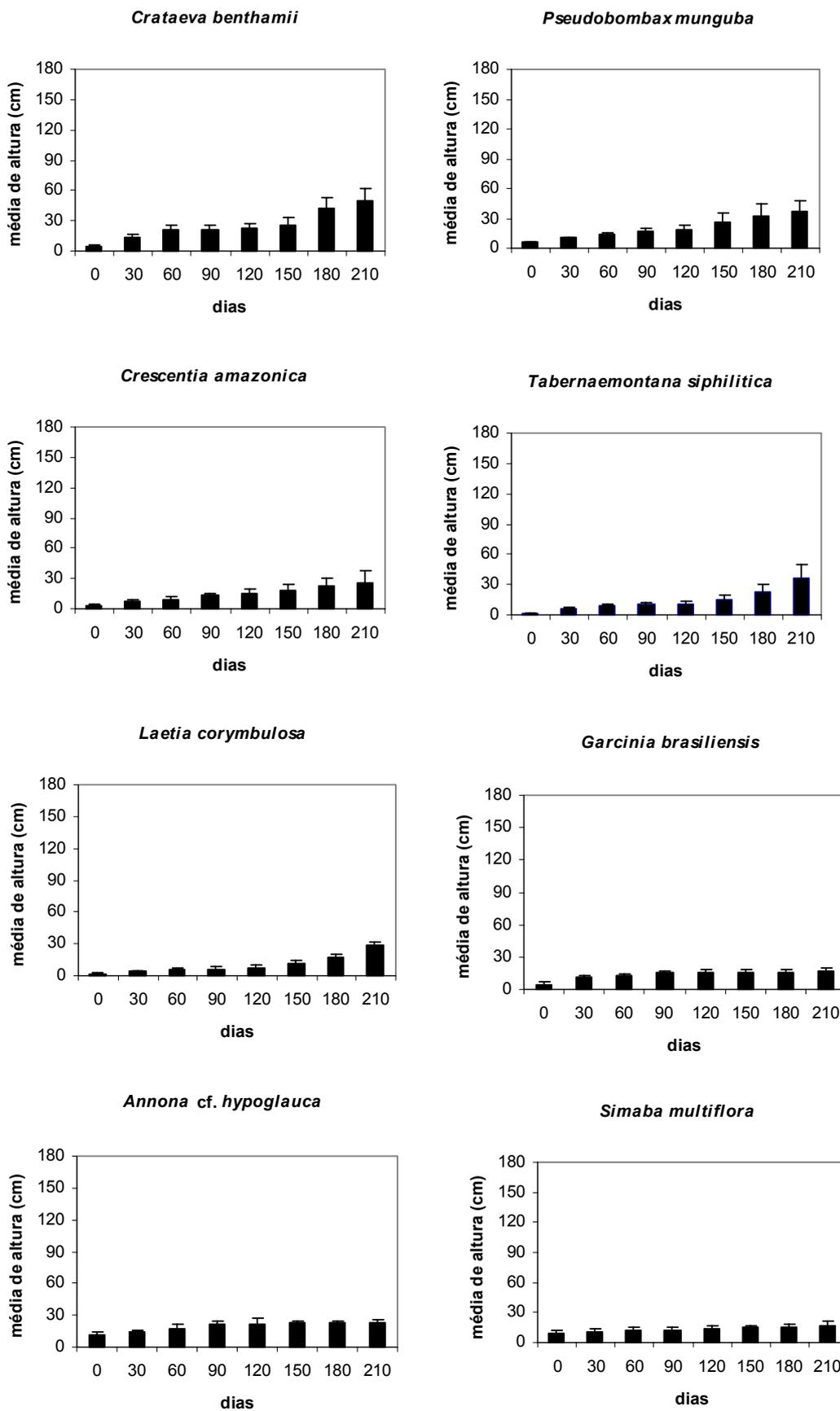


Figura 11. Grupo de espécies cujo crescimento em altura é lento (< 60 cm em 210 dias).

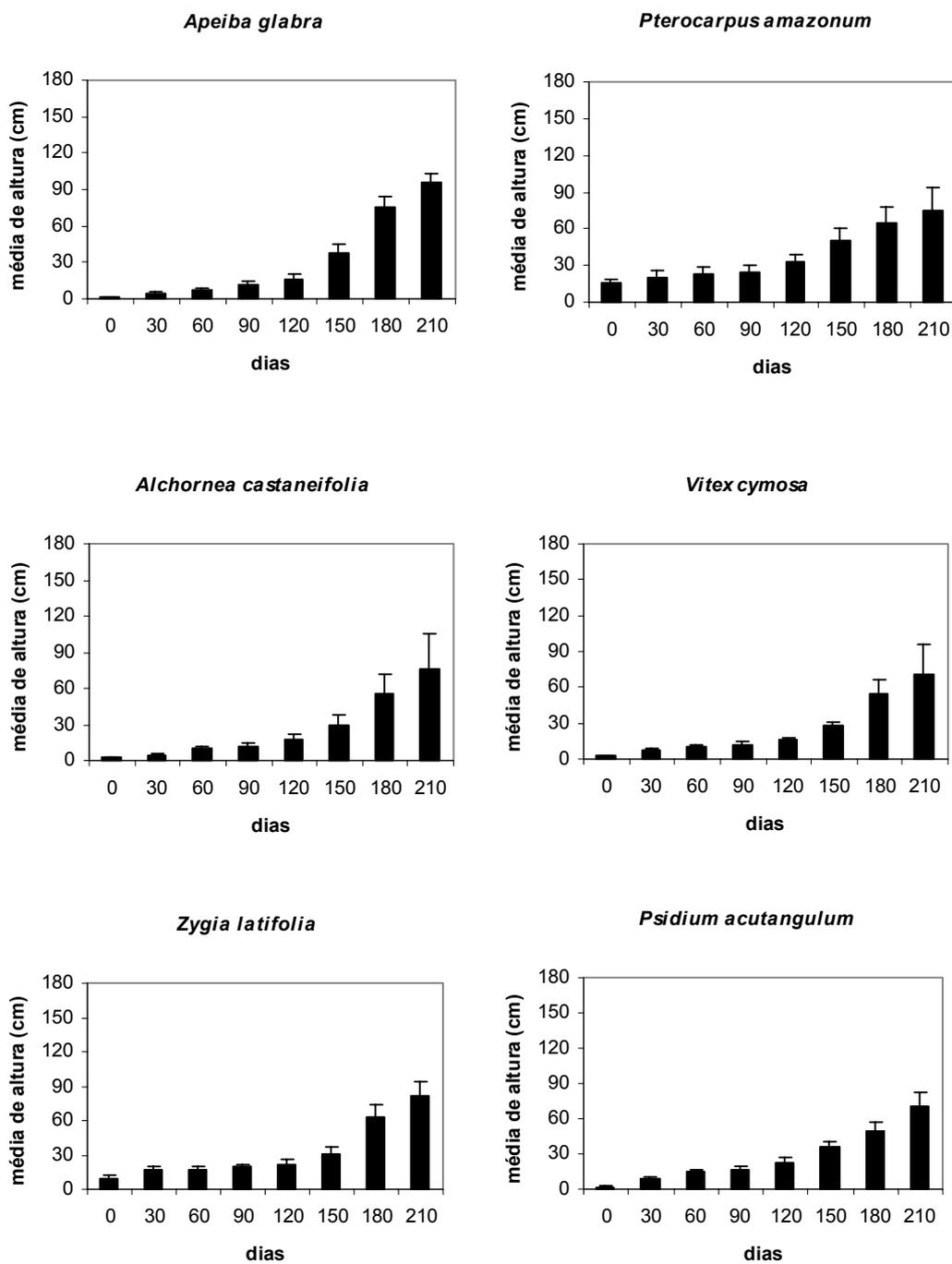


Figura 12. Grupo de espécies cujo crescimento em altura é intermediário ( $\geq 60$  cm em 180 dias).

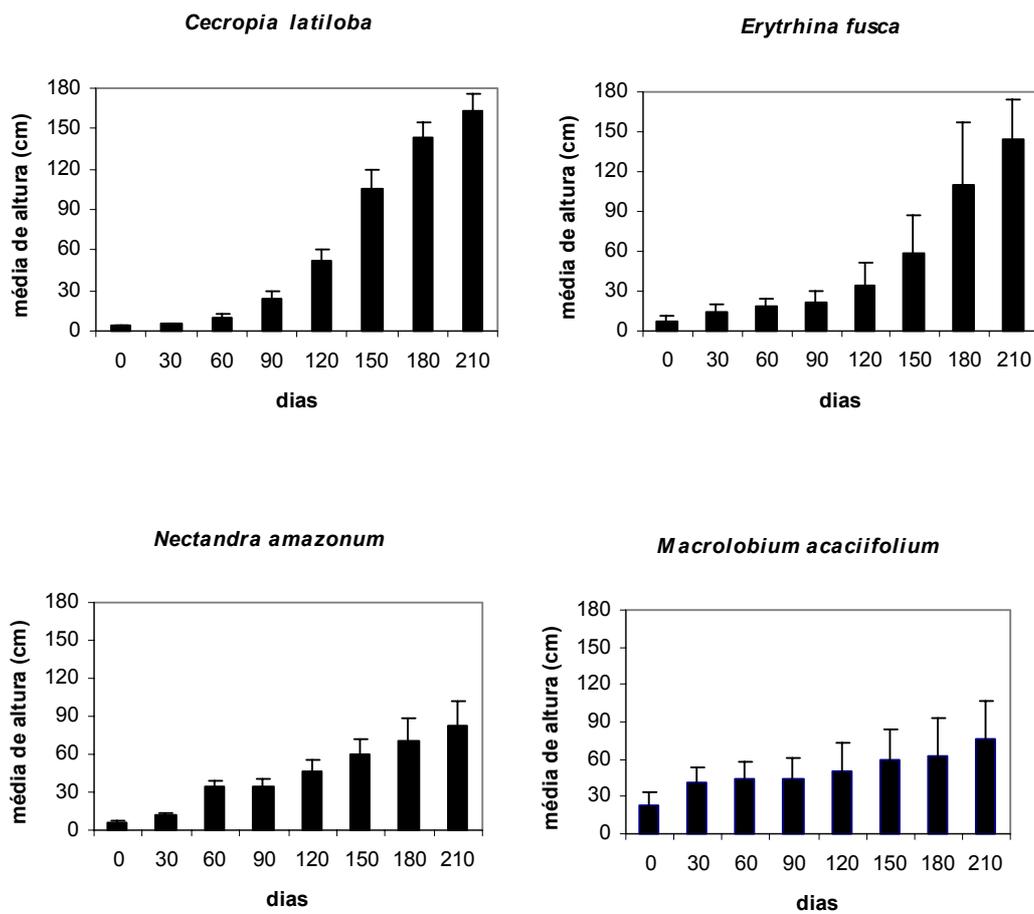


Figura 13. Grupo de espécies cujo crescimento em altura é rápido ( $\geq 60$  cm em 150 dias).

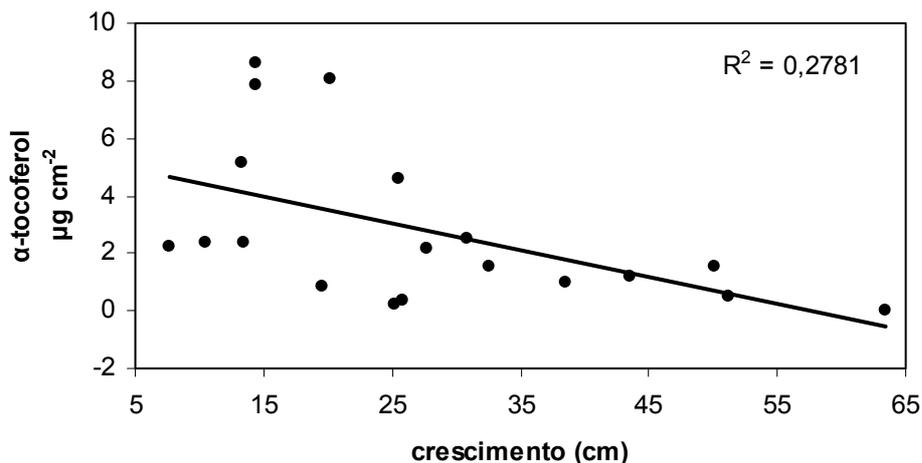


Figura 14. Correlação entre o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol e o crescimento em altura, cada ponto representa uma das 18 espécies estudadas ( $p = 0,02$ ).

### 2.5.3 Conteúdo de Tococromanóis no Látex

Dentre as 8 formas de vitamina E existentes (Munné-Bosch & Alegre 2002), a espécie *Garcinia brasiliensis* mostrou 7 formas ocorrendo no látex, são elas o  $\alpha$ -tocoferol/ $\alpha$ T,  $\alpha$ -tocotrienol/ $\alpha$ T3,  $\beta$ -tocoferol/ $\beta$ T,  $\gamma$ -tocoferol/ $\gamma$ T,  $\gamma$ -tocotrienol/ $\gamma$ T3,  $\delta$ -tocoferol/ $\delta$ T e  $\delta$ -tocotrienol/ $\delta$ T3 (figura 15). *Hevea brasiliensis* possui três destas formas:  $\alpha$ -tocoferol/ $\alpha$ T,  $\alpha$ -tocotrienol/ $\alpha$ T3 e  $\gamma$ -tocotrienol/ $\gamma$ T3 e *Tabernaemontana siphilitica* apresentou apenas 2 formas:  $\alpha$ -tocoferol/ $\alpha$ T e  $\alpha$ -tocotrienol/ $\alpha$ T3 (figura 15).

Os valores variaram entre as espécies e entre formas de vitamina E na mesma espécie. Em *G. brasiliensis* a variação foi de 0,02 mg cm<sup>-2</sup> no  $\beta$ -tocoferol a 7,4 mg cm<sup>-2</sup> no  $\delta$ -tocotrienol, sendo este o maior valor encontrado considerando todas as espécies e todas as demais formas de vitamina E. Na espécie *H. brasiliensis* o maior valor encontrado foi para o  $\alpha$ -tocotrienol/ $\alpha$ T3 0,11 mg cm<sup>-2</sup>, já em *T. siphilitica* o maior valor foi de 0,03 mg cm<sup>-2</sup> de  $\alpha$ -tocoferol/ $\alpha$ T (figura 15).

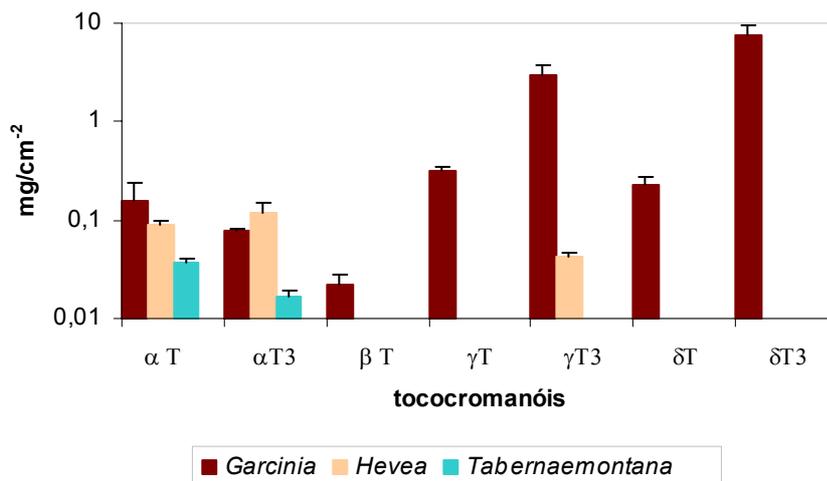


Figura 15. Conteúdo de tococromanóis (em escala logarítmica), observado no látex de três espécies, *Garcinia brasiliensis*, *Hevea brasiliensis* e *Tabernaemontana siphilitica*.

## 2.6 Discussão

### 2.6.1 Conteúdo de Tococromanóis em Folhas

Como esperado, em todas as espécies o  $\alpha$ -tocoferol foi encontrado nas folhas, uma vez que esta é a forma encontrada em maior quantidade nos tecidos verdes das plantas (Munné-Bosch & Falk 2004).

O incremento de  $\alpha$ -tocoferol é geralmente associado com a tolerância ao estresse, e o decréscimo está associado com a susceptibilidade ao estresse (Munné-Bosch & Alegre 2002). Todavia, no caso deste estudo, os conteúdos variáveis encontrados para as diferentes espécies não podem ser relacionados a uma condição de estresse, visto que todas as plantas se encontravam nas mesmas condições ambientais em casa de vegetação.

Os valores encontrados para as espécies do grupo a) com conteúdo  $\geq 6 \mu\text{g cm}^{-2}$ , são superiores a valores encontrados em folhas de outras vegetações descritos em literatura, por exemplo  $4 \mu\text{g cm}^{-2}$  para *Fagus silvatica* e  $0,4 \mu\text{g cm}^{-2}$  para *Nicotiana tabacum* (Lichtenthaler & Pfister 1978 e Andersen 2004). Isso demonstra que a produção de  $\alpha$ -tocoferol é variável dependendo da espécie.

As duas espécies com maior conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol, *Crescentia amazonica* e *Tabernaemontana siphilitica*, são espécies situadas em cotas baixas no ambiente natural e ambas são também Perenifólias. Entretanto, *Pseudobombax munguba*, *Simaba multiflora* e

*Vitex cymosa* espécies que se encontram também no grupo a), com conteúdo  $\geq 6 \mu\text{g cm}^{-2}$ , são espécies que perdem as folhas durante a inundação. Além disso, em *Alchornea castaneifolia* e *Crataeva bentharii*, espécies situadas em cotas baixas (tabela 1), o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol foi dos menores encontrados, o que resulta em rejeitar as duas hipóteses formuladas, ou seja, a correlação entre espécies decíduas ou Perenifólias não é estatisticamente significativa, da mesma forma que o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol observado nas folhas das diferentes espécies não está significativamente relacionado ao tempo de inundação a que cada espécie está sujeita no ambiente natural.

Para tentar entender melhor o que ocorre com as folhas e a produção de  $\alpha$ -tocoferol, faz-se necessário a realização de um experimento induzindo espécies Perenifólias à submersão para verificar se, sob tais condições, haverá incremento no conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol ou se os valores observados em condições ambientais de casa de vegetação permanecem os mesmos (tema do capítulo 3).

## 2.6.2 Taxa de Crescimento

*Cecropia latiloba* (pioneira dos primeiros estágios sucessionais e colonizadora de cotas baixas) e *Nectandra amazonum* (secundária amplamente distribuída), fugiram completamente das estratégias popostas por Parolin (2002). Contudo, é importante notar que no referido trabalho, embora tenha sido acompanhado o número considerável de 31 espécies, o crescimento em altura das plantas foi observado durante apenas 11 semanas. De acordo com Wittmann *et al.* (2002) e Schöngart (2003), nas cotas mais baixas do gradiente a inundação chega a 230 dias por ano, restando 4,5 meses (mais de 20 semanas) de fase terrestre, período no qual as plantas podem crescer antes da subida das águas.

Quando observadas as primeiras 11 semanas (77 dias) de crescimento das espécies (Parolin 2002), apenas duas espécies alcançaram mais de 30 cm de altura, foram elas *Nectandra amazonum* e *Macrobium acaciifolium*, ambas espécies de ampla distribuição no gradiente de inundação e não restritas a cotas elevadas.

Dentre as 19 espécies acompanhadas no presente estudo, apenas duas são restritas à várzea alta, *Apeiba glabra* e *Erythrina fusca*. A espécie *E. fusca* mostrou crescimento rápido alcançando alturas acima de 1 m em 180 dias de observação, corroborando a postulação de Parolin (2002). Entretanto, *A. glabra*, até 150 dias de observação, não havia alcançado sequer 60 cm, porém, após esse período, aos 180 dias, sua altura média era

próxima a 1 metro. Considerando que, de acordo com o tempo de inundação para diferentes cotas observadas por Wittmann et al. (2002) e Schöngart (2003), na várzea alta o tempo de inundação é em torno de 50 dias ao ano, esta espécie teria um período maior que 210 dias para crescer e fugir da submersão, tempo maior, inclusive, do que o período de observação do presente estudo.

Embora as taxas de crescimento em condições artificiais (casa de vegetação) possam não reproduzir exatamente a mesma velocidade de crescimento verificada para uma dada espécie no ambiente natural, para predizer que as taxas de crescimento estão relacionadas à situação das plantas no gradiente de inundação, é necessário um período de observações igual a duração da fase terrestre na natureza, ou seja, no mínimo 20 semanas (150 dias).

### 2.6.3 Conteúdo de Tococromanóis e Taxa de Crescimento

As plantas mostraram maior relação do conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol com o crescimento, do que com a posição das plantas no gradiente de inundação. A relação entre as taxas de crescimento e conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol foi estatisticamente significativa, ou seja, a maioria das espécies de crescimento lento apresentam maior conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol, quando comparadas às espécies de crescimento rápido (figura 14). Isto corrobora a teoria de Janiszwska & Pennock (1976), de que presumivelmente, o  $\alpha$ -tocoferol é consumido rapidamente pelas espécies de crescimento rápido e a síntese deste composto é processada de forma igualmente rápida.

J. Falk (com. pess.) considera que espécies de crescimento rápido apresentam maior conteúdo de água em suas folhas do que espécies de crescimento lento, o que acarretaria em uma quantidade menor de  $\alpha$ -tocoferol por unidade específica de área foliar.

Contudo, há algumas espécies que não podem ter seu crescimento relacionado ao conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol como mencionado por Janiszwska & Pennock (1976), uma vez que apresentam crescimento lento e baixo conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol. Neste sentido, o exemplo mais destoante é a espécie *Annona cf. hypoglauca*, que pode ser considerada como completa exceção à relação entre conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol e taxa de crescimento.

#### 2.6.4 Conteúdo de Tococromanóis no Látex

Como observado no *screening* das folhas, o  $\alpha$ -tocoferol é uma forma comum às três espécies *Garcinia brasiliensis*, *Hevea brasiliensis* e *Tabernaemontana siphilitica*. Tupy & Resing (1968) citam que no látex de *H. brasiliensis* o principal açúcar de ocorrência é a sacarose, cujo transporte é atribuído ao  $\alpha$ -tocoferol (Hofius *et al.* 2004). *H. brasiliensis* possui ainda o  $\alpha$ -tocotrienol encontrado em maior quantidade do que a forma  $\alpha$ -tocoferol, fato contrário ao descrito em literatura (Munné-Bosch & Alegre 2002), onde o  $\alpha$ -T é sempre a forma predominante (Goffman *et al.* 1999, DellaPenna 1999). Além desta forma ocorre também o  $\gamma$ -tocotrienol.

No látex de *G. brasiliensis* as formas encontradas em maior quantidade são  $\gamma$ -tocotrienol e  $\delta$ -tocotrienol, alcançando valores de uma escala de magnitude 1000 vezes maior do que as das demais formas. Valores desta natureza, próximos a  $9 \mu\text{g cm}^{-2}$ , não foram descritos em literatura anteriormente, pois de acordo com Whittle *et al.* (1966) o maior valor encontrado de  $\delta$ -tocotrienol foi  $4,2 \text{ mg cm}^{-2}$  no látex de *H. brasiliensis*. Hess (1993) cita ainda que os mais altos níveis de tococromanóis são usualmente encontrados em sementes.

Para *H. brasiliensis* não foi observada a ocorrência de  $\delta$ -tocotrienol neste estudo. Entretanto, no experimento de Whittle *et al.* (1966), o látex utilizado foi a forma comercial, enquanto que no presente estudo a análise foi feita com látex fresco retirado da folha. Possivelmente, por esse motivo, a composição de tococromanóis tenha se mostrado diferente.

É possível que a grande quantidade de formas e conteúdo de tocotrienóis encontradas no látex das espécies estudadas se deva a função antioxidante destes compostos, uma vez que segundo alguns autores estas formas de vitamina E têm ação similar ou até melhor do que os tocoferóis (Kamal-Eldin & Apelqvist 1996, Kamat *et al.* 1997).

Algumas famílias botânicas são conhecidas por apresentar látex, como é o caso das duas espécies em estudo que pertencem a família Apocynaceae (*Tabernaemontana siphilitica*) e Clusiaceae (*Garcinia brasiliensis*), e dentre as funções atribuídas ao látex produzido está a de bloquear ferimentos, além de ter papel relevante na defesa e proteção contra microorganismos e herbívoros (Castro & Machado 2003). Câmara *et al.* (2002)

investigaram o látex de *Clusia grandiflora*, outra Clusiaceae, e encontraram derivados de tocoferol que possuem ação antimicrobiana contra três microorganismos distintos.

Em florestas de várzea, as espécies sofrem herbivoria e predação de folhas, inclusive plântulas (Ziburski 1991), especialmente no início da fase aquática quando muitos grupos de insetos terrestres migram para a copa das árvores para fugir da inundação (Adis 1984), o que explicaria a necessidade de produção de defesa química das plantas que habitam as matas inundáveis, especialmente nas fases mais jovens e vulneráveis de seus ciclos de vida.

## 2.7 Conclusões

- Para enquadrar as espécies da floresta de várzea em um padrão de crescimento relacionado ao escape ou a tolerância à submersão prolongada, são necessários estudos que envolvam não apenas um grande número de espécies, mas um período amostral superior ao tempo disponível para o estabelecimento nas diferentes cotas.
- O conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol é variável para as diferentes espécies e está mais relacionado à taxa de crescimento do que com a posição ocupada pelas plantas de cada espécie no gradiente de inundação ou a estratégia de manutenção ou perda de folhas.
- O Látex das espécies de várzea apresenta tanto tocoferóis quanto tocotrienóis, porém a espécie *Garcinia brasiliensis* contém tococromanóis em quantidade e formas maior do que o das demais.

### 3. Experimento em Câmaras Climáticas

#### 3.1 Introdução

Nas florestas inundáveis da bacia amazônica, os organismos passam por períodos de inundação que variam de poucos a muitos meses. Junk *et al.* (1989) postularam a teoria do “Pulso de Inundação” (The Flood Pulse Concept), na qual os autores consideram que este pulso é a maior força controladora da biota nas florestas inundáveis, e, o fato de as inundações serem cíclicas, possibilitou aos organismos o surgimento de diversas adaptações e estratégias para utilizar eficientemente as fases aquática e terrestre. Segundo os mesmos autores cada planta tem sua posição ótima no gradiente, este ótimo, entretanto, pode variar com a mudança de fatores tais como: estabilidade, estrutura, fertilidade do substrato, nível da água no solo, e processos biogênicos. É importante ainda notar que o impacto da inundação é diferenciado para os distintos estágios de desenvolvimento pelos quais passa uma planta ao longo de sua vida.

Em função da inundação periódica decorrente do transbordamento dos rios na época da cheia, a água pode invadir centenas de metros mata à dentro. Por esta razão, plantas de pequeno porte, plantas jovens e plântulas provenientes de sementes recém germinadas permanecem em condições de submersão por vários meses seguidos, o que implica muitas vezes na ausência total de luz, em consequência da grande turbidez das águas dos rios barrentos (Coutinho & Struffaldi 1971). A penetração de luz nestes rios é limitada, apenas entre 25 e 40 cm de profundidade, medidos com disco de Secchi (Sioli 1984).

Durante a fase aquática, com uma inundação média de 5 m de coluna de água (Wittmann *et al.* 2004), as plântulas e indivíduos jovens ficam completamente submersos, enquanto que árvores ficam com parte do tronco alagado, mas as copas permanecem acima do nível da água (Waldhoff *et al.* 1998). Desta forma, as plântulas, quando comparadas a indivíduos adultos, sofrem maior impacto causado pela inundação.

Klinge *et al.* (1990) comentam que para colonizar os habitats de florestas inundáveis, a fase mais crítica para a regeneração é o estabelecimento de plântulas. A submersão completa é um fator relevante para o estabelecimento. Com a alta oscilação no nível do rio, plantas no início do estabelecimento não podem evitar um período mais ou menos prolongado de submersão total (Parolin 2001), que, dependendo da cota da

inundação, pode passar de 6 meses ao ano (Junk 1989, Oliveira 1998, Wittmann *et al.* 2002 e 2004), como já visto para algumas espécies no capítulo 2. Além disso, no ambiente natural estes indivíduos suportam a alta dinâmica geomorfológica associada aos rios, que envolve processos de sedimentação e erosão (Junk 1984, Puhakka *et al.* 1993).

A situação das plântulas e indivíduos juvenis nestas florestas durante a fase aquática é de total ausência de luz, a coluna de água está sobre toda a planta, o oxigênio está reduzido, e a sedimentação pode até cobrir toda a planta (Coutinho & Struffaldi 1971, Junk 1984, Waldhoff *et al.* 1998 & Parolin 2002).

Por outro lado, quando se fala de florestas inundáveis na Amazônia, não se imagina que plantas possam sofrer com a falta de água, entretanto, segundo Junk (1989) e Junk & Piedade (1997), um dos fatores mais importantes que afetam a distribuição de espécies nas comunidades destas florestas não é só a duração da fase aquática, mas também a duração da fase terrestre.

Durante a fase terrestre, que pode variar de alguns dias a alguns meses, plântulas e espécies herbáceas que colonizam áreas abertas podem sofrer fortemente com a estação de estiagem. Esta pressão ambiental, varia em função da quantidade de água que o solo consegue reter, e da distribuição de chuvas ao longo deste período, uma vez que o padrão de chuvas pode variar fortemente de ano para ano (Junk & Piedade 1997).

Na Amazônia Central a precipitação anual média é de 2100 mm, ocorrendo um período seco bem distinto entre junho e novembro, com chuvas abaixo de 100 mm ou até 50 mm por mês (Schöngart *et al.* 2002). Diante deste quadro, existe uma questão intrigante: **como pode uma plântula sobreviver, sob tais condições, de uma fase aquática a outra?**

A partir desta pergunta, e com a finalidade de contribuir com o conhecimento sobre os condicionantes ambientais para o estabelecimento nas florestas de várzea, este estudo objetivou eleger, dentro do universo de fatores que afetam a sobrevivência destas plantas neste ambiente, a questão da produção de tococromanóis como possíveis auxiliares na tolerância às condições impostas pelo ambiente.

Além da indispensável função antioxidante do  $\alpha$ -tocoferol, detalhada no capítulo 1, Kruk *et al.* (2005) apresentam a idéia de que em condições de fotoinibição o  $\alpha$ -tocoferol atua especialmente como um eliminador de oxigênio singlete no fotossistema II de forma a prevenir o estresse oxidativo.

Deste modo, considerando suas funções, os níveis de  $\alpha$ -tocoferol mudam diferencialmente em resposta às limitações ambientais, dependendo da magnitude do estresse e da sensibilidade de cada espécie ao estresse (Munné-Bosch 2005).

### 3.2 Objetivos

Com o objetivo de verificar a tolerância de três espécies à condições controladas de possível estresse, realizou-se um experimento mediante a simulação das condições do ambiente natural.

Para a realização deste estudo foram selecionadas três espécies arbóreas do estágio sucessional secundário de florestas de várzea: *Garcinia brasiliensis* Mart. (Clusiaceae), *Laetia corymbulosa* Spruce ex Benth. (Flacourtiaceae) e *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk. (Sapotaceae).

#### 3.2.1 Objetivos Específicos:

a) verificar os efeitos da inundação, escuro e seca nas três espécies no conteúdo de vitamina E e compará-los com aqueles encontrados no *screening*.

b) medir a fluorescência de clorofila a em cada uma das condições impostas às plantas;

c) observar possíveis variações anatômicas em folhas de mesmo estágio de maturação sob duas condições: plantas submetidas à inundação artificial por 4 meses e plantas de casa de vegetação.

d) quantificar a produção de folhas nos tempos inicial e final do experimento e observar a recuperação das plantas após a saída das câmaras climáticas;

### 3.3 Hipóteses

Considerando os objetivos acima descritos foram elaboradas as seguintes hipóteses:

a) O conteúdo de vitamina E será maior nas folhas das plantas que se encontram sob a condição de submersão.

b) O conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol aumentará com o tempo de exposição das plantas aos tratamentos.

c) A relação  $F_v/F_m$  será menor nas plantas que se encontrarem sob condições de escuro e submersão.

d) Ocorrerão alterações na anatomia foliar das três espécies em função da inundação e da ausência de luz.

### **3.4 Material & Métodos**

#### **3.4.1 Casa de Vegetação**

Dentre as 19 espécies da várzea amazônica disponíveis em casa de vegetação (conforme lista constante no capítulo 2), foram selecionadas as espécies para o experimento de inundação artificial. A escolha das espécies foi feita em função de 2 motivos: 1) espécies que mantêm as folhas sob condições de inundação (perenifólias); e 2) número de indivíduos suficiente para realização do experimento.

Isto foi necessário uma vez que os parâmetros a serem monitorados neste experimento foram o conteúdo de tococromanóis, que são encontrados em maior quantidade nas partes verdes das plantas (Munné-Bosch & Alegre 2002), e medidas de fluorescência da clorofila a. Apenas 3 espécies atenderam aos requisitos descritos acima: *Garcinia brasiliensis*, *Laetia corymbulosa* e *Pouteria glomerata*.

Neste estudo trabalhou-se com plantas juvenis com menos de um ano de idade, pois, no ambiente natural, este é o estágio no qual as plantas, após a germinação, sofrem mais severa e prolongada exposição à inundação total, em função de sua altura, mesmo aquelas espécies que crescem rápido e atingem 70 a 80 cm de altura durante a fase terrestre. Todavia *G. brasiliensis* e *P. glomerata*, mesmo ao final do experimento, ainda apresentavam a semente junto à raiz, o que as caracteriza como plântulas no sentido fisiológico.

##### **3.4.1.1 Contagem e Marcação das Folhas**

Antes de iniciar o experimento, todas as folhas de cada planta receberam uma plaqueta plástica com número de identificação, para possibilitar o reconhecimento das folhas formadas após o início do experimento (figura 1).

Após o término do experimento, as plantas que se encontravam nas câmaras climáticas foram levadas de volta à casa de vegetação e verificou-se sua capacidade de recuperação em função da produção de folhas novas. A contagem do número de folhas foi

feita no dia 0 (zero), com as plantas ainda na casa de vegetação, bem como ao final do experimento, um mês após seu retorno das câmaras climáticas, dia 169.



Figura 1. Plântulas em casa de vegetação, indivíduos de *Garcinia brasiliensis* (A), detalhe da marcação nas folhas de *Pouteria glomerata* (B) aspecto geral das duas espécies (C).

### 3.4.2 Câmaras Climáticas

O experimento denominado “inundação artificial” foi montado utilizando-se duas câmaras climáticas na Universidade de Kiel. Cada câmara mede 7m<sup>2</sup> de área, e nelas é possível controlar as condições de luz, umidade e temperatura (figura 2).



Figura 2. Vista externa da Câmara Climática, mostrando painel de controle das condições ambientais à direita (A), e vista interna com as plântulas e os tanques para o experimento de inundação artificial (B).

#### 3.4.2.1 Câmara Climática 1

A Câmara climática 1 foi utilizada para manter as plântulas sob duas condições distintas: **Inundação Artificial** e **Escuro**

Os tratamentos foram montados em 4 réplicas, com 12 plântulas por tratamento, quatro indivíduos por espécie (figura 3). Nesta câmara ficaram dois tratamentos distintos, a) inundação artificial seguida de total ausência de luz e b) sem inundação seguida de total ausência de luz, ficando os tratamentos denominados como acima escrito: a) **Inundação Artificial** e b) **Escuro** (figura 3).

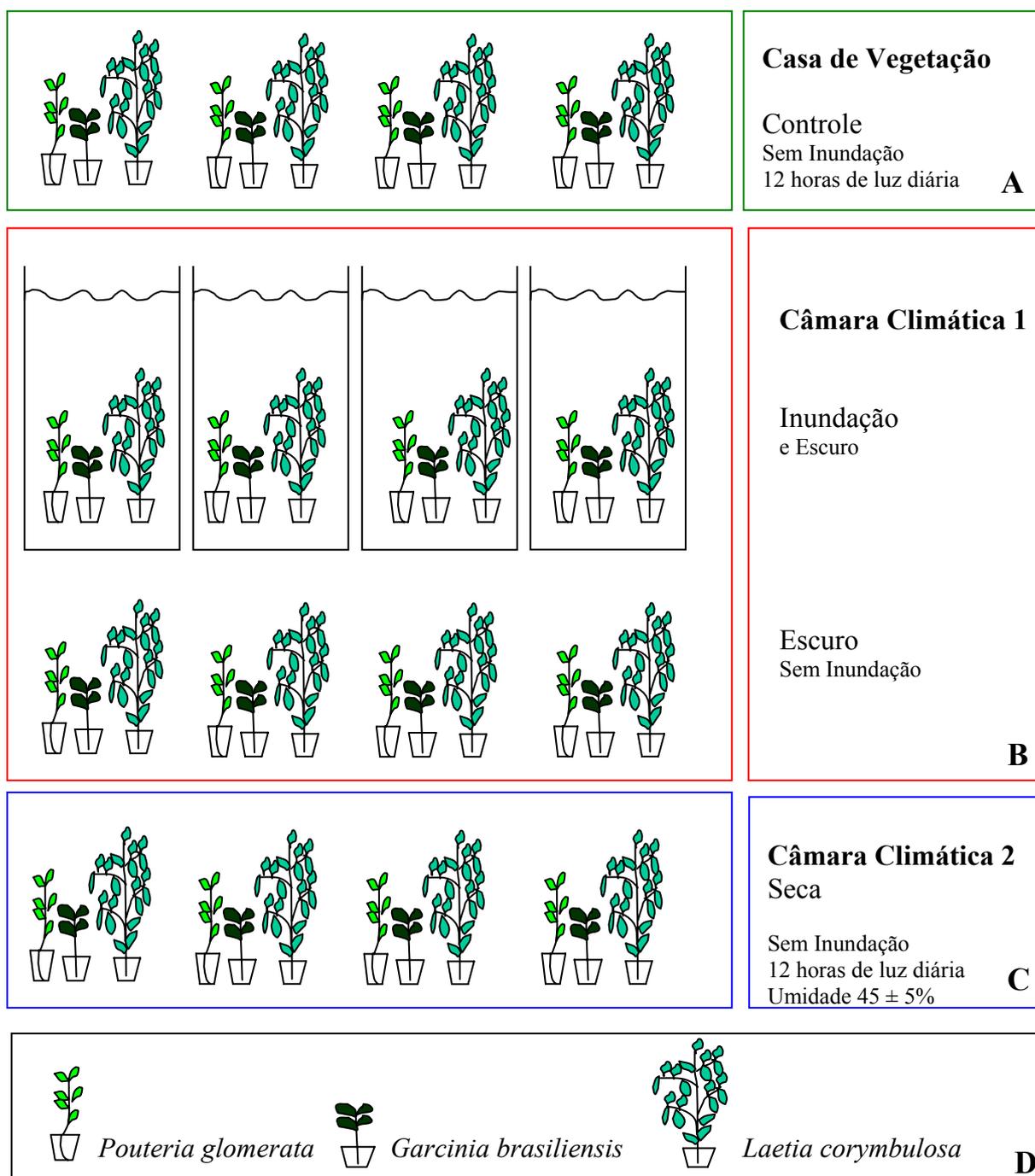


Figura 3. Esquema mostrando a situação das plantas durante o experimento. Plantas na casa de vegetação (A); os dois grupos de plantas na câmara climática 1, um sob inundação artificial total e escuro, e outro apenas sob condição de escuro (B); plantas na câmara climática 2, sob condições de seca (C); legenda indicando as três espécies utilizadas neste experimento (D).

As condições nesta câmara foram as seguintes: temperatura a 28°C, umidade relativa de 80%, luminosidade de 110 a 170  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}$ , provida por 60 tubos fluorescentes (1,5 m de comprimento) com 12 horas de fotoperíodo até a inundação completa das plantas. Após 24 horas de submersão das plântulas, as luzes foram desligadas e permaneceram assim por 120 dias.

O experimento de inundação artificial foi desenhado de forma a simular o que ocorre em condições naturais. Foram instalados quatro tanques com capacidade de 500 L cada um, equipados com filtros de movimentação da água, um para cada tanque. Em cada tanque foram colocados 3 indivíduos, um de cada espécie (figura 3), e a submersão se deu de forma gradativa com o nível da água subindo 10cm/dia (figura 4). Após 24 horas de completa submersão das plântulas, a luz foi desligada e esta condição de **escuro** durou 4 meses. Ao final destes 4 meses a descida da água também foi gradativa, baixou os primeiros 10 cm e 24 horas após a descida da água a luz foi religada.

A condição de escuridão só foi imposta às plantas após 13 dias de inundação, assim, a partir da imposição do escuro às plantas, as datas de coleta de material foliar foram estabelecidas: após 24 horas sem luz, uma semana, um mês e assim por diante. Nos gráficos será usado o período referente a duração da escuridão, conforme o período de coletas estabelecido (30 dias de escuridão = 43 dias de inundação) (tabela 1).

Nesta câmara, foi colocado um segundo grupo de plântulas com o mesmo número de indivíduos por espécie (n=4), que ficaram fora dos tanques (figura 3). Estas plantas receberam rega uma vez ao dia, pela manhã.

Como grande parte do experimento foi realizada no escuro, as coletas de material foliar durante o período de escuridão foram feitas com luz verde. Para evitar confusões no momento da coleta, ao vaso de cada espécie foi amarrado um fio colorido que se repetia nos quatro tanques, para *G. brasiliensis* vermelho, para *L. corymbulosa* amarelo e para *P. glomerata* azul (figura 4).

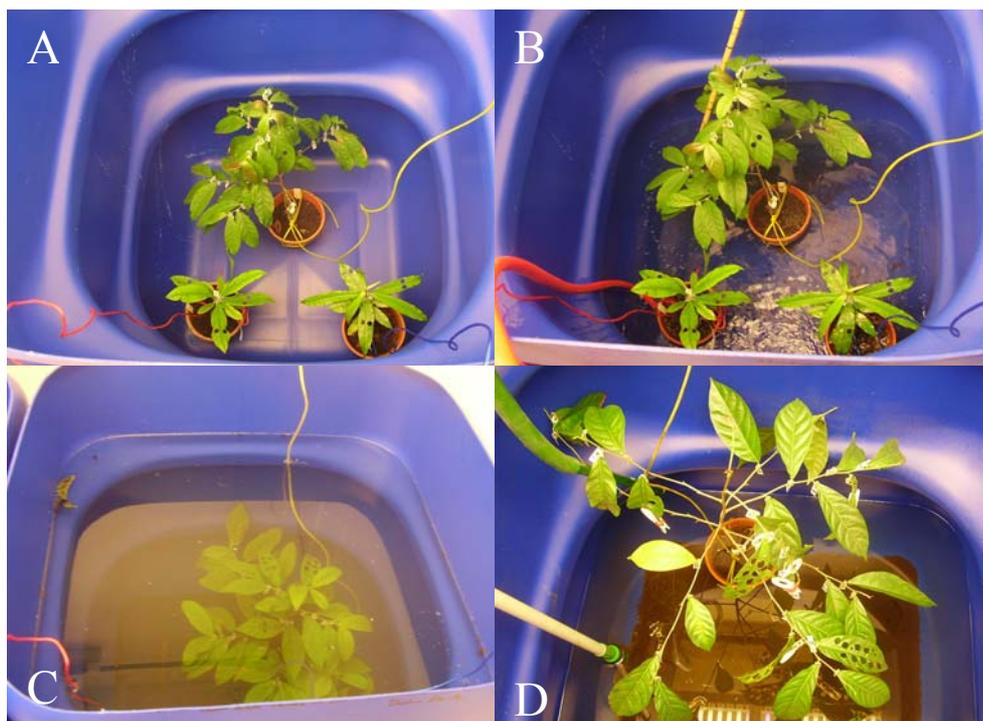


Figura 4. Tanques plásticos de 500 l onde foram alocadas as plantas para experimento de inundação artificial, antes do início da inundação (A), após os primeiros 10 cm de inundação (B), completamente submersas (C) e após 4 meses de inundação a descida gradativa da água (D).

### 3.4.2.2 Câmara Climática 2

A Câmara climática 2 foi utilizada para manter as plântulas sob a condição de controle, mantendo as mesmas condições da câmara climática 1, entretanto, sem inundação e sem a retirada de luz. Porém, passados 30 dias de experimento observou-se que o aspecto das plantas não correspondia ao esperado no controle, isto indicava que as condições não eram as ideais. Assim, decidiu-se medir a temperatura, a umidade e a luz dentro da câmara por 72 horas em intervalos de 5 minutos (SQUIRREL METER/LOGGER 1000 series Grant Cambridge, Reino Unido). Ao final deste período descobriu-se que o controle de umidade relativa estava quebrado e as condições vigentes de umidade não poderiam ser alteradas. As plantas, até aquele momento, encontravam-se sob baixa umidade relativa, metade da umidade existente na câmara climática 1. Dadas as condições, a partir daí, considerou-se que este passaria a ser um tratamento de *seca*.

As condições da câmara climática 2 foram as seguintes: a temperatura de 28°C, a umidade relativa variando entre 40 a 50 %, a luminosidade de 110 a 170  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

providos por 60 tubos fluorescentes (1,5 m de comprimento) com 12 horas de fotoperíodo, durante todo o experimento.

Na câmara climática 2 foram colocadas 12 plântulas, quatro indivíduos por espécie (figura 3). Estas plantas receberam rega uma vez ao dia pela manhã.

### **3.4.2.3 Coleta de Material Foliar**

Para medir o conteúdo de vitamina E existente nas folhas das plântulas, foram retirados cilindros da lâmina foliar com  $0,78 \text{ cm}^2$  de área. Em cada indivíduo foram amostradas 3 folhas e de cada folha um cilindro foi retirado. Ao todo, em cada dia de coleta foram feitas 12 amostras por espécie e 36 amostras por tratamento.

O procedimento para extração de tococromanóis foi o mesmo descrito anteriormente para o “Screening” (capítulo 2).

Como é possível que o conteúdo de vitamina E varie com as mudanças de condições ambientais das plantas, tais como a intensidade luminosa, ou com a quantidade de água disponível, entre outros fatores (Munné-Bosch & Alegre 2002), as amostras foram coletadas levando-se em consideração os possíveis períodos de eventuais modificações na quantidade de tocoferóis e tocotrienóis produzidos (tabela 1).

Em todas as condições em que se encontravam as plantas a água utilizada foi de chuva, tanto para a inundação artificial, quanto para a rega das plantas que se encontravam fora dos tanques.

Ao final da inundação as plantas permaneceram fora dos tanques por 5 dias na câmara climática e em seguida retornaram à casa de vegetação, local de onde haviam saído no início do experimento.

Tabela 1. Dia referente a cada coleta. A partir do 14º dia as coletas foram vinculadas ao período em que as plantas se encontravam sem luz. Ao final do experimento nas câmaras climáticas, acompanhou-se a recuperação das plantas na casa de vegetação.

Dia de coleta	Condição da Inundação	Condição de Luz
0	Plantas na casa de vegetação	
3	Terceiro dia de inundação	
7	Uma semana de inundação	
10	Submersão completa	
14		24 horas de escuro
21		Uma semana de escuro
30		Um mês de escuro
60		Dois meses de escuro
90		Três meses de escuro
120		4 meses de escuro
123	Diminuição de 20 cm na coluna de água	24 horas com luz
125		72 horas com luz
132	Plantas sem inundação	
139	Dois dias na casa de vegetação	
169	Um mês na casa de vegetação	

### 3.4.3 Fluorescência da Clorofila *a*

Simultaneamente às coletas para medidas de conteúdo de vitamina E, foram feitas medidas de fluorescência da clorofila *a* com Pulse Amplitude Modulation (PAM), utilizando-se “DIVING PAM Underwater Fluorometer 2000” (WALZ, Alemanha), com capacidade para medidas embaixo da água. As folhas escolhidas para tais medidas foram as mesmas das quais se retirou amostras para análise do conteúdo de tococromanóis e o n amostral também foi o mesmo, três folhas por indivíduo.

O parâmetro investigado foi a razão  $F_v/F_m$ : eficiência intrínseca (Maxwell & Johnson 2000) ou a capacidade fotoquímica corrente do fotossistema II - PSII (Bolhàr-Nordenkampf & Götzl 1992), onde  $F_v$  é a fluorescência variável (fluorescência mínima ( $F_0$ ) menos fluorescência máxima ( $F_m$ )).  $F_v/F_m$  é um parâmetro que mede o máximo relativo da taxa de transporte de elétrons ( $ETR_{max}$ ) do PSII (Krause & Weis 1991; Schreiber *et al.* 1994).

Durante as medidas foram utilizados “clips” (Dark Leaf Clip DIVING-LC WALZ Alemanha), para impossibilitar qualquer passagem de luz, ou seja, adaptar as folhas ao

escuro. Os clips foram colocados na lâmina foliar e após 30 minutos foram feitas as medidas com o PAM 2000.

Em plantas verdes, o máximo quantum produzido do Fotossistema II é observado após a adaptação ao escuro, quando todos os centros de reação estão abertos (receptores primários oxidados) e a dissipação de calor é mínima. Assim, a saturação induz a máxima fluorescência produzida,  $F_m$ , e a máxima fluorescência variável,  $F_v$ , sendo que  $\Delta F/F_m = F_v/F_m$  é máximo. O  $F_v/F_m$  como uma real medida do potencial de quantum produzido pelo fotossistema II, é diminuído pela inibição dos centros de reações do fotossistema II, causando aumento da dissipação de calor. Neste contexto a fotoinibição é particularmente relevante.

O valor da capacidade fotoquímica corrente  $F_v/F_m$  foi calculado de acordo com Bolhàr-Nordenkampf & Götzl (1992), onde, folhas saudáveis normalmente apresentam valores  $F_v/F_m$  entre 0,6 e 0,8, e valores abaixo indicam dano estrutural no PSII calculado. Estes danos podem ser reversíveis, acima de 0,3 ou irreversíveis abaixo de 0,3.

#### **3.4.4 Análise Microscópica da Anatomia Foliar**

Das três espécies utilizadas, foram coletadas partes da lâmina foliar na região mediana, de plantas que estavam a 140 dias completamente submersas; concomitantemente, foram coletadas parte da lâmina foliar de plantas da mesma espécie que permaneceram na casa de vegetação (controle).

Após 140 dias de experimento, as plantas já haviam sofrido a inundação gradativa até a completa submersão e passado por 120 dias de escuridão na câmara climática, e, mesmo havendo iniciado a descida gradativa da coluna de água, todas as partes da lâmina foliar coletadas foram de folhas que ainda permaneciam submersas.

Para a fixação química do material os pequenos pedaços cortados da lâmina foliar foram colocados em solução de 2% de paraformaldeído, 2,5% glutaraldeído 0,1 M, tampão cacodilo 0,2 M. A infiltração durou 10 minutos em 400 mbar em 4°C. Para as coletas de lâmina foliar foram usadas três plantas de cada espécie e três folhas por indivíduo.

Os cortes anatômicos foram feitos em Ultramicrótomo (UCT, Leica, Bensheim, Alemanha), corados em azul de Toluidina (0,05 %) e analisados em microscópio óptico Microscópio-câmera-software-Leica (Leica DMLS Mikroskop, Câmera Leica DC 300F, Software Leica Image Manager- Heerbrugg, Suíça).

### 3.4.5 Raízes Adventícias em Folhas

Com o fim do período de escuridão na câmara climática 1, observou-se que algumas folhas de *L. corymbulosa* haviam formado raízes adventícias. Como até este momento não havia registro em literatura de qualquer espécie arbórea de várzea produzir tal tipo de estrutura nas folhas, estas foram plantadas.

O plantio das folhas foi feito em terra TKS2 Instant, misturada a pequenas bolas de poliuretano, para possibilitar maior aeração do solo e ajudar a fixação das raízes ao solo. A terra foi disposta em bandeja plástica e coberta com tampa plástica perfurada para ajudar a manter a umidade (figura 5).



Figura 5. Plantio das folhas encontradas nos tanques com formação de raízes adventícias. Detalhe das folhas e da terra misturada ao poliuretano (A), e bandeja coberta com tampa perfurada para a manutenção da umidade (B).

### 3.4.6 Análise de Dados

Foi aplicado o teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ), para comparação entre os 4 tratamentos. Para as espécies *Pouteria glomerata* e *Laetia corymbulosa*, em algumas datas, não foi possível realizar o teste para os tratamentos escuro e seca, pois as plantas haviam perdido as folhas. O mesmo ocorreu para a espécie *Garcinia brasiliensis* no tratamento seca após 90 dias de experimento, embora a espécie não tenha perdido as folhas, o aspecto não era o mesmo das plantas dos demais tratamentos, por este motivo não se procedeu mais a coleta de material.

Para verificar se o tempo afetava o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol ou  $\delta$ -tocotrienol dentro de cada tratamento, foi aplicado o teste não paramétrico de Friedman.

O programa SYSTAT 10.2 foi utilizado para todas as análises deste experimento.

### 3.5 Resultados

#### 3.5.1 Conteúdo de $\alpha$ -tocoferol entre os Tratamentos

As análises estatísticas foram feitas para todos os dias de coleta, entretanto não houve diferença significativa para a maioria dos dias, quando se compara os diferentes tratamentos em cada uma das espécies. Assim, alguns dias foram selecionados para demonstrar graficamente os resultados, foram eles: 0, 30, 120, 125, 139 e 169 dias de experimento.

No dia zero, não houve diferença significativa do conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol para as três espécies, visto que nesta data todas as plantas se encontravam na casa de vegetação, e possuíam em média menos de  $3 \mu\text{g cm}^{-2}$  de  $\alpha$ -tocoferol (figuras 4 A, 5 A e 6 A).

Na espécie *Garcinia brasiliensis* os testes mostraram diferenças significativas nos dias 120, 125 e 169. No dia 120 as plantas da casa de vegetação apresentaram maior conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol do que as plantas do escuro e da inundação. No dia 125 as plantas da casa de vegetação apresentaram maior conteúdo em relação às plantas da inundação.

Um mês após o final do experimento, no dia 169, as plantas da casa de vegetação e as plantas do tratamento de seca apresentaram maiores conteúdos em relação às plantas que se encontravam no escuro; os dois grupos de plantas mostraram valores maiores do que  $6 \mu\text{g cm}^{-2}$  de  $\alpha$ -tocoferol (figura 6).

Aos 15 dias de inundação a espécie *Laetia corymbulosa* apresentou diferença significativa no conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol quando comparada às plantas do tratamento seca. Valores significativamente diferentes só foram observados novamente no dia 169, quando as plantas do tratamento escuro e do tratamento seca já haviam produzido novas folhas. As plantas que haviam sido submetidas à inundação apresentaram valores próximos a  $6 \mu\text{g cm}^{-2}$  de  $\alpha$ -tocoferol, seguidas pelas plantas que permaneceram na casa de vegetação com valores pouco superiores a  $3 \mu\text{g cm}^{-2}$  (figura 7).

Em *Pouteria glomerata* o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol variou significativamente entre as plantas da casa de vegetação e as plantas sob inundação dos dias 120 a 139. Mesmo

após um mês de retorno à casa de vegetação, as plantas que ficaram sob inundação, escuro e seca apresentavam valores inferiores estatisticamente diferentes das plantas que nunca saíram da casa de vegetação (figura 8).

### 3.5.2 Conteúdo de $\delta$ -tocotrienol entre os Tratamentos

*Laetia corymbulosa* e *Garcinia brasiliensis* apresentam  $\delta$ -tocotrienol nas folhas, entretanto em *G. brasiliensis* os valores são em escala igual ou superior ao  $\alpha$ -tocoferol, enquanto que em *L. corymbulosa* são os valores são inferiores a  $0,5 \mu\text{g cm}^{-2}$  em todos os tratamentos realizados, sem variações estatisticamente significantes.

Na espécie *G. brasiliensis*, o conteúdo de  $\delta$ -tocotrienol, da mesma forma que ocorreu para  $\alpha$ -tocoferol, não mostrou diferença significativa entre os tratamentos no dia 0 (zero), quando todas as plantas ainda se encontravam na casa de vegetação.

Para esta forma de vitamina E não houve diferenças significativas entre os tratamentos mesmo avaliando-se cada um dos dias de coleta. Contudo, a partir do dia 125 o conteúdo de  $\delta$ -tocotrienol nas plantas da casa de vegetação foi sempre o menor entre os tratamentos (figura 9), exatamente o oposto do que ocorreu com o  $\alpha$ -tocoferol.

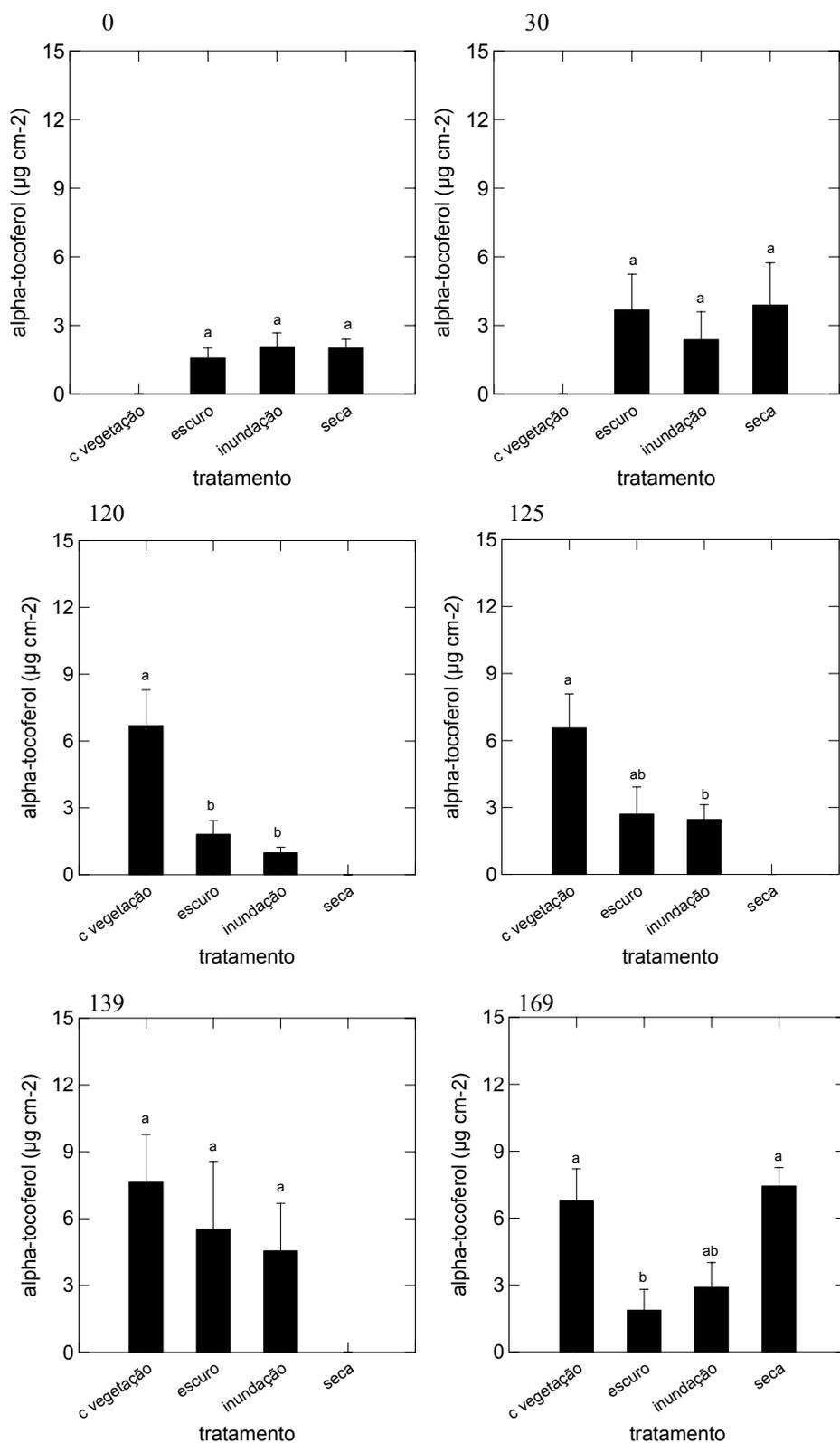


Figura 6. Concentração de  $\alpha$ -tocoferol em *Garcinia brasiliensis*, valores médios com erro padrão (n = 4). Os números 0, 30, 120, 125, 139, 169 correspondem aos dias de coleta durante o experimento. Médias com letras iguais não são significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

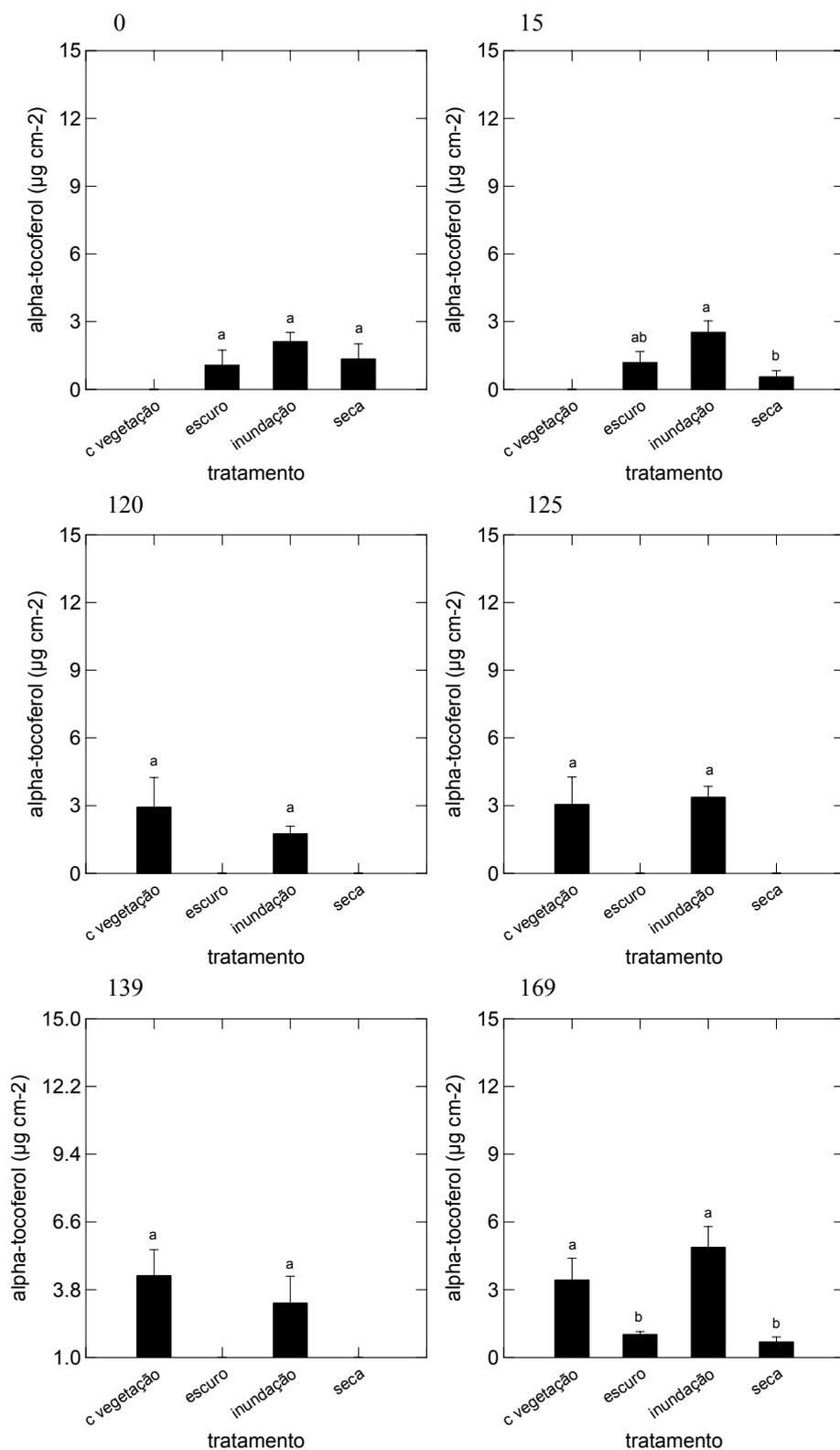


Figura 7. Concentração de  $\alpha$ -tocoferol em *Laetia corymbulosa*, valores médios com erro padrão ( $n = 4$ ). Os números 0, 15, 120, 125, 139, 169 correspondem aos dias de coleta durante o experimento. Médias com letras iguais não são significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

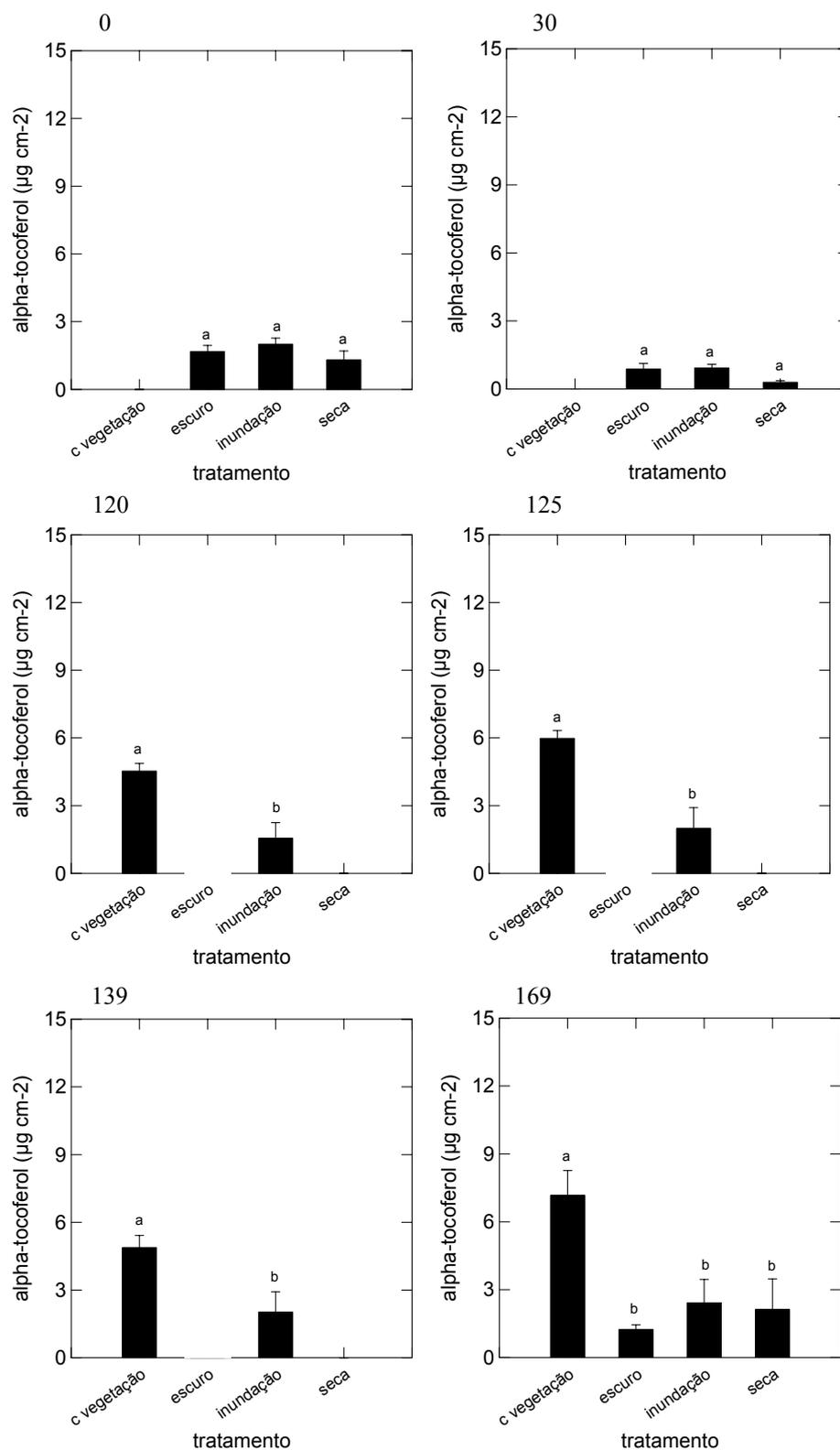


Figura 8. Concentração de  $\alpha$ -tocopherol em *Pouteria glomerata*, valores médios com erro padrão ( $n = 4$ ). Os números 0, 30, 120, 125, 139, 169 correspondem aos dias de coleta durante o experimento. Médias com letras iguais não são significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

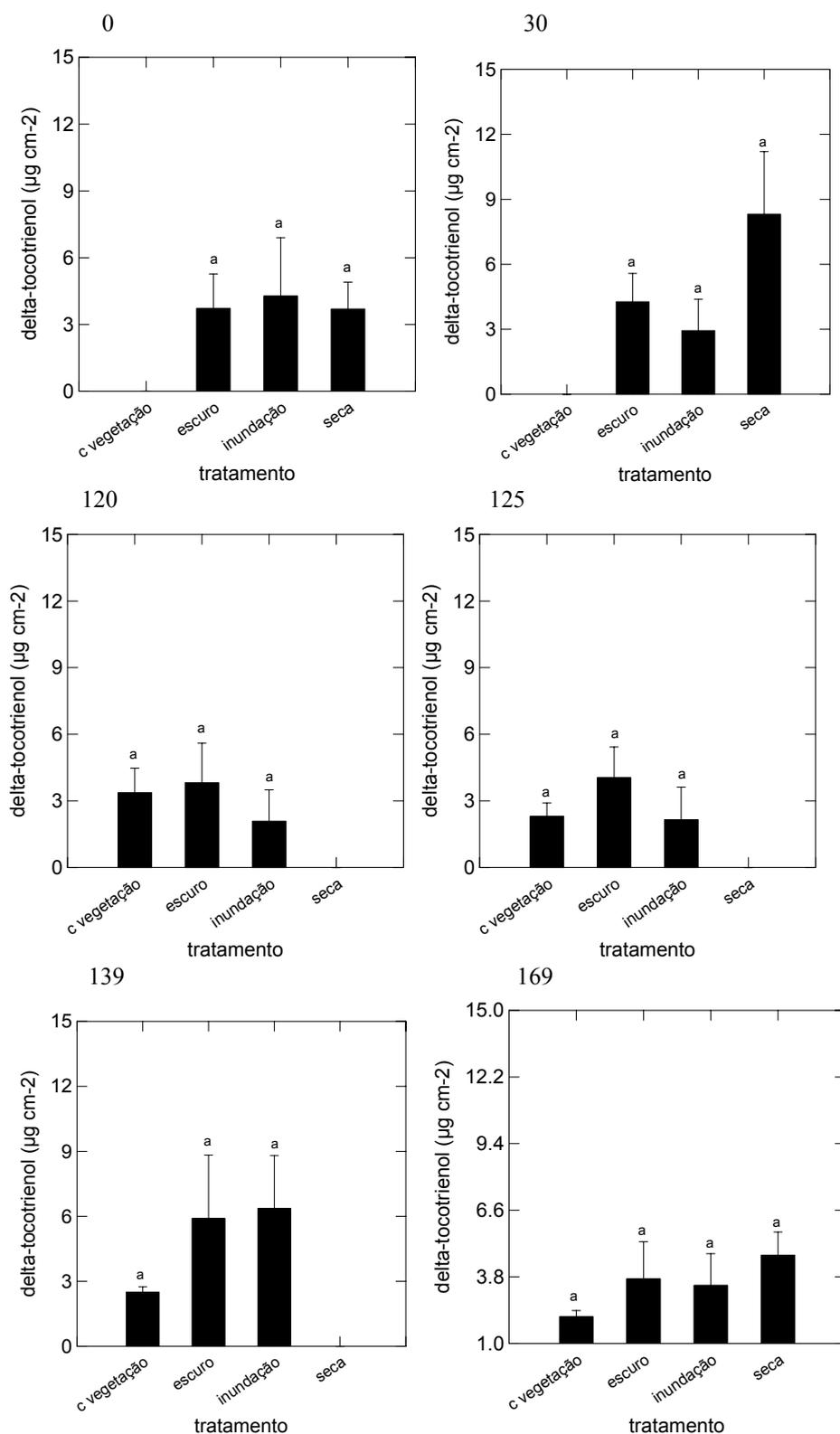


Figura 9. Concentração de  $\delta$ -tocotrienol em *Garcinia brasiliensis*, valores médios com erro padrão (n = 4). Os números 0, 30, 120, 125, 139, 169 correspondem aos dias de coleta durante o experimento. Médias com letras iguais não são significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

### 3.5.3 Conteúdo de $\alpha$ -tocoferol – Influência do Tempo

#### *Garcinia brasiliensis*

A análise da interferência do tempo sobre o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol produzido pelas plantas que se encontravam no tratamento seca mostra que há um aumento significativo deste antioxidante ( $p < 0,05$ ) conforme passa o tempo; em 90 dias, as plantas que apresentavam valores em torno de  $2 \mu\text{g cm}^{-2}$ , alcançaram valores próximos de  $6 \mu\text{g cm}^{-2}$  (figura 10 A).

Já as plantas que se encontravam no escuro não mostraram diferença significativa mesmo após 90 dias do início do experimento, com valores oscilando entre 2 e  $4 \mu\text{g cm}^{-2}$ .

No tratamento de inundação artificial, observa-se um decréscimo leve, porém contínuo, no conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol com o passar do tempo, de pouco acima de  $2 \mu\text{g cm}^{-2}$  para  $1,7 \mu\text{g cm}^{-2}$  aos 90 dias. Há um aumento aos 21 dias (uma semana sem luz), mas em seguida os valores continuam diminuindo. O aumento do tempo de exposição à inundação e ao escuro não se mostrou significativo para este tratamento.

Até os 90 dias, o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol nas plantas que se encontravam submersas e no escuro foi o menor em comparação aos demais tratamentos (figura 10 A).

No período de 123 a 169 dias não houve interferência significativa do tempo no conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol em qualquer dos três tratamentos analisados, entretanto, observou-se que, tanto as plantas que estavam no escuro quanto as plantas que estavam inundadas, aos 139, dois dias após serem transferidas da câmara climática para a casa de vegetação, apresentaram o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol aumentado com valores próximos a  $6 \mu\text{g cm}^{-2}$  nas plantas do tratamento escuro e próximos a  $5 \mu\text{g cm}^{-2}$  nas plantas do tratamento inundação artificial (figura 10 B).

As plantas que permaneceram na casa de vegetação mostraram conteúdos de  $\alpha$ -tocoferol maiores do que as plantas que estavam nas câmaras climáticas, a partir do dia 125 variando entre  $5,7$  a  $7 \mu\text{g cm}^{-2}$  (figura 10 B).

#### *Laetia corymbulosa*

Ao contrário de *G. brasiliensis*, nesta espécie as plantas do tratamento de inundação, mostraram conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol maior do que as plantas que se encontravam no tratamento seca, entretanto, estatisticamente o tempo não afetou o conteúdo desta forma de vitamina E em nenhum dos dois tratamentos (figura 11 A).

Quando analisadas as plantas sob submersão a partir de 123 dias, houve um aumento crescente ( $p < 0,05$ ) do conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol, acentuado após a transferência das plantas para a casa de vegetação, de 2 a 6  $\mu\text{g cm}^{-2}$  passaram a 5,7  $\mu\text{g cm}^{-2}$  (figura 11 B).

#### ***Pouteria glomerata***

Nesta espécie, após 30 dias de experimento, o conteúdo  $\alpha$ -tocoferol não ultrapassou 2  $\mu\text{g cm}^{-2}$  nos três tratamentos, sendo a inundação artificial o único tratamento onde o tempo afetou significativamente ( $p < 0,05$ ) o conteúdo do  $\alpha$ -tocoferol (figura 12 A).

Após o retorno das plantas à casa de vegetação, as plantas que se encontravam sob inundação artificial continuaram com valores próximos a 2  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ; já as plantas da casa de vegetação mostravam aumento significativo ( $p < 0,05$ ) com o valor máximo alcançado de 8  $\mu\text{g cm}^{-2}$  aos 169 dias de acompanhamento (figura 12 B).

#### **3.5.4 Conteúdo de $\delta$ -tocotrienol – Influência do Tempo**

##### ***Garcinia brasiliensis***

Ao analisar a influência do tempo no conteúdo de  $\delta$ -tocotrienol, surpreendentemente, observou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nas plantas que se encontravam no tratamento seca, enquanto que ocorreu uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) nas plantas que se encontravam no tratamento de inundação artificial. Para as plantas que se encontravam no escuro, não houve influência do tempo na produção de  $\delta$ -tocotrienol (figura 13 A).

A partir de 123 dias de experimento, não se observou interferência significativa do aumento do número de dias de submissão ao tratamento, em nenhum deles, até 169 dias. No mesmo período, o conteúdo de  $\delta$ -tocotrienol nas plantas da casa de vegetação foi o menor entre os três tratamentos, exatamente o oposto do que ocorreu com o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol. Observou-se uma inversão nos conteúdos das duas formas para os três tratamentos considerados, casa de vegetação, inundação artificial e escuro (figura 13 B).

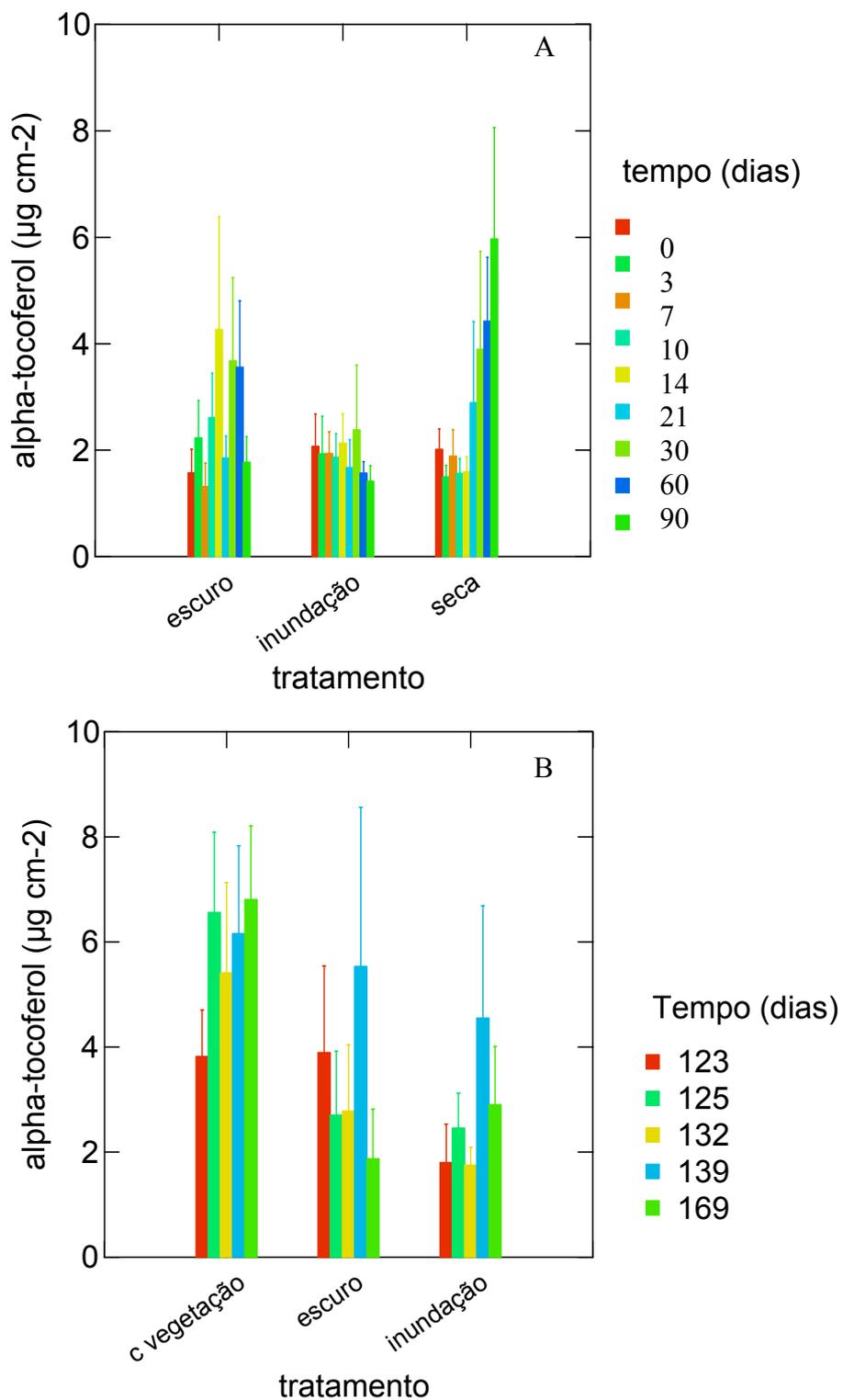


Figura 10. Interferência do tempo, dentro de cada tratamento, sobre o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol na espécie *G. brasiliensis*. Em A de 0 a 90 dias e em B de 123 a 169, período que inclui a recuperação das plantas.

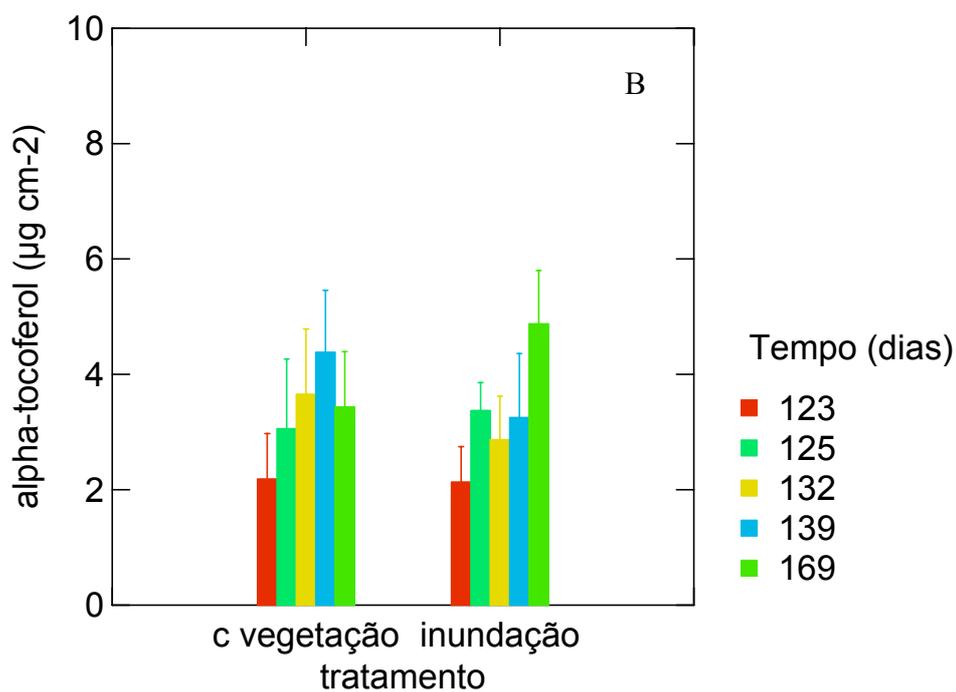
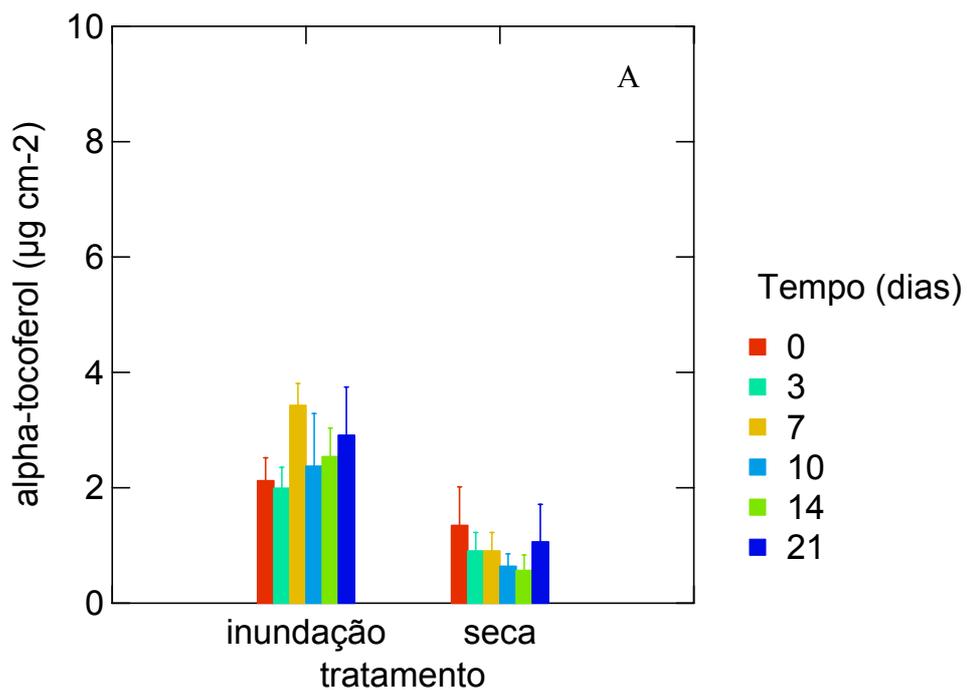


Figura 11. Interferência do tempo, dentro de cada tratamento, sobre o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol na espécie *L. corymbulosa*. Em A de 0 a 21 dias e em B de 123 a 169, período que inclui a recuperação das plantas.

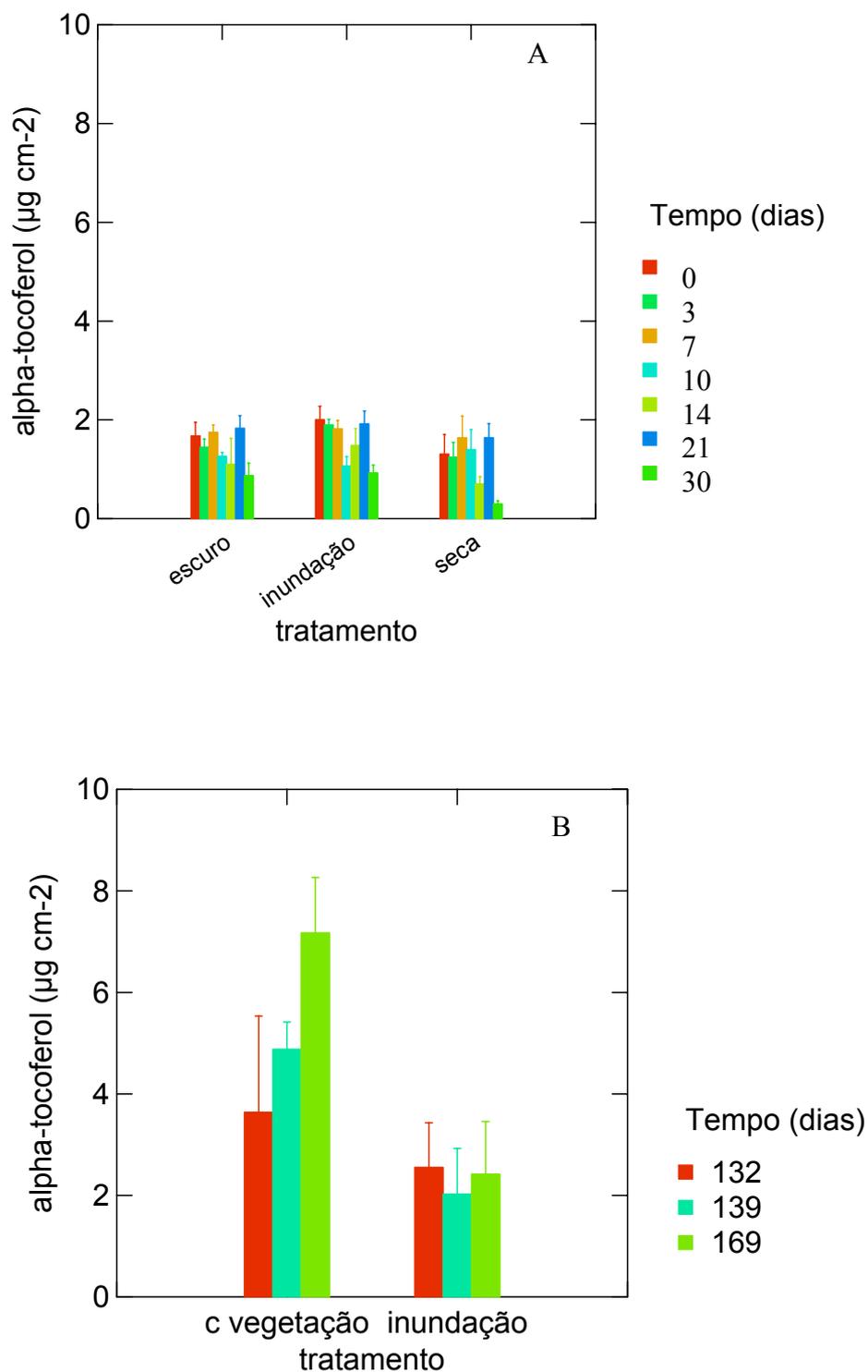


Figura 12. Interferência do tempo, dentro de cada tratamento, sobre o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol na espécie *P. glomerata*. Em A de 0 a 30 dias e em B de 132 a 169, período de recuperação das plantas.

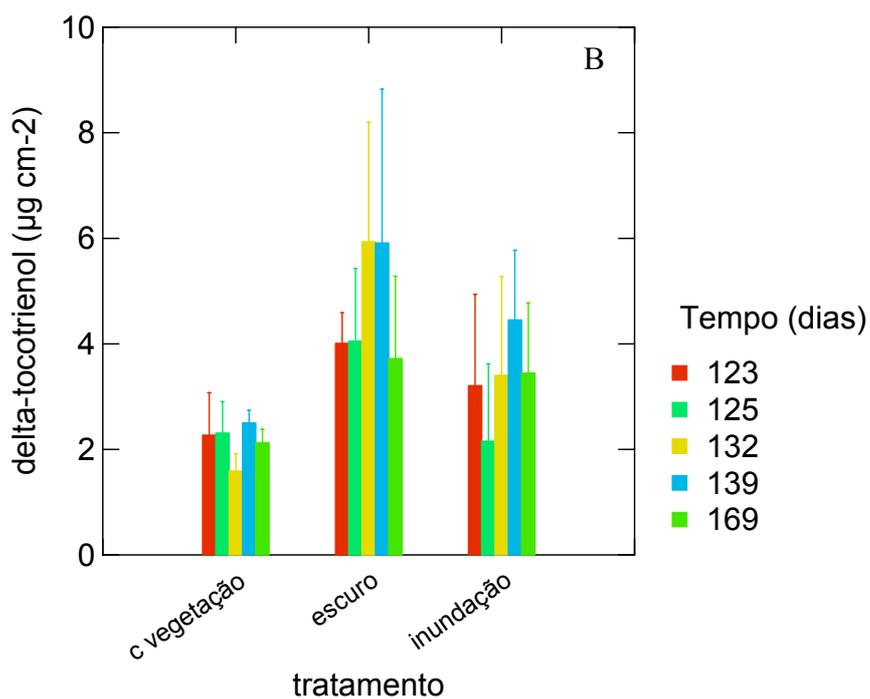
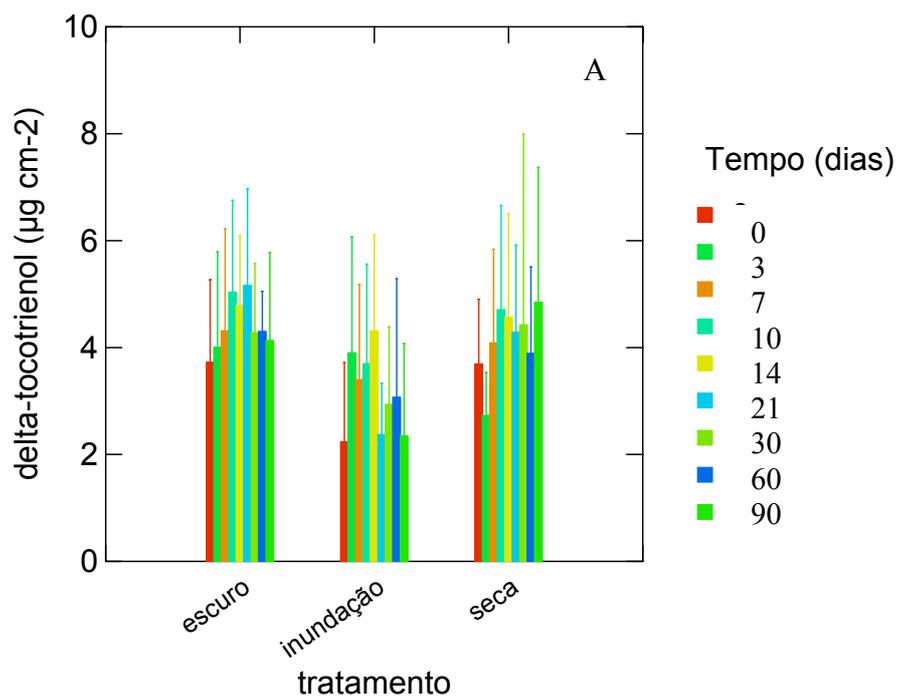


Figura 13. Interferência do tempo, dentro de cada tratamento, sobre o conteúdo de  $\delta$ -tocotrienol na espécie *G. brasiliensis*. Em A de 0 a 90 dias e em B de 123 a 169, período que inclui a recuperação das plantas.

### 3.5.5 Fluorescência da Clorofila *a*

#### *Garcinia brasiliensis*

A espécie *Garcinia brasiliensis* foi a única que manteve as folhas em todos os tratamentos. A razão Fv/Fm até os 90 dias de experimento foi próxima a 0,8 para todas as condições.

As plantas do tratamento seca, embora estivessem com as folhas visivelmente ressecadas (figura 14), não mostraram decréscimo na razão Fv/Fm (figura 15).

No tratamento escuro, aos 120 dias, houve um decréscimo de Fv/Fm e, a partir de 123 dias, quando as plantas mostraram fotoinibição, após estarem submetidas a 24 horas de luz; aos 125 dias foi medido o menor valor, quando as plântulas haviam retornado há 72 horas à luz. A partir do dia 132 as plantas chegaram a valores em torno de 0,6 e continuaram a aumentar. Um mês após o retorno a casa de vegetação, estas apresentavam valores próximos a 0,8 (figura 15), semelhantes aos das condições anteriores aos tratamentos.

No tratamento de inundação artificial observou-se valores variáveis nos dias 7 e 138; no dia 7 as plantas ficaram completamente submersas e no dia 138 haviam sido retornadas há 2 dias para a casa de vegetação (figura 15).

#### *Laetia corymbulosa*

As plantas que permaneceram inundadas mostraram ligeiro declínio a partir dos 90 dias e aos 123 dias; após 12 horas de fotoperíodo, alcançaram o menor valor observado neste tratamento, embora tenham permanecido acima de 0,6 (figura 16 A).

Em *Laetia corymbulosa* os valores ficaram próximos a 0,8 nos três tratamentos, apenas até o décimo dia. No tratamento seca, a partir do 14º dia observou-se um declínio crescente, e aos 60 dias as plantas apresentaram valores abaixo de 0,6; em seguida a esta medida as plantas perderam as folhas (figura 16 B).

As plantas do escuro mostraram valores próximos a 0,8 até os 30 dias, aos 60 dias mostraram leve declínio que continuou a ser observado aos 90 dias, ocasião na qual, mesmo sem declínio acentuado da razão Fv/Fm, perderam suas folhas.

### ***Pouteria glomerata***

No tratamento de inundação artificial até os 30 dias os valores ficaram em torno de 0,8; aos 60 dias iniciou-se um decréscimo contínuo e aos 120 dias as plantas mostraram valores abaixo de 0,6, que se mantiveram até os 123 dias. Entretanto, a partir do dia 125, após 72 horas de retorno ao fotoperíodo de 12 horas diárias, o valor já estava em torno de 0,7, e aos 139 dias após dois dias de retorno à casa de vegetação, voltou a ficar próximo de 0,8 (figura 17 A).

Nos demais tratamentos a razão  $F_v/F_m$  em *Pouteria glomerata* ficou próxima a 0,8 durante os primeiros 10 dias de experimento, aos 14 dias as plantas do tratamento seca mostravam um leve declínio, acentuado aos 30 dias de experimento quando atingiram valor próximo a 0,6; este valor foi atingido aos 60 dias, data após a qual as plantas perderam as folhas (figura 17 B).

As plantas do tratamento escuro mantiveram suas folhas até os 90 dias sem decréscimo acentuado até esta data.



Figura 14. Aspecto de uma planta de *G. brasiliensis* do tratamento seca, após dois dias de retorno à casa de vegetação (A), parte das folhas apresentavam ressecamento. A mesma espécie com duas folhas novas (seta), duas semanas após o retorno à casa de vegetação (B). A faixa cinza da escala corresponde a 10 cm de altura.

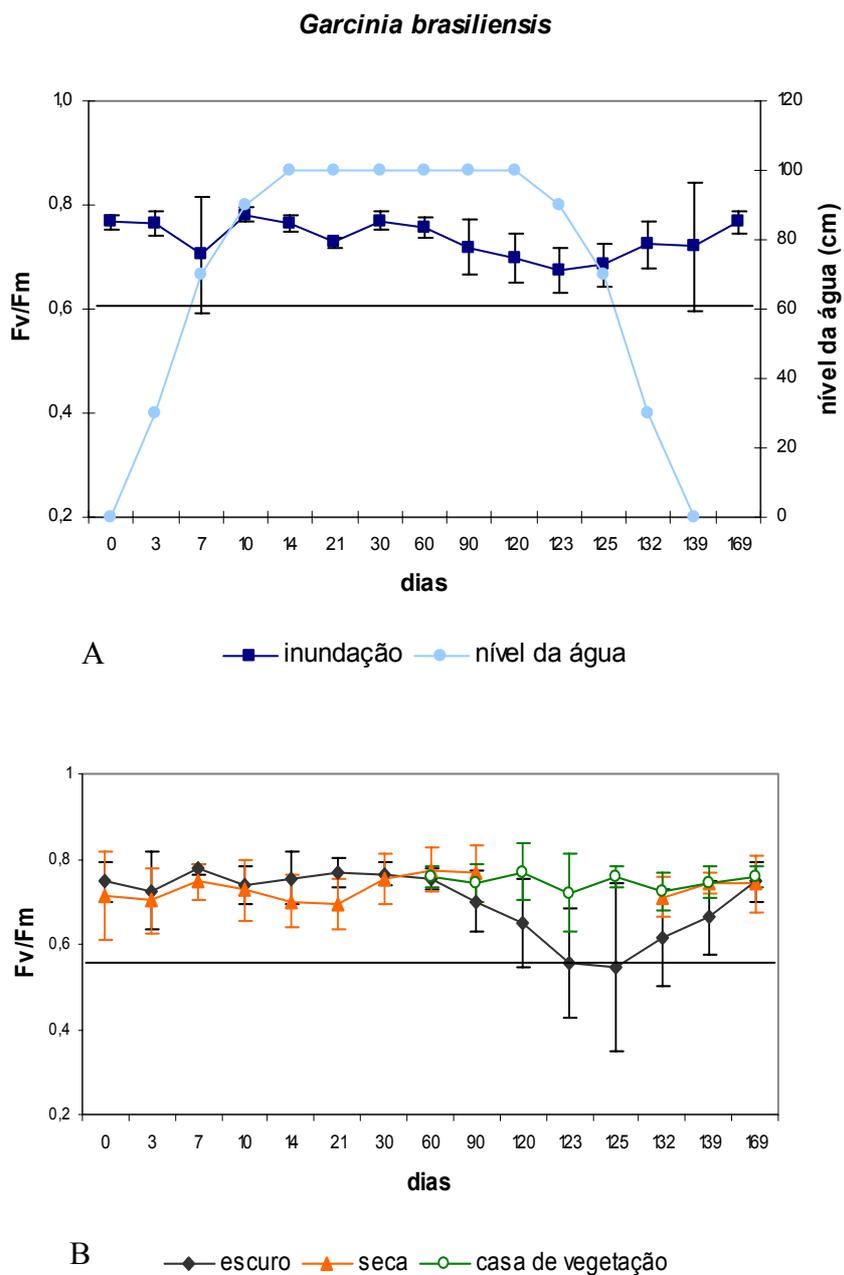


Figura 15. Valores médios de  $F_v/F_m$  no tratamento de inundação artificial, durante o experimento em *G. brasiliensis*. O eixo secundário de y mostra o nível da água nos tanques, a faixa cinza indica o período no qual as plantas ficaram no escuro (A). Valores médios de  $F_v/F_m$ , nos tratamentos de escuro, seca e casa de vegetação, a faixa cinza indica o período no qual as plantas do tratamento escuro ficaram sem luz (B).

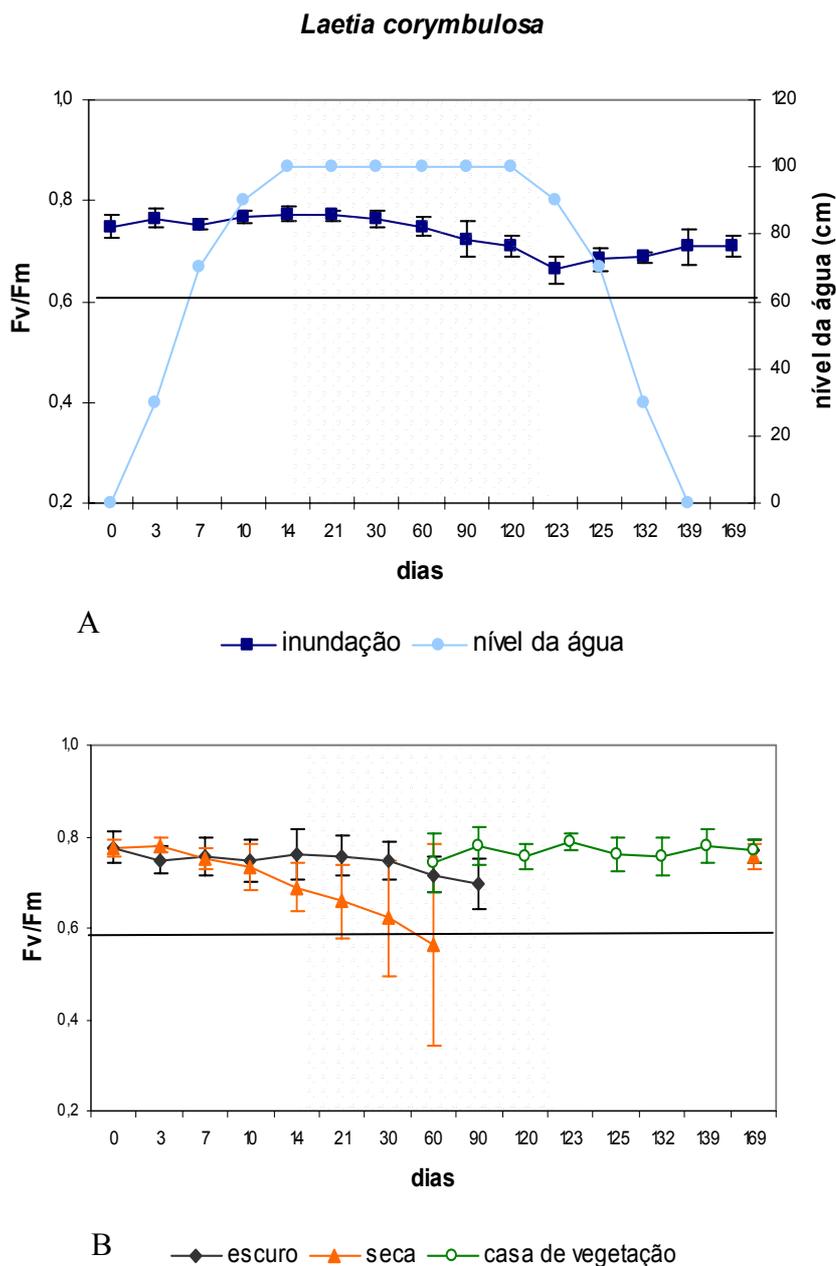


Figura 16. Valores médios de Fv/Fm no tratamento de inundação artificial, durante o experimento *L. corymbulosa*. O eixo secundário de y mostra o nível da água nos tanques, a faixa cinza indica o período no qual as plantas ficaram no escuro (A). Valores médios de Fv/Fm, nos tratamentos de escuro, seca e casa de vegetação, a faixa cinza indica o período no qual as plantas do tratamento escuro ficaram sem luz (B).

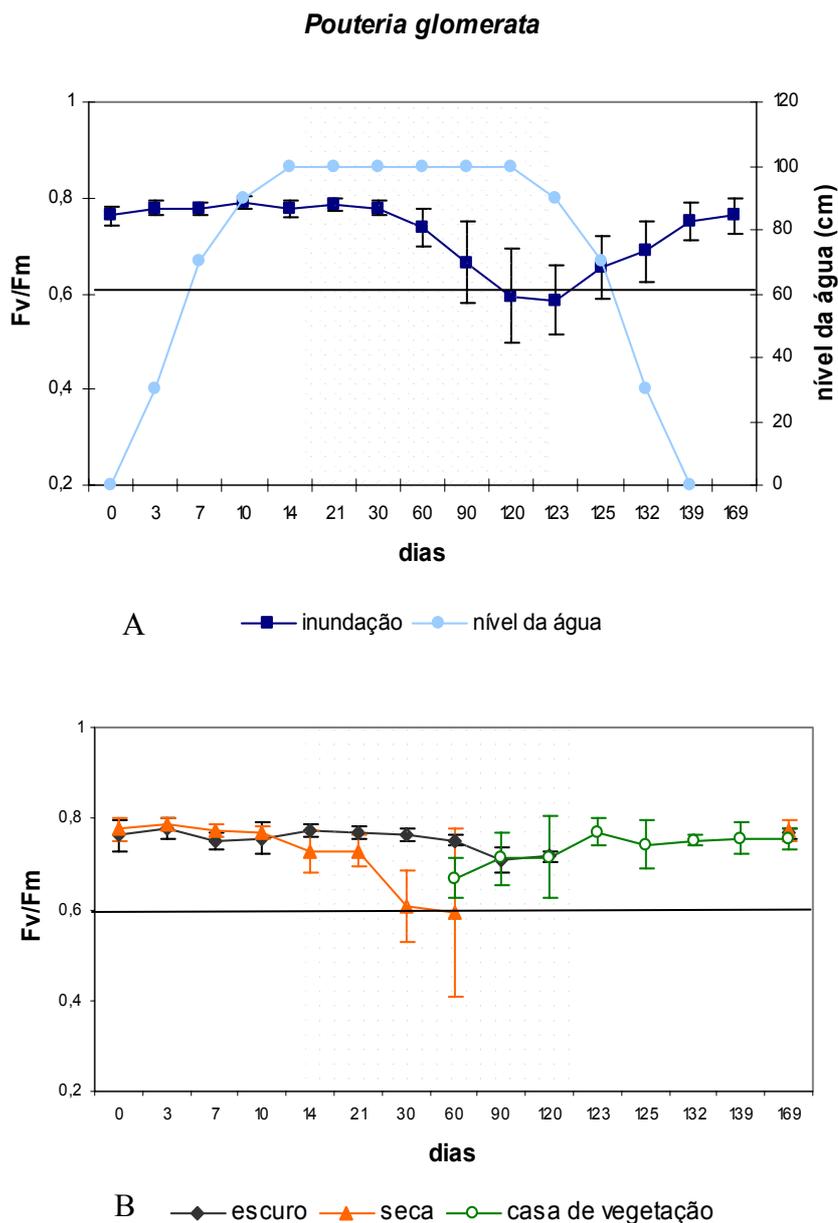


Figura 17. Valores médios de  $F_v/F_m$  no tratamento de inundação artificial, durante o experimento em *P. glomerata*. O eixo secundário de y mostra o nível da água nos tanques, a faixa cinza indica o período no qual as plantas ficaram no escuro (A). Valores médios de  $F_v/F_m$ , nos tratamentos de escuro, seca e casa de vegetação, a faixa cinza indica o período no qual as plantas do tratamento escuro ficaram sem luz (B).

### 3.5.6 Análise Microscópica da Anatomia Foliar

Nas plantas que se encontravam na casa de vegetação foram observadas folhas mesofíticas dorsiventrals (Souza 2003, Menezes *et al.* 2003) para todas as espécies estudadas (figuras 18 A, 19 A e 20 A).

As folhas que ficaram submersas nas três espécies estudadas *Garcinia brasiliensis*, *Laetia corymbulosa* e *Pouteria glomerata*, quando comparadas a folhas de plantas que permaneceram em casa de vegetação, mostraram uma compactação do espaço intercelular. Os cortes transversais observados em mesmo aumento mostram diferenças na espessura das folhas (figuras 18, 19 e 20).

A espécie *Laetia corymbulosa* apresentou diferenças na epiderme foliar quando comparadas às duas condições. Em plantas da casa vegetação observa-se epiderme uniestratificada com cutícula delgada, logo abaixo uma hipoderme também uniestratificada, com células globosas e paredes finas. O parênquima paliçádico frouxo está presente nessa folha com células alongadas e um parênquima esponjoso com reservas amiláceas (figura 19 A). Nas plantas que estiveram submersas não se observa a presença de hipoderme (figura 19 B).

Em plantas de casa de vegetação, nas espécies *G brasiliensis* e *L. corymbulosa* os espaços intercelulares são mais evidentes no parênquima esponjoso, entretanto, nas folhas que ficaram submersas, pouco se evidencia tais espaços. Em *P. glomerata* nas folhas submersas há um parênquima homogêneo com células compactadas e ausência de parênquima paliçádico e esponjoso; devido a este fato observa-se uma diminuição em torno de 50% da espessura da folha, diminuição mais evidente do que nas duas outras espécies (figura 20 B).

### 3.5.7 Formação de Raízes Adventícias em Folhas

Ao final do experimento, no tratamento de inundação artificial, nas plantas submersas da espécie *Laetia corymbulosa* foi observada a formação de raízes adventícias nas folhas (figura 21 A) que se formaram sempre junto à nervura da folha.

Algumas vezes a formação das raízes era exatamente na região de onde havia sido retirado um cilindro da lâmina foliar para análise do conteúdo de vitamina E (figura 21 A, B e D). Outras vezes ocorreu a formação de raízes em locais onde não havia sido feita a retirada do cilindro de lâmina foliar (figura 21 C).

Parte das folhas encontrava-se ainda nas plantas (figura 21 A), outra parte eram folhas caídas que se encontravam no fundo do tanque, algumas com diferença na coloração da lâmina foliar indicando que já haviam caído há alguns dias (figura 21 D).

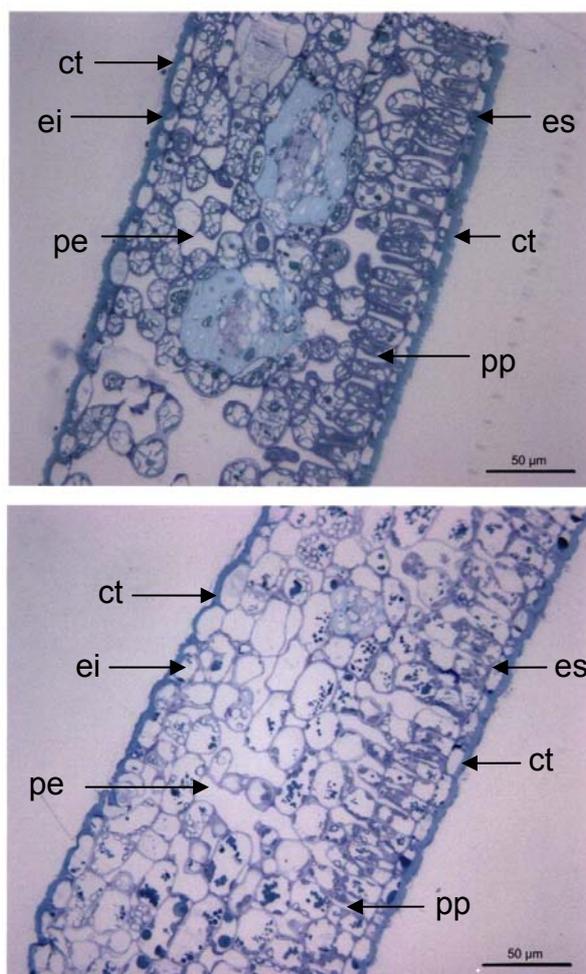


Figura 18. Corte transversal da lâmina foliar de uma planta de casa de vegetação da espécie *Garcinia brasiliensis* (A). Corte transversal da lâmina foliar de *G. brasiliensis* submersa há 140 dias (B). As setas indicam as seguintes estruturas: epiderme superior (es), epiderme inferior (ei), cutícula (ct), parênquima paliçádico (pp), parênquima esponjoso (pe).

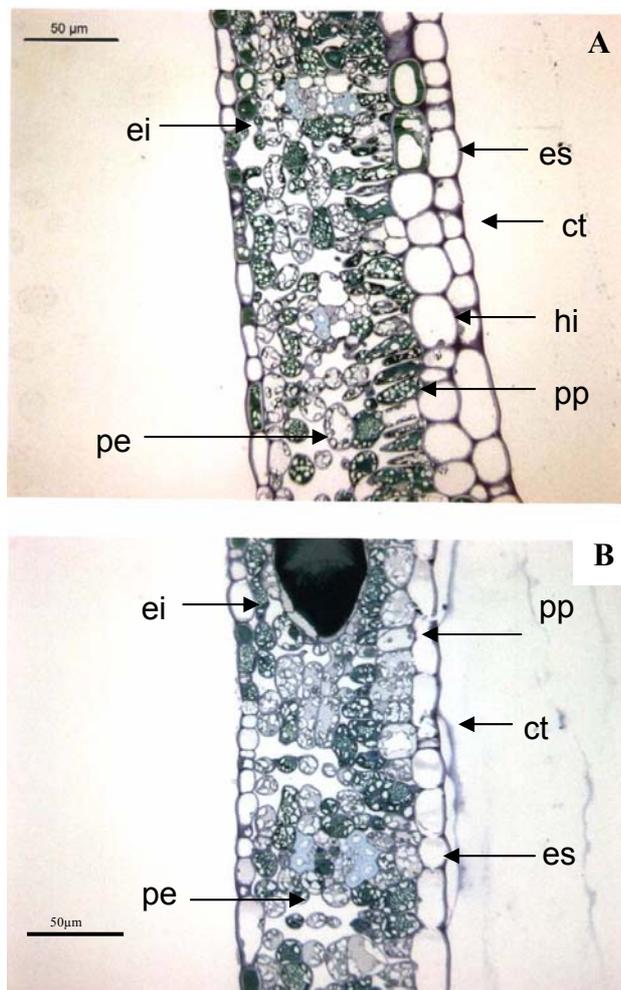


Figura 19. Corte transversal da lâmina foliar de uma planta de casa de vegetação da espécie *Laetia corymbulosa* (A). Corte transversal da lâmina foliar de *L. corymbulosa* submersa há 140 dias (B). As setas indicam as seguintes estruturas: epiderme superior (es), epiderme inferior (ei), cutícula (ct), hipoderme (hi), parênquima paliçádico (pp) e parênquima esponjoso (pe).

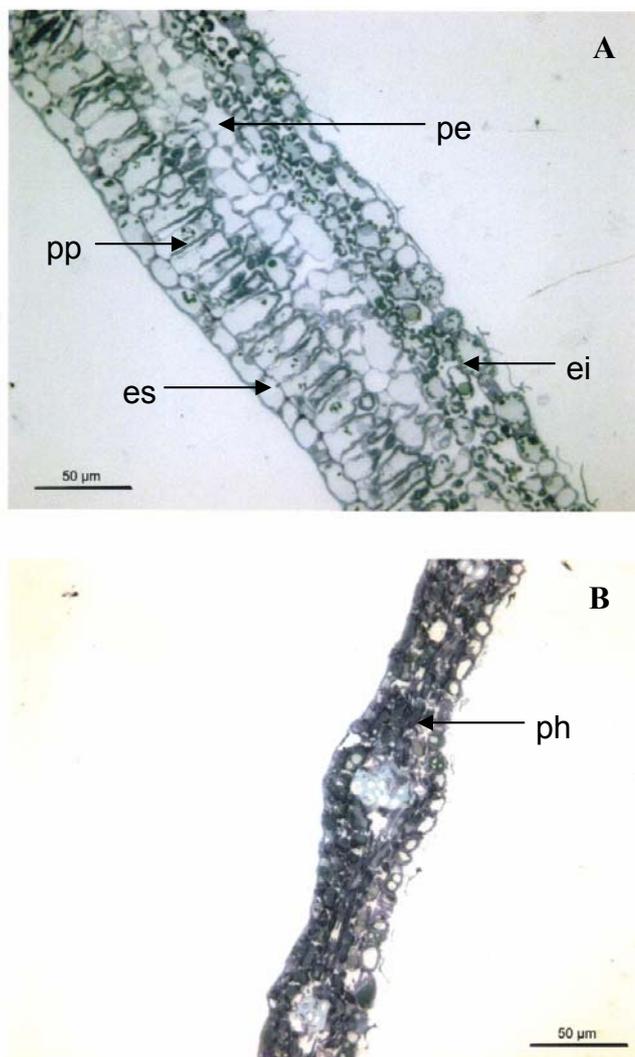


Figura 20. Corte transversal da lâmina foliar de uma planta de casa de vegetação da espécie *Pouteria glomerata* (A), Corte transversal da lâmina foliar de *P. glomerata* submersa há 140 dias (B). As setas indicam as seguintes estruturas: epiderme superior (es), epiderme inferior (ei), parênquima paliçádico (pp), parênquima esponjoso (pe) e parênquima homogêneo (ph).

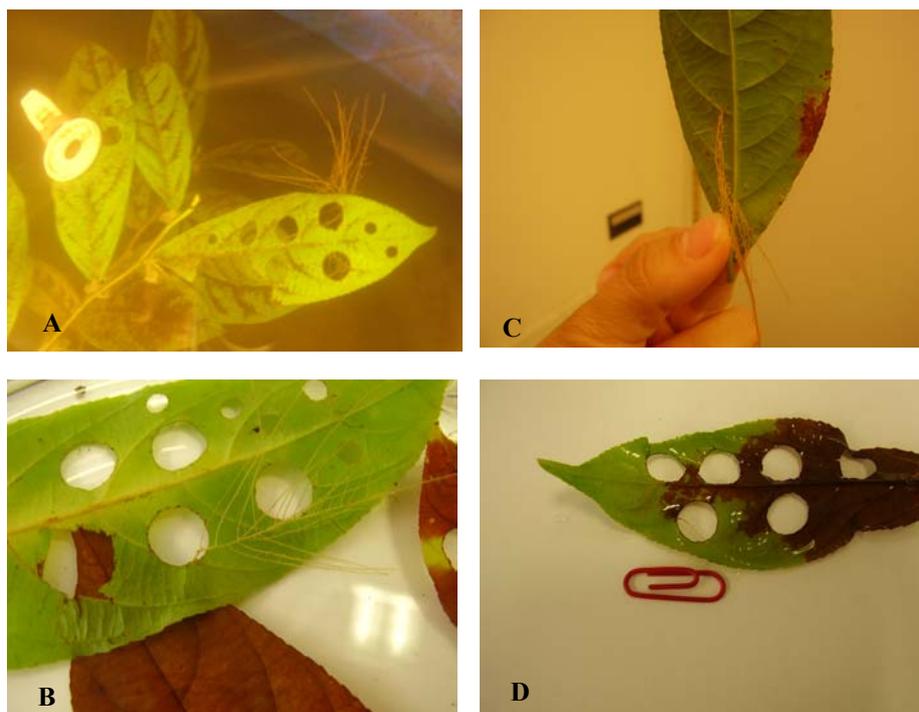


Figura 21. Folhas de *Laetia corymbulosa* mostrando raízes adventícias em planta submersa (A); detalhe da inserção da raiz na nervura da folha (B); inserção da raiz na nervura da folha sem retirada de cilindro da lâmina foliar (C) e folha encontrada no fundo do tanque, mostrando diferença de coloração da lâmina foliar (D).

### 3.5.8 Manutenção, Perda e Produção de Folhas

Quando observada a média do número total de folhas, as espécies *G. brasiliensis* e *P. glomerata* apresentaram o maior número de folhas no tratamento seca, enquanto que em *L. corymbulosa* maiores valores foram medidos nas plantas do tratamento de inundação artificial (figura 22).

Das três espécies que estiveram nos tratamentos de inundação artificial, escuro e seca, duas mostraram padrão de manutenção, perda, e produção de folhas semelhante nos tratamentos escuro e seca, embora com número de folhas em escala diferente. Foram elas *P. glomerata* e *L. corymbulosa* (figura 23 B e C). Nestas espécies não houve manutenção das folhas iniciais nos tratamentos, apenas nas plantas que sofreram submersão por mais de 4 meses é que as folhas iniciais foram mantidas, tratamento no qual o padrão entre as duas espécies foi diferente (figura 23 B e C).

Nas plantas do tratamento de inundação artificial, *P. glomerata* ao final do experimento, mostrou número aproximado de folhas marcadas (mantidas desde antes do

início do experimento) e folhas novas, em média 5 e 7 respectivamente. Somando-se as folhas marcadas e as novas não foi alcançado o número de folhas anterior à inundação. Já *L. Corymbulosa*, o número de folhas novas superou em 10 vezes o número de folhas marcadas, e sozinho superou o número de folhas iniciais (figura 23 B e C).

A espécie *G. brasiliensis* mostrou padrão de manutenção de folhas bem diferenciado das demais espécies. Nos três tratamentos as plantas mantiveram folhas marcadas com número inferior ao inicial nos tratamentos de inundação artificial e escuro. Contudo, no tratamento seca as plantas mantiveram as folhas iniciais e produziram folhas novas (figura 23 A).

A espécie *G. brasiliensis* manteve as folhas iniciais nos 3 diferentes tratamentos (figura 24 A, B e C) e desenvolveu as folhas novas produzidas nas plantas do tratamento seca (figura 24 D).

*L. corymbulosa* e *P. glomerata* perderam as folhas no tratamento escuro e seca (figura 25 A e 26 A). As plantas de *L. corymbulosa* que ficaram no tratamento escuro iniciaram a produção de folhas ainda na câmara climática (figura 25 B), enquanto que as plantas do tratamento seca iniciaram apenas após serem transferidas à casa de vegetação (figura 25 C).

As plantas da espécie *P. glomerata*, que ficaram no tratamento seca não recuperaram o ramo principal, mas lançaram novos brotos laterais após 3 semanas de retorno à casa de vegetação (figura 25 B e C), ao contrário das plantas que permaneceram no escuro, onde as folhas novas produzidas saíram do ramo principal.

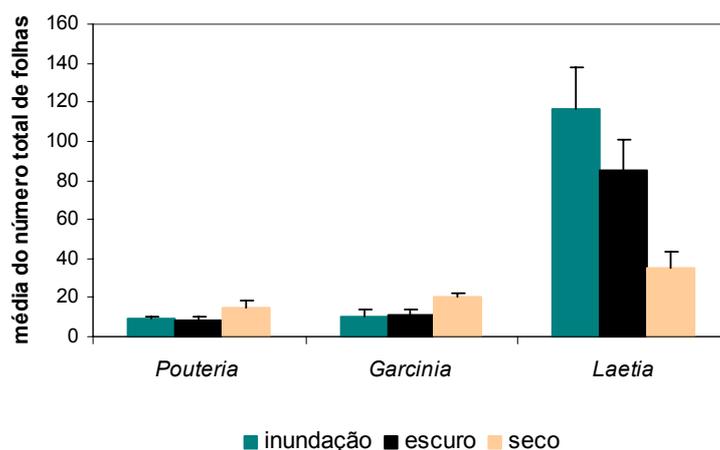


Figura 22. Média do número total de folhas após um mês de retorno a casa de vegetação, para as plantas de *G. brasiliensis*, *L. corymbulosa* e *P. glomerata*, que se encontravam nos tratamentos de inundação artificial, escuro e seca.

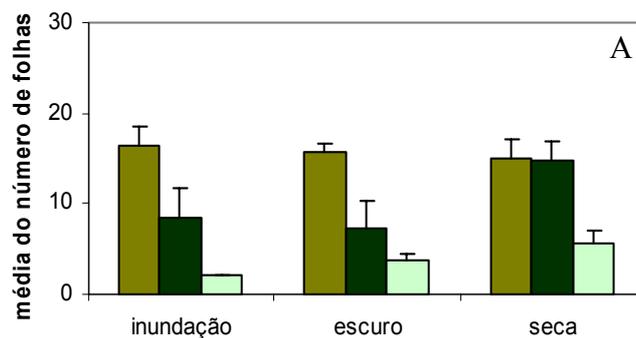
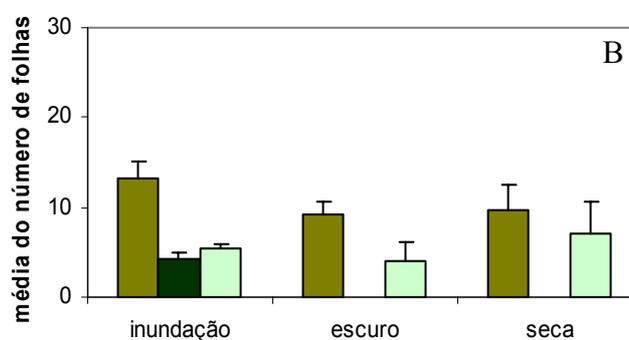
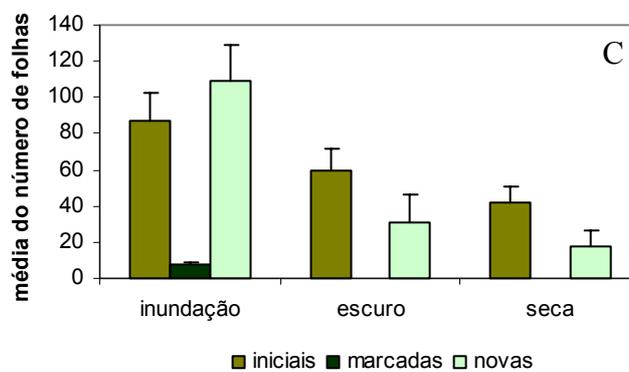
***Garcinia brasiliensis******Pouteria glomerata******Laetia corimbulosa***

Figura 23. Média do número de folhas iniciais (existentes na planta antes do início do experimento-tempo inicial), folhas marcadas (remanescentes do tempo inicial) e folhas novas (produzidas após o tempo inicial).



Figura 24. Plantas de *G. brasiliensis* imediatamente após a sua retirada dos tanques de inundação artificial (A); plantas do tratamento seca em casa de vegetação, após 3 semanas de retorno à casa de vegetação (B); plantas na câmara climática após 120 do tratamento de escuro (C) e plantas do tratamento seca dois meses após retorno à casa de vegetação (D).



Figura 25. Planta de *L. corymbulosa* na câmara climática no tratamento seca (A), a mesma espécie lançando brotos e folhas novas ainda na câmara climática, quatro dias após o retorno à 12 horas de fotoperíodo (B), plantas do tratamento seca após duas semanas de retorno à casa de vegetação (C) e plantas do tratamento seca após um mês de retorno à casa de vegetação (D).



Figura 26. Planta de *P. glomerata* na câmara climática no tratamento seca (A); a mesma planta lançando brotos laterais e folhas novas, uma semana após o retorno à casa de vegetação (B); após um mês de retorno à casa de vegetação (C) e plantas do tratamento seca dois meses (D).

### 3.6. Discussão

#### 3.6.1 Conteúdo de $\alpha$ -tocoferol entre os Tratamentos

A avaliação dos conteúdos de  $\alpha$ -tocoferol para as três espécies *G. brasiliensis*, *L. corymbulosa* e *P. glomerata*, ainda no primeiro dia de observação, imediatamente antes da imposição das três condições de potencial estresse, seca, escuro e inundação artificial, não mostrou diferenças estatísticas. Este resultado era esperado e confirmou a similaridade entre as plantas, anterior à imposição das condições experimentais.

Aos 120 dias as plantas da casa de vegetação da espécie *G. brasiliensis* mostraram os maiores conteúdos de  $\alpha$ -tocoferol em relação às plantas do escuro e da inundação, acima de  $6 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Estes valores permaneceram aumentados até o final do experimento para estas plantas. Adicionalmente, no quarto mês de experimento, as plantas tiveram seu fotoperíodo aumentado, pois a casa de vegetação, com telhado de vidro, não dispunha de dispositivo para impedir a penetração de luz natural, após as 12 horas de fotoperíodo programadas e desejáveis. Durante o verão no Hemisfério Norte os dias são mais longos e as plantas ficaram inevitavelmente expostas a esta condição.

É sabido que alta exposição à luz modula o conteúdo de tocoferóis nas membranas fotossintéticas (Lichtenthaler 1979), e estudos com *Fagus silvatica* demonstraram que folhas expostas ao sol têm três vezes mais  $\alpha$ -tocoferol do que folhas de sombra, da mesma forma folhas de sol de *Quercus ilex* também são protegidas por mais altas concentrações de  $\alpha$ -tocoferol (García-Plazaola *et al.* 1999). O conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol em plantas de tabaco cresce em resposta ao aumento da intensidade luminosa (Tanaka *et al.* 1999). Desta forma, as plantas de *G. brasiliensis* responderam ao aumento do período de exposição à luz com o incremento no conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol, em quase três vezes, a partir de 120 dias, mantendo esses valores elevados até o final do experimento.

As plantas do tratamento seca que na câmara climática tinham 12 horas de fotoperíodo diário, aos 169 dias quando do seu retorno à casa de vegetação, tiveram seus valores quase três vezes aumentados. Em contrapartida, as plantas do escuro e da inundação que passaram por 4 meses de supressão de luz mostraram valores comparáveis apenas aos 139 dias, enquanto que aos 169 dias já apresentavam valores próximos aos do início do experimento, demonstrando assim, uma capacidade de recuperação maior do que a das plantas que permaneceram sempre expostas à luz.

As plantas da casa de vegetação da espécie *P. glomerata* assim como as de *G. brasiliensis*, mostraram maior aumento do conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol em comparação aos demais tratamentos a partir de 120 dias. Talvez, isto se deva ao fato de que nas florestas inundáveis estas espécies sejam encontradas no sub-bosque de florestas de estágio sucessional secundário tardio, local onde a radiação luminosa varia entre 3 a 15% (Wittmann *et al.* 2004).

Já as plantas da espécie *L. corymbulosa* não mostraram o mesmo aumento de conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol em reação ao aumento de fotoperíodo. Esta é uma espécie que ocupa cotas baixas da borda florestal no estágio secundário tardio e, portanto, provavelmente apresenta uma tolerância maior à radiação solar do que aquelas das duas outras espécies (Wittmann *et al.* 2004).

Para *L. corymbulosa*, comparando-se os tratamentos aos 169 dias, as plantas que estiveram sob inundação e em casa de vegetação apresentaram conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol bem maior do que as plantas do escuro e da seca. Possivelmente a idade das folhas está influenciando estes resultados, uma vez que as plantas do tratamento de seca e de escuro sofreram abscisão foliar, formando novas folhas após o retorno à casa de vegetação. Sendo estas, folhas bem mais jovens, era de se esperar que apresentassem o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol menor do que em folhas maduras, conforme salientado por Munné-Bosch & Alegre (2002).

### 3.6.2 Conteúdo de $\delta$ -tocotrienol entre os Tratamentos

A presença de  $\delta$ -tocotrienol em folhas só foi registrada até o momento ocorrendo naturalmente em *Cratoxylum sumatranum* (Seo *et al.* 2002). Sua presença foi registrada também em mutantes de *Arabidopsis thaliana* que tiveram alterada a via metabólica Xiquimato (que origina as diferentes formas de vitamina E), conforme estudos de Rippert *et al.* (2004). Entretanto, os próprios autores salientam que este composto nunca foi registrado em folhas do tipo selvagem de *Arabidopsis thaliana*. Desta forma, a espécie *G. brasiliensis* é o segundo registro de ocorrência natural deste composto em folhas.

Embora o conteúdo de  $\delta$ -tocotrienol encontrado aos 30 dias de experimento no tratamento seca tenha sido três vezes maior do que no tratamento de inundação artificial, não há diferença estatisticamente significativa na comparação entre os diferentes tratamentos. Isto se deve provavelmente a variação entre as plantas de cada tratamento.

Como se sabe que a produção de tocoferóis está relacionada à tolerância ao estresse (Munné-Bosch & Alegre 2002), e que os tocotrienóis também têm função antioxidante (Falk *et al.* 2004), a presença de duas formas de tococromanóis duplica a quantidade de antioxidantes produzida por estas plantas. É importante salientar que esta foi a única espécie que manteve as folhas nas quatro condições ambientais impostas, e, mesmo com os danos na lâmina foliar observados no tratamento seca, as plantas conseguiram se recuperar mantendo as folhas velhas e produzindo folhas novas.

### 3.6.3 Conteúdo de $\alpha$ -tocoferol - Influência do Tempo

O caráter de bioindicador de estresse atribuído ao  $\alpha$ -tocoferol (Hormaetxe *et al.* 2005) reside no fato de sua concentração ser tanto maior quanto maior o estresse sofrido pela planta sob certas condições ambientais. O incremento de  $\alpha$ -tocoferol está associado à tolerância ao estresse, e o decréscimo à susceptibilidade ao estresse (Munné-Bosch & Alegre 2002). Diante disso, para as três condições ambientais potencialmente estressantes testadas (escuro, seca e inundação artificial), na espécie *Garcinia brasiliensis* a condição de submersão pode ser considerada como aquela que não induz ao estresse, já que todas as plantas submetidas a este tratamento foram sempre as que demonstraram o menor conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol, em relação aos demais fatores ambientais testados, sem, contudo, diminuir seu conteúdo quando comparadas às taxas do período inicial.

A espécie *Pouteria glomerata*, da mesma forma, não mostrou alteração do conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol com a inundação. Embora valores similares (ao redor de  $2\mu\text{g cm}^{-2}$ ) tenham sido medidos para os outros dois parâmetros ambientais analisados (seca e escuro), as plantas submetidas a eles sofreram abscisão foliar. Esta espécie se mostra altamente adaptada à condição de inundação, mantém as folhas, não aumenta o reservatório de  $\alpha$ -tocoferol e, além disso, conseguiu se recuperar produzindo folhas novas ao sair das condições de potencial estresse.

Já a espécie *Laetia corymbulosa*, embora tenha apresentado maior conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol no tratamento inundação, esses valores estão muito próximos aos encontrados no *screening* de vitamina E, ou seja, fora da condição de estresse. As mesmas plantas apresentaram valores de  $\alpha$ -tocoferol significativamente crescentes no seu período de recuperação, situação esperada para plantas que acabaram de sair da submersão, quando uma quantidade maior de antioxidantes é necessária para manter a integridade dos tecidos.

A produção elevada evita danos metabólicos causados pela reentrada da planta a uma condição totalmente aeróbica (Vartapetian & Jackson 1997), assim como protege o fotossistema PSII na fotoaclimatação (Harvaux *et al.* 2000, Harvaux *et al.* 2005).

Ao contrário de *L. corymbulosa*, as plantas de *G. brasiliensis* no tratamento seca, apresentaram aumento crescente e significativo do reservatório de  $\alpha$ -tocoferol, o que demonstra que para esta espécie a condição de seca é mais estressante do que os demais fatores ambientais testados. Blokhina (2000) salienta que sob condições metabólicas normais a formação de ERO e a peroxidação de membranas lipídicas estão em equilíbrio dinâmico com a atividade dos sistemas antioxidantes, contudo, qualquer mudança nas condições ambientais pode alterar esse equilíbrio e levar ao estresse oxidativo, como observado para esta espécie.

As plantas que permaneceram na casa de vegetação e que estavam há mais tempo na condição de fotoperíodo aumentado, mostraram aumento no reservatório de  $\alpha$ -tocoferol e mantiveram esse aumento mesmo aos 169 dias, final do experimento. Para estas plantas as condições ambientais foram alteradas com o passar dos meses em função do aumento do fotoperíodo diário para 18 horas de luz (verão no Hemisfério Norte), o que possivelmente alterou as condições metabólicas e causou desequilíbrio no sistema antioxidante (Blokhina 2000). Da mesma forma, as plantas do tratamento de inundação artificial e do escuro, que se encontravam na câmara climática 2, após serem retiradas dessas condições e voltado para a casa de vegetação, mostraram aumento do conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol sob tais condições.

As florestas inundáveis são ambientes de condições extremas, onde, em períodos diferentes do mesmo ano, as espécies experimentam condições ambientais completamente diversas. Em certos períodos as plantas encontram-se submersas e no escuro, em outros períodos encontram-se em ambiente seco com radiação intensa (Junk & Piedade 1997). Embora cada uma das três espécies avaliadas apresente estratégias diferentes para sobreviver às condições de estresse dominantes, todas sobreviveram em qualquer das condições impostas de forma altamente funcional, seja através do aumento do conteúdo de antioxidantes, ou pela perda de folhas, e ainda mostraram rapidez de recuperação.

### 3.6.4 Conteúdo de $\delta$ -tocotrienol - Influência do Tempo

A função dos tocotrienóis nas plantas é pouco conhecida, contudo a eles também é atribuída a função de antioxidantes (Falk *et al.* 2004), assim, considerando-se esta função, mais uma vez para o  $\delta$ -tocotrienol, as plantas de *G. brasiliensis* submetidas à inundação mostraram os menores valores com diminuição significativa para este composto. Estes resultados corroboram aqueles encontrados para o  $\alpha$ -tocoferol na mesma espécie, mostrando que sob tais condições a planta não demonstra aumento do conteúdo e sim o oposto, e considerando que as plantas mantiveram as folhas e continuaram vivas sob submersão, possivelmente isto sinaliza a ausência de estresse (Munné-Bosch & Alegre 2002).

As plantas do escuro mostraram valores elevados ( $6 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) de  $\delta$ -tocoferol quando transferidas para a casa de vegetação, situação na qual o fotoperíodo diário aumentou em 4 horas para estas plantas, que haviam saído de 4 meses de supressão da luz. Já as plantas da casa de vegetação, aclimatadas à esta condição, mostraram os menores valores. Isto sugere que o  $\delta$ -tocotrienol deveria ser melhor investigado nesta espécie, testando-se seu papel no estresse oxidativo causado pelo excesso de luminosidade, uma vez que as folhas apresentaram conteúdo igual ou superior de  $\delta$ -tocotrienol comparada ao  $\alpha$ -tocoferol, diferente do padrão citado em literatura, que postula que as duas formas mais comuns em folhas são  $\alpha$  e  $\gamma$ -tocoferol (Munné-Bosch & Alegre 2002).

Embora não se conheça muito sobre o papel dos tocotrienóis, pois grande parte dos trabalhos realizados com tococromanóis é no contexto da biologia molecular com *Arabidopsis thaliana* ou com algas do gênero *Synechocystis* (Shintani & DellaPenna 1998, DellaPenna 1999, Cahoon *et al.* 2003, Ajjawi & Shintani 2004, Sattler *et al.* 2004, Falk *et al.* 2002, DellaPenna 2005, Havaux *et al.* 2005), com sementes de espécies anuais (Dörmann 2003, Falk *et al.* 2003, Falk *et al.* 2004, Desel & Krupinska 2005) com espécies de clima temperado (García-Plazaola & Becerril 2001, Falk *et al.* 2003, Hansen *et al.* 2003, García-Plazaola *et al.* 2004). Ainda que seja assim, é provável que os tocotrienóis tenham papel crucial em alguns grupos filogenéticos de florestas tropicais, tais como as Clusiaceae, família à qual pertence o gênero *Garcinia*, ou ainda famílias com espécies lactescentes tais como as Euphorbiaceae, como visto no capítulo 2.

Munné-Bosch & Alegre (2002) afirmam que ainda são necessários mais estudos para entender melhor a biossíntese destes compostos e a relação entre tocoferóis e tocotrienóis. O presente estudo corrobora esta necessidade.

### 3.6.5 Fluorescência da Clorofila *a*

Durante todo o período experimental, as três espécies estudadas apresentaram a razão Fv/Fm acima de 0,5, valor abaixo do qual, em princípio, podem ocorrer danos reversíveis ao aparato fotossintético (Björkman & Demmig 1987). Os resultados encontrados para as três espécies são também muito superiores àqueles observados por Waldhoff *et al.* (2000). Neste experimento, um dos poucos realizados sob condições comparáveis às do presente estudo, também em câmaras climáticas, três outras espécies de várzea amazônica, *Nectandra amazonum*, *Tabernaemontana juruana* e *Gustavia augusta*, foram registrados, logo no primeiro dia, imediatamente após a submersão e supressão de luz, valores abaixo de 0,2, faixa a partir da qual ocorrem danos irreversíveis (Björkman & Demmig 1987, Bolhàr-Nordenkampf & Götzl 1992). Contudo, Waldhoff *et al.* (2000) promoveram a inundação instantânea das plantas, ao invés de fazê-lo gradualmente, como ocorre no ambiente natural. Mesmo assim, apesar dos valores baixos inicialmente observados, após 8 dias as espécies se mostraram recuperadas e apresentaram valores de Fv/Fm próximos a 0,8, tendo estes valores perdurado até o fim do experimento, cuja duração foi de 20 dias.

Em outro estudo, também com uma espécie de várzea, *Symmeria paniculata*, valores bem mais parecidos com o presente trabalho foram observados por Waldhoff *et al.* (2002). Neste caso, as plantas utilizadas pelos autores encontravam-se no ambiente natural, e foram medidas folhas situadas de 0 a 1 m de profundidade, durante dois ciclos anuais de inundação. Os resultados não evidenciaram relação entre os valores de Fv/Fm e as mudanças de coluna de água derivadas do pulso de inundação do rio.

As plantas do presente estudo sofreram inundação gradativa, ao contrário do procedimento seguido em todos os trabalhos anteriormente realizados com as espécies de várzea (Waldhoff *et al.* 1998, 2000, Ferreira, 2002, 2006), onde a submersão total ou parcial sempre foi imposta abruptamente. É possível que com o nível da água subindo vagarosamente (10 cm/dia) as plantas tenham um curto período de tempo de aclimação à condição imposta, o que resultou em valores próximos aos encontrados no ambiente natural por Waldhoff *et al.* (2002).

Assim como as plantas sob inundação artificial, as plantas da casa de vegetação mostraram valores da razão  $F_v/F_m$  entre 0,7 e 0,8, como era predito, visto que estas plantas não sofreram diminuição de umidade, supressão de luz ou submersão, estando, teoricamente, sob condições ótimas.

Um aspecto interessante foi que na condição de seca, as espécies *L. corymbulosa* e *P. glomerata*, ao mostrarem valores da razão  $F_v/F_m$  inferiores a 0,6, perderam as folhas. Para muitos autores o declínio da razão entre os parâmetros  $F_v/F_m$  é um bom indicador de estresse, especialmente afetando a função do fotossistema II (Bolhàr-Nordenkampf et al. 1989, Krause & Somersalo 1989, Haag-Kerwer et al. 1996). Provavelmente, sob tais condições, para estas espécies é mais vantajoso, ao contrário do observado para *Garcinia brasiliensis*, produzir novas folhas após o período desfavorável do que recuperar os danos sofridos no aparato fotossintético foliar durante o período de estresse, uma vez que para a manutenção destes tecidos o gasto de energia é grande (Blokina et al. 2003).

As plantas do escuro, mesmo sem um decréscimo da razão  $F_v/F_m$  abaixo de 0,6, também sofreram abscisão foliar. Neste caso, a perda de folhas pode estar relacionada à respiração, pois plantas jovens respiram mais intensamente do que plantas mais velhas (Larcher 2000), e para manter seu metabolismo ativo a planta necessita de energia, porém com a supressão da luz, não há necessidade da manutenção do aparato fotossintético. Além disso, sabe-se também que mudanças na condição de luz podem alterar as taxas respiratórias de forma peculiar para cada espécie considerada (Medina 1998).

### **3.6.6 Análise Microscópica da Anatomia Foliar**

As plantas utilizadas para o estudo anatômico da lâmina foliar encontravam-se em duas condições ambientais distintas: em casa de vegetação e após 4 meses de submersão e escuro. Nas plantas da casa de vegetação foram observadas folhas mesofíticas dorsiventrais (Souza 2003, Menezes et al. 2003), para as três espécies estudadas, porém, podem ser notadas algumas variações na lâmina foliar das plantas que permaneceram submersas.

Em espécies de florestas inundáveis, características semelhantes às encontradas neste estudo, tais como a compactação do parênquima esponjoso com poucos espaços intercelulares e a presença de cutícula espessa, têm sido registradas (Schlüter & Furch 1992, Waldhoff et al. 2002 e Waldhoff 2003).

Nas três espécies deste estudo foi observada a diminuição dos espaços intercelulares e em *G. brasiliensis* é evidente a presença de cutícula espessa nas duas

condições ambientais avaliadas. Waldhoff *et al.* (2002) e Waldhoff (2003) consideram que tais características conferem a estas plantas um caráter xeromórfico, já salientado por vários autores (Esau 1985, Fahn & Cutler 1992, Lindorf 1993). Entretanto, Shields (1950) destaca que fatores ambientais podem induzir um grau de xeromorfia em folhas normalmente mesomórficas (=mesofíticas), como pode ser o caso deste estudo, onde as plantas que permaneceram em condições de casa de vegetação apresentaram uma anatomia da lâmina foliar distinta da observada nas mesmas espécies após 4 meses de submersão e escuro. O estudo de Waldhoff (2003) foi feito com folhas de plantas que se encontravam no pico da fase aquática, possivelmente em uma condição semelhante a das plantas submersas no presente experimento.

### 3.6.7 Formação de Raízes Adventícias em Folhas

Para alguns grupos filogenéticos é mencionada a produção de raízes nas folhas, mas para a formação de um propágulo, como a reprodução vegetativa de uma planta inteira, este fenômeno é restrito a grupos específicos como as Crassuláceas (plantas suculentas). Algumas espécies deste grupo se propagam com facilidade, pois as folhas possuem gemas que propiciam a produção de uma nova planta a partir de uma única folha (Souza & Lorenzi 2005). Algumas Violaceae apresentam a mesma capacidade. A espécie *Laetia corymbulosa* é uma Flacoutiaceae que segundo Ribeiro *et al.* (1999) é taxonomicamente próxima das Violáceas. Todavia, tanto nas Crassuláceas quanto nas Violáceas, a produção de raízes para reprodução vegetativa ocorre em espécies herbáceas.

A formação de raízes em folhas é ainda relatada para a espécie herbácea *Plantago lanceolata* por indução através da aplicação do hormônio ácido indol-3-acético (AIA), para clonar em larga escala esta espécie e utilizá-la em estudos científicos. A produção de raízes em folhas de *P. lanceolata* nunca foi observada quando as plantas se encontravam em seu ambiente natural (Wu & Antonovics 1975).

As raízes são órgãos especializados em fixação, absorção, reserva e condução, todavia, raízes adventícias, originadas nas partes aéreas das plantas, por exemplo, nas folhas, têm papel importante na propagação vegetativa da planta (Apezzato-da-Glória & Hayashi 2003).

No caso deste estudo, a formação de raízes adventícias foi observada na lâmina de folhas presas à planta, assim como em folhas que estavam caídas no fundo do tanque. Para as folhas que estavam presas à planta, possivelmente a função destas raízes está associada

à captação de nutrientes direto da água, uma vez que a captação direta do solo sob inundação está dificultada (Drew 1997). Já nas folhas que foram encontradas no fundo do tanque, é possível que estas raízes tenham uma segunda função, a qual pode estar relacionada à reprodução vegetativa, embora não tenha sido observado o desenvolvimento de uma nova planta após o plantio destas folhas, devido a problemas de irrigação na casa de vegetação.

A produção de raízes adventícias ocorreu a partir das nervuras da folha, indicando a presença de um tecido que irá se transformar em raiz. Dessa forma, a reprodução vegetativa pode ser possível, e esta, sem dúvida, é uma questão a ser investigada em futuros estudos.

É importante ressaltar que a formação deste tipo de raízes não foi registrada antes em qualquer dos experimentos realizados com inundação artificial de espécies arbóreas de florestas inundáveis da Amazônia (Coutinho & Struffaldi 1971, Waldhoff *et al.* 1998, 2002, Parolin 2001a, 2002, Ferreira 2002, 2006) ou mesmo observada em condições naturais.

### **3.6.8 Manutenção, Perda e Produção de Folhas**

As duas espécies que perderam folhas nos tratamentos de escuro e seca foram *Laetia corymbulosa* e *Pouteria glomerata*, nas quais não foi observada, em plantas da casa de vegetação, a presença de cutícula na epiderme foliar.

No tratamento de seca, as plantas encontravam-se em 45% ( $\pm$  5%) de umidade, situação diferente do ambiente natural. Sob tais condições, estas provavelmente perderam suas folhas, pois a dessecação causada pela perda de água para a atmosfera pode ser letal; este problema pode ainda ser agravado pela ampla área da superfície foliar (Taiz & Zeiger 2004). É possível que sob tais condições, a perda das folhas garanta a sobrevivência para estas plantas. Schöngart *et al.* (2002) afirmam que nas espécies das florestas inundáveis o desenvolvimento de folhas é mais fortemente relacionado às mudanças na disponibilidade de água do que à produção de flores e frutos.

A presença da cutícula sobre a epiderme da lâmina foliar restringe a respiração e a transpiração (Esau 1985) e, de acordo com Taiz & Zeiger (2004), uma resposta evolutiva comum ao estresse hídrico é a produção de uma cutícula espessa que reduz a perda de água pela epiderme (transpiração cuticular). Esta pode ser a explicação para o fato de que a

única planta a manter as folhas em todas as condições experimentais testadas foi *G. brailiensis*, única espécie que possuía cutícula espessa na epiderme foliar.

No escuro, como já discutido anteriormente, provavelmente a perda de folhas esteja relacionada à respiração, (item 3.6.5 fluorescência de clorofila).

As plantas submetidas às três condições potencialmente estressantes, inundação artificial, escuro e seca, quando retornaram a uma condição favorável, produziram folhas novas e mostraram capacidade de recuperação em qualquer dos ambientes testados, mostrando que a variedade de fatores ambientais impostas a estas espécies no ambiente natural pode ser contornada e o sucesso no estabelecimento pode ser alcançado.

Embora algumas espécies de florestas inundáveis permaneçam periodicamente cerca de 230 dias ao ano inundadas (Schöngart et al. 2003, Wittmann *et al.* 2004), as demais condições experimentais testadas não se reproduzem no ambiente natural. Em nenhuma circunstância as plantas, mesmo durante a fase terrestre, recebem mais de 12 horas de fotoperíodo, como ocorreu na casa de vegetação, ou ainda 12 horas de incidência luminosa direta, menos de 80% de umidade relativa, ou os dois fatores combinados como no tratamento de seca na câmara climática 2.

Desta forma, pode-se dizer que estas plantas sofrem estresse? Diante da adaptabilidade e dos múltiplos mecanismos existentes para se ajustar às condições de alternância de fatores ambientais de áreas alagáveis, tal definição deve ser revista para grande parte das espécies deste ambiente.

### 3.7 Conclusões

- O conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol pode aumentar em condições diferentes daquelas consideradas ideais, existentes no início do experimento. Especialmente sob condições de fotoperíodo aumentado, no caso das espécies *G. brasiliensis* e *P. glomerata*.
- O tempo de exposição a um dado fator ambiental é capaz de influenciar a produção  $\alpha$ -tocoferol para as espécies deste estudo.
- A função do  $\delta$ -tocotrienol precisa ser melhor investigada para as espécies amazônicas, bem como a associação entre as diferentes formas de vitamina E existente em folhas de espécies arbóreas de florestas de várzea.

- Sob condições de inundação os dados de fluorescência da clorofila *a* não indicaram qualquer dano ao fotossistema II, da mesma forma que as plantas que permaneceram na casa de vegetação.
  
- A submersão provocou nas plantas das três espécies modificações na anatomia foliar (diminuição dos espaços intercelulares no parênquima esponjoso). Assim como na espécie *L. corymbulosa* levou a produção de raízes adventícias.
  
- Embora com diferentes estratégias de manutenção e perda de folhas as três espécies sobreviveram a todas as condições potencialmente estressantes impostas e mostraram rapidez de recuperação.

#### 4. Considerações Finais

O presente trabalho foi idealizado a partir de uma experiência em um projeto piloto de inundação artificial com uma espécie arbórea de várzea, *Nectandra amazonum*, realizado por uma equipe de cooperação entre o Max-Planck Instituto de Limnologia de Plön e a Universidade de Kiel, envolvendo pesquisadores brasileiros e alemães, coordenada pelo Dr. Jon Falk.

O experimento daquele grupo foi realizado nas mesmas instalações nas quais foi desenvolvido o presente estudo, e foram utilizadas condições idênticas na câmara climática. Contudo, naquele experimento foi acompanhada apenas uma espécie, que foi submetida à submersão instantânea, ao invés de gradual.

Os resultados deste experimento mostraram que o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol inicialmente caiu, e após alguns dias de submersão subiu a níveis muito altos, nunca registrados em literatura. Diante de resultados tão surpreendentes e da possibilidade de mais um estudante brasileiro realizar seu doutorado com essa temática, decidiu-se repetir, não apenas o experimento, como também aumentar o número de indivíduos e de espécies a serem estudadas, e desta vez tentar simular as condições naturais de inundação gradativa. Adicionalmente, outros tratamentos foram acrescentados (seca e escuro), de forma a poder interpretar com maior segurança os efeitos da inundação, isolando-os de fatores abióticos distintos e potencialmente estressantes. Assim, o desenho experimental do presente estudo foi montado.

Contrariando os elevados valores de  $\alpha$ -tocoferol observados para a espécie *N. amazonum*, para as três espécies submetidas à inundação artificial no presente estudo (*Garcinia brasiliensis*, *Laetia corymbulosa* e *Pouteria glomerata*) não foram registrados valores elevados desse composto. Ao contrário, quando sob submersão, em *Garcinia brasiliensis* foram registrados os menores valores de  $\alpha$ -tocoferol, em relação aos demais tratamentos.

Avaliando-se os resultados obtidos neste estudo e comparando-os àqueles do experimento anterior, duas possibilidades podem ser discutidas: a primeira é no sentido de corroborar a hipótese de que a inundação gradativa possibilita às plantas um espaço de tempo necessário para a aclimatação, antes da submersão completa. Por outro lado, a espécie utilizada no primeiro experimento foi outra, *N. amazonum*, que neste estudo apareceu entre as espécies de crescimento mais rápido, enquanto que *Garcinia brasiliensis*,

*Laetia corymbulosa* e *Pouteria glomerata*, estão entre as de crescimento mais lento (capítulo 2).

A submersão instantânea imposta a uma planta talvez seja capaz de gerar estresse oxidativo imediato em ordem de magnitude maior do que quando esse processo é gradativo. Neste caso, a planta aumentaria as concentrações de  $\alpha$ -tocoferol para tolerar o estresse imposto abruptamente. Outra possibilidade seria de que, uma vez que as taxas de crescimento das espécies mostraram-se relacionadas ao conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol (capítulo 2), as plantas com taxas de crescimento lento reagem à inundação artificial de maneira diferente daquela observada para a espécie *Nectandra amazonum*, seja ela abrupta ou gradativa.

Para testar estas hipóteses sugere-se a realização de um novo experimento, desta vez com *N. amazonum* e uma das três espécies do presente estudo, impondo a estas espécies as duas condições de inundação artificial, uma de submersão instantânea e outra gradativa. Deste modo, a função do  $\alpha$ -tocoferol em resposta ao alagamento em espécies de várzea da Amazônia Central, ambiente de condições extremas, poderá ser mais bem elucidada.

O presente trabalho abre ainda uma série de possibilidades para novos estudos com tococromanóis. Particularmente espécies lactescentes que habitam as florestas alagáveis amazônicas podem e devem ser investigadas, já que estas poderão contribuir de forma substancial, entre outros, ao conhecimento sobre a interação entre tocoferóis e tocotrienóis.

Estudos desta natureza mostram ainda como uma adequada abordagem bioquímica pode se constituir em uma ferramenta poderosa para a ecologia aplicada. Se a inundação gradativa favorece a aclimatação de espécies, interferências antrópicas em florestas naturais podem ser planejadas de forma a causar menor impacto, como por exemplo, situações em que o homem impõe inundação através de barragens para diferentes propósitos em florestas naturais.

Finalmente, é imperativo que se dê continuidade a estudos de mecanismos adaptativos em árvores de áreas alagáveis amazônicas. O laboratório natural que tais ambientes representam foi muito pouco explorado e, sem dúvida, propiciará uma enorme gama de resultados novos para o conhecimento científico, a começar pela premente redefinição do conceito de estresse de inundação.

## 5. Referências

- ADIS, J. 1984. Seasonal igapó-forests of Central Amazonian black-water rivers and their terrestrial arthropod fauna. In: Sioli, H. (ed.). *The Amazon. Limnology and landscape ecology of a might tropical river and its basin*. Dr. W. Junk Publ., Dordrecht, The Netherlands. Cap. 9, pp. 245-268.
- AJJAWI, I. & SHINTANI, D. 2004. Engineered plants with elevated vitamin E: a nutraceutical sucess story. *Trends Biotechnol* 22: 104-107.
- ANDERSEN, G. 2004. *Untersuchungen zur Auswirkung der Überexpression des für die 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase kodierenden Gens aus Gerste (*Hordeum vulgare* L.) in Tabak (*Nicotiana tabacum* L.)*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-universität zu Kiel.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & HAYASHI, A. H. 2003. Raiz. In: Appezzato-da-Glória, B., Carmello-Guerreiro, S. M. (eds.). *Anatomia Vegetal*. Universidade Federal de Viçosa, UFV. Cap. 10, pp. 267-281.
- ARMSTRONG, W. 1979. Aeration in higher plants. *Advances in Botanical Research* 7: 225-332.
- ASADA, K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer, C. H. & Mullineux, P. M. (eds.). *Causes of Photo-oxidative Stress and Amelioration of Antioxidant Defense Systems in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 77-104.
- ASADA, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.

- AYRES, J. M. 1993. *As matas de várzea do Mamirauá*. Médio rio Solimões. CNPq – Programa Trópico Úmido e Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, DF.
- BARTHEM, R. 2001. Componente Biota Aquática. In: Capobianco, J. P. R.; Veíssimo, A.; Moreira, A.; Sawyer, D.; Santos, I.; Pinto, P. L. (eds.). *Biodiversidade na Amazônia Brasileira*. Estação Liberdade – Instituto Socioambiental, São Paulo. pp. 60 – 78.
- BAZZAZ, F.A. & PICKETT, S. T. A. 1980. Physiological ecology of tropical succession: a comparative review. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 287-310.
- BJÖRKMAN, O. & DEMMIG, B. 1987. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.
- BLOKHINA, O. 2000. *Anoxia and Oxidative Stress: Lipid Peroxidation, Antioxidant Status and Mitochondrial Functions in Plants*. University of Helsinki. Academic Dissertation Ph.D. Thesis, 79 p.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E. & FAGERSTEDT, K. V. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress. *Annals of Botany* 90: 179-194.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R. & GÖTZL, M. 1992. Chlorophyllfluoreszenz als Indikator der mit der Seehöhe zunehmenden Stressbelastung von Fichtennadeln. *FBVA-Berichte Schriftenreihe der Forstlichen Bundesversuchsanstalt* 67: 119–131.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LONG, S. P.; BAKER, N. R.; ÖQUIST, G.; SCHREIBER, U. & LECHNER, E. G. 1989. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Funct. Ecol.* 3: 497-514.
- BONGERS, F.; POPMA, J.; DEL CASTILLO, J. M. & CARAIBAS, J. 1988. Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegatatio* 74: 55-80.

- BOOTH, V. H. & HOBSON-FROHOCK, A. 1961. *J. Sci. Food Agric.* 12, 251.
- BRAMLEY, P. M.; ELMADFA, I.; KAFATOS, A.; KELLY, F. J.; MANIOS, Y.; REXBOROUGH, H. E.; SCHUCH, W.; SHEEHY, P. J. A. & WAGNER, K. -H. 2000. *J. Sci. Food Agric.* 80: 913-938.
- BRUNIG, E. F. 1983. Vegetation structure and growth. In: Golley FB (ed.). *Tropical rain forest ecosystems. Structure and Function*. Elsevier Amsterdam. pp. 49-75.
- BUDOWSKI, G. 1965. Distribution of tropical American rain forest species in the light of successional processes. *Turrialba* 15: 40-42.
- BUETTNER, G. R. 1993. The pecking order of free radicals & antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol & ascorbate. *Arch. Biochem. Bioph.* 300(2): 535-543.
- CÂMARA, C. A. G. DA; MARSAIOLI, A. J. & BITTRICH, V. 2002. Derivados do tocoferol inéditos do látex de *Clusia grandiflora*. 25<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade brasileira de Química – SBQ.
- CAHOON, E. B.; HALL, S. E.; RIPP, K. G.; GANZKE, T. S.; HITZ, W. D. & COUGHLAN, S. J. 2003. Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotech.* 21: 1082-1087.
- CASTRO, M. DE M. & MACHADO, S. R. 2003. Células e tecidos secretores. In: Appezzato-da-Glória B., Carmello-Guerreiro S. M. (eds.). *Anatomia Vegetal*. Universidade Federal de Viçosa, UFV. Cap. 7, pp. 179-203.
- COLONNELLO, G. 1990. A Venezuelan floodplain study on the Orinoco river. *For. Ecol. Manag.* 33/34: 103-124.
- COUTINHO, L. M. & STRUFFALDI, Y. 1971. Observações sobre a germinação das sementes e o crescimento das plântulas de uma leguminosa da mata amazônica de igapó (*Parkya auriculata* Spruce Mss.). *Phyton* 28(2): 149 – 159.

- CRAWFORD, R. M. M. 1978. Metabolic adaptations to anoxia. In: Hook, D. D.; Crawford, R. M. M. (eds.). *Plant life in anaerobic environments*. Ann Arbor Science, Londres. pp. 119-136.
- CRAWFORD, R. M. M. & BRAENDLE, R. 1996. Oxygen deprivation stress in a changing environment. *Journal of Experimental Botany*, 47(295): 145-159.
- DELLAPENNA, D. 1999. Nutritional genomics: manipulating plant micronutrients to improve human health. *Science* 285: 375-379.
- DELLAPENNA, D. 2005. A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *Journal of Plant Physiology* 162: 729-737.
- DELLAPENNA, D. & POGSON, B. J. 2006. Vitamin Synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Ann. Rev. Plant. Biol.* 57: 711-738.
- DeLONG, J. M. & STEFFEN, K. L. 1997. Photosynthetic function, lipid peroxidation, and  $\alpha$ -tocopherol content in spinach leaves during exposure to UV-B radiation. *Can.J. Plant Sci.* 77: 453-459.
- DENNIS, E. S.; DOLFERUS, R.; ELLIS, M.; RAHMAN, M.; WU, Y.; HOEREN, F. U.; GROVER, A.; ISMOND, K. P.; GOOD, A. G. & PEACOCK, W. J. 2000. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *Journal of Experimental Botany* Vol. 51, n° 342. MP Special Issue, pp. 89-97.
- DENSLOW, J. S. 1980. Gap partitioning among tropical rain forest trees. *Biotropica* 12: 47-55.
- DESEL, C. & KRUPINSKA, K. 2005. The impact of tocopherols on early seedling development and NO release. *Journal of Plant Physiology* 162: 771-776.
- DESIKAN, R.; NEIL, S. J. & HANCOCK, J. T. 2000. Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Rad. Biol. Méd.* 5:773-778.

- DÖRMANN, P. 2003. Corn with enhanced antioxidant potential. *Nature Biotechnology*, Vol. 21, n° 9, pp. 1015-1016.
- DREW, M. C. 1997. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 223-250.
- DUCKE, A. & BLACK, G. A. 1953. Notas sobre a fitogeografia da Amazônia brasileira. *Bol. Tec. Inst. Agron. Norte* 29: 1-69.
- ESAU, K. 1985. *Anatomia vegetal*. Ediciones Omega, S. A., Barcelona. 779 p.
- FAHN, A. & CUTLER, D. F. 1992. *Xerophytes*. Gebrueder Borntraeger, Berlin.
- FALK, J.; ANDERSEN, G.; KERNEBECK, B. & KRUPINSKA, K. 2003. Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. *FEBS Letters* 540: 35-40.
- FALK, J.; KRAHNSTÖVER, A.; VON DER KOOIJ, T. A.; SCHLENSOG, M. & KRUPINSKA, K. 2004. Tocopherol and tocotrienol accumulation during development of caryopses from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Phytochemistry* 65: 2977-2985.
- FALK, J.; KRAUSS, N.; DÄHNHARDT, D. & KRUPINSKA, K. 2002. The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress. *J. Plant Physiol.* 159: 1245-1253.
- FERNANDEZ-CORRÊA, A. F. & FURCH, B. 1992. Investigations on the tolerance of several trees to submergence in blackwater (igapó) and white-water (várzea) inundation forests near Manaus, Central Amazonia. *Amazoniana* 12: 71-84.
- FERREIRA, C. S. 2002. *Germinação e adaptações metabólicas e morfo-anatômicas em plântulas de *Hymathantus sucuuba* (Spruce) Wood., da ambientes de várzea e terra*

*firme na Amazônia Central*. Dissertação de Mestrado INPA/FUA. Manaus, AM. 78 p.

FERREIRA, C. S. 2006. *Aspectos morfoanatômicos, bioquímicos e genéticos de Himatanthus succuba, em ambiente de várzea e de terra firme da bacia Amazônica*. Tese de Doutorado, INPA/FUA. Manaus, AM. 102p.

FERREIRA, L. V. 1991. *O efeito do período de inundação na zanação de comunidades. Fenologia e regeneração em uma floresta de igapó na Amazônia Central*. Dissertação de Mestrado, INPA/FUA, Manaus, AM, 161p.

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

FERREIRA, L. V. 2000. Effects of flooding duration on species richness, floristic composition and forest structure in river margin habitat in Amazonian blackwater floodplain forest: Implications for future design of protected areas. *Biodivers. Conserv.* 9(1): 1-14.

FRANZEN, J.; BAUSCH, J.; GLATZLE, D. & WAGNER, E. 1991. Distribution of vitamin E in spruce seedling and mature tree organs, and with the genus. *Phytochemistry* 30: 2911-2913.

FRYER, M. J. 1992. The antioxidant effects of thylakoid vitamin E content during development of some seedlings. *Plant Cell Environ.* 15: 381-392.

FUKUZAWA, K.; TOKUMURA, A.; OUCHI, S. & TSUKATANI, H. 1982. Antioxidant activities of tocopherols on Fe<sup>2+</sup>-ascorbate-induced lipid peroxidation in lecithin liposomes. *Lipids* 17: 511-513.

FURCH, B. 1984. Untersuchungen zur Überschwemmungstolerance von Bäumen der Várzea und des Igapó. *Biogeographica* 19: 77-83.

- GARCÍA-PLAZAOLA, J. I.; ARTETXE, U. & BECERRIL, J. M. 1999. Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* (L.) during winter. *Plant Science* 143: 125-133.
- GARCÍA-PLAZAOLA, J. I. & BECERRIL, J. M. 2001. Seasonal changes in photosynthetic pigments and antioxidants in beech (*Fagus sylvatica*) in a Mediterranean climate: implications for tree decline diagnosis. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 225-232.
- GARCÍA-PLAZAOLA, J. I.; BECERRIL, J. M.; HERNÁNDEZ, A.; NIINEMETS, Ü. & KOLLIST, H. 2004. Acclimation of antioxidant pools to the light environment in a natural forest canopy. *New Phytol.* 163: 87-97.
- GILL, C. J. 1970. The flooding tolerance of woody species a review. *Forest Abstracts* 31: 671-688.
- GIROTTI, A. W. 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39: 1529-1542.
- GOFFMAN, F. D.; THIES, W. & VELASCO, L. 1999. Chemotaxonomic value of tocopherols in Brassicaceae. *Phytochemistry* 50: 793-798.
- GOULDING, M. 1983. The role of fishes in seed dispersal and plant distribution in Amazonian floodplain ecosystems. *Sonderbd. Naturwiss. Ver.* 7: 271-283, Hamburg.
- GRUSAK, M. A. & DELLAPENNA, D. 1999. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 133-161.
- HAAG-KERWER, A.; GRAMS, T. E. E.; OLIVARES, E.; BALL, E.; ARNDT, S.; POPP, M.; MEDINA, E. & LÜTTGE, U. 1996. Comparative measurements of gas-exchange, acid accumulation and chlorophyll a fluorescence of different species of *Clusia* showing C3 photosynthesis, or crassulacean acid metabolism, at the same field site in Venezuela. *New Phytol.* 134: 215-226.

- HANSEN, U., SCHNEIDERHEINZE, J.; STADELMANN, S. & RANK, B. 2003. The  $\alpha$ -tocopherol content of leaves of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) variation over the growing season and along the vertical light gradient in the canopy. *J. Plant Physiol.* 160: 91-96.
- HAVAUX, M.; BONFILS, J.-P.; LÜTZ, C. & NIYOGI, K. K. 2000. Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the npq1 *Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophylls cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiology*, Vol. 124: pp. 273-284.
- HAVAUX, M.; EYMERY, F.; PORFIROVA, S.; REY, P. & DÖRMANN, P. 2005. Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, Vol. 17: 3451-3469.
- HAVAUX, M.; LÜTZ, C. & GRIMM, B. 2003. Chloroplast membrane stability in *chlP* transgenic tobacco plants deficient in tocopherols. *Plant Physiology* 132: 300-310.
- HESS, J. L. 1993. Vitamin E,  $\alpha$ -tocopherol. In: Alscher, R. G. & Hess, J. L. (eds.). *Antioxidants in higher plants*. pp. 111-134. CRC Press, Tokyo.
- HIGUCHI, N.; HUMMEL, A. C.; FREITAS, J. V. DE; MALINOWSKI, J. R. E. & STOKES, B. J. 1994. Exploitationen der Wälder der Várzea im Bundesstaat Amazonas. Baumauswahl, Fällung und Transport. *Proceedings of the VIII Harvesting and Transportation of Timber Products*. pp. 168-193. IUFRO/UFPr, Curitiba, Brasilien.
- HOFIUS, D.; HAJIREZAEI, M.; GEIGER, M.; TSCHIRSCHH, H.; MELZER, M. & SONNEWALD, U. 2004. RNAi-mediated tocopherol deficiency impairs photoassimilate export in transgenic potato plants. *Plant Physiology* 135: 1256-1268.
- HOFIUS, D. & SONNEWALD, U. 2003. Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology. *Trends in Plant Sciences* 8: 6-8.

- HORMAETXE, K.; ESTEBAN, R.; BECERRIL, J. M. & GARCÍA-PLAZAOLA, J. I. 2005. Dynamics of the  $\alpha$ -tocopherol pool as affected by external (environmental) and internal (leaf age) factors in *Buxus sempervirens* leaves. *Physiologia Plantarum* 125: 333-344.
- JANISZOWSKA, W. & PENNOCK, J. F. 1976. The biochemistry of vitamin E in plants. *Vitamins and Hormones* 34: 77-105.
- JORDÃO JR., A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M. & VANNUCCHI, H. 1998. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina, Ribeirão Preto* 31: 434-449.
- JUNK, W. J. 1980. Áreas inundáveis um desafio para limnologia. *Acta Amazônica* 10(4): 775-795.
- JUNK, W. J. 1984. Ecology of the várzea floodplain of Amazonian white-water rivers. In: Sioli, H. (ed.). *The Amazon. Limnology and landscape ecology of a might tropical river and its basin*. Cap. 8, pp. 215-243. Dr. W. Junk Publ., Dordrecht, The Netherlands.
- JUNK, W. J. 1989. Flood tolerance and tree distribution in Central Amazonian floodplains. In: Nielsen L. B., Nielsen I. C., Baslev H. (eds.). *Tropical forest: botanical dynamics, speciation and diversity*. pp. 47-64. Academic Press, London.
- JUNK, W. J. 1993. Wetlands of tropical South America. In: Whigham, D. F., Hejny, S. & Dykyjova, D. (eds.). *Wetlands of the World*. pp. 679-739. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- JUNK, W. J.; BAYLEY, P. B. & SPARKS, R. E. 1989. The “flood pulse” concept in the river-systems. In: Dodge, D. P. (ed.). *Proceedings of the International Large River Symposium*. 106: 110-127. Canadian Special Publications of Fisheries and Aquatic Science.

- JUNK, W. J. & PIEDADE, M. T. F. 1997. Plant life in the floodplain with special reference to herbaceous plants. In: Junk, W. J. (ed.). *The Central Amazonian floodplain. Ecology of a Pulsing System*. pp. 147-185. Springer, Berlin.
- JUNK, W. J. & WEBER, G. E. 1996. Amazonian floodplains: a limnological perspective. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 26: 149 - 157.
- JUNK, W. J. & WELCOMME, R. L. 1990. Floodplains. In: B. C. Patten et al. (eds.). *Wetlands and Shallow Continental Water Bodies*. 1: 491 – 524. SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands.
- KAGAN, V. E. 1989. Tocopherol stabilizes membrane against phospholipase A, free fatty acids, and lysophospholipids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 570:121-135.
- KAMAL-ELDIN, A. & APPELQVIST, L. A. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31(7): 671-701.
- KAMAT, J. P.; SARMA, H. D.; DEVASEGAYAN, T. P.; NESARETNAM, K. & BASIRON, Y. 1997. Tocotrienols from palm oil as effective inhibitor of protein oxidation and lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Mol. Cell Biochem.* 170: 131-137.
- KLENKE, M. & OHLY, J. J. 1993. Wood from floodplains. In: Junk WJ, Bianchi HK (eds.) *1st SHIFT Workshop, Belém, 1993*. GKSS Researchcenter, Geesthacht, 88.
- KLINGE, H.; ADIS, J. & WORBES, M. 1995. The vegetation of a seasonal várzea forest in the lower Solimões River, Brazilian Amazon. *Acta Amazonica* 25(3/4): 201-220.
- KLINGE, H.; JUNK, W. J. & REVILLA, C. J. 1990. Status and distribution of forested wetlands in tropical South America. *For. Ecol. Manage.* 33/34: 81 – 101.
- KOZLOWSKI, T. T. 1984. Response of wood plants to flooding. In: Kozlowski T. T. (ed.). *Flooding and Plant Growth*. pp. 129-163. Academic Press, London.

- KOZLOWSKI, T. T. & PALLARDY, S. G. 1984. Effect of flooding on water, carbohydrate, and mineral relations. In: Kozlowski T. T. (ed.). *Flooding and Plant Growth*. pp. 165-193. Academic Press, London.
- KRAUSE, G. H. & SOMERSALO, S. 1989. Fluorescence as a tool in photosynthesis research: application in studies of photoinhibition, cold acclimation and freezing stress. *Phil. Trans. R. Soc. London* 323: 281-293.
- KRAUSE, G. H. & WEIS, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 43, pp. 313-349.
- KRUK, J.; HOLLÄNDER-CZYTKO, H.; OETTMEIER, W. & TREBST, A. 2005. Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Journal of Plant Physiology* 162: 749-757.
- KUBITZKI, K. & ZIBURSKI, A. 1994. Seed dispersal in flood plain forest of Amazonia. *Biotropica* 26(1): 30-43.
- LARCHER, W. 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. RiMa Artes e Textos, São Carlos. 531 p.
- LICHTENTHALER, H. K. 1979. Occurrence and function of prenyl lipids in the photosynthetic membrane. In: Appelqvist, L. A. and Liljenberg, C. (eds.). *Advances in the Biochemistry and Physiology of Plant Lipids*. p. 57-78. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- LICHTENTHALER, H. & PFISTER, K. 1978. *Praktikum der Photosynthese*. Quelle & Meyer, Heidelberg. 182 p.
- LI, M.; LIEBERMAN, M. & LIEBERMAN, D. 1996. Seedling demography in undisturbed tropical wet forest in Costa Rica. In: Swaine, M. D. (ed.). *The ecology of tropical forest tree seedlings*. MAB UNESCO Series Vol. 17, pp. 285-314. Parthenon, Paris.

- LINDORF, H. 1993. Blattstruktur von Pflanzen aus einem feuchten Tropenwald in Venezuela. *Bot. Jahrb. Syst.* 115(1): 45-61.
- MAIA, L. M. de A. 1997. *Influência do pulso de inundação na fisiologia, fenologia e produção de frutos de Hevea spruceana (Euphorbiaceae) e Eschweilera tenuifolia (Lecythidaceae), em área inundável de igapó da Amazônia Central.* Tese de Doutorado. INPA - FUA, Manaus, Am. 195 p.
- MANNHEIMER, S.; BEVILACQUA, G.; CARAMASCHI, E. P. & SCARANO, F. R. 2003. Evidence for seed dispersal by the catfish *Auchenipterichthys longimanus* in an Amazonian lake. *J. Trop. Ecol.* 19: 215-218.
- MAXWELL, K. & JOHNSON, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, pp. 659–668.
- MEDINA, E. 1998. Seedling establishment and endurance in tropical forests: ecophysiology of stress during early stages of growth. pp. 23-43. In Scarano, F. R. & Franco, A. C. (eds.). *Ecophysiological strategies of xerophytic and amphibious plants in the neotropics*. Series Oecologia Brasiliensis, vol. IV. PPGGE-UFRJ. Rio de Janeiro, Brazil.
- MENEZES, N. L.; SILVA, D. C. & PINNA, G. F. A. M. 2003. Folha. In: *Anatomia Vegetal*. Appezzato-da-Glória, B., Carmello-Guerreiro, S. M. (eds.). Universidade Federal de Viçosa, UFV. Cap. 12, pp. 303-325.
- MUNNÉ-BOSCH, S. & ALEGRE, L. 2000. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210: 925-931.
- MUNNÉ-BOSCH, S. & ALEGRE, L. 2002. The function of Tocopherols and Tocotrienols in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21(1): 31-57.
- MUNNÉ-BOSCH, S. & FALK, J. 2004. New insights into the function of tocopherols in plants. *Planta* 218: 323-326.

- MUNNÉ-BOSCH, S. 2005. The role of  $\alpha$ -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* 162: 743-748.
- NEBEL, G., DRAGSTED, J. & VANCLAY, J. K. 2001. Structure and floristic composition of flood plain forests in the Peruvian Amazon II. The understory of restinga forests. *Forest Ecology and Management* 150: 59-77.
- OLIVEIRA, A. C. de 1998. *Aspectos da dinâmica populacional de **Salix martiana** Leyb. (Salicaceae), em áreas de várzea da Amazônia Central*. MSc. Dissertação. INPA/FUA, Manaus. 83 p.
- OLIVEIRA-WITTMANN, A.; PIEDADE, M. T. F.; PAROLIN, P. & WITTMANN, F.. Germination in four low-várzea tree species of Central Amazonia, *Aquatic Botany* (2006), doi: 10.1016/j.aquabot.2006.10.001.
- PANDEY, S.; TIWARI, S. B.; UPADHYAYA, K. C. & SOPORY, S. K. 2000. Calcium signaling: linking environmental signals to cellular functions. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 291-319.
- PAROLIN, P. 1996. *Auswirkungen periodischer Vernaessung und Überflutung auf die Phaenologie, Photosynthese und Blattphysiologie von Baumarten unterschiedlicher Wachstumsstrategien in zentralamazonischen Überrschwemmungsgebieten*. Doktorarbeit. Universität Hamburg.
- PAROLIN, P. 1998. Floristic composition and structure of two stands of *Senna reticulata* differing in age. *Amazoniana* 15(1/2): 113-128.
- PAROLIN, P. 2001a. Morphological and physiological adjustments to waterlogging and drought in seedlings of Amazonian floodplain trees. *Oecologia* 128: 326-335.
- PAROLIN, P. 2001b. Seed germination and early establishment in 12 tree species from nutrient-rich and nutrient-poor Central Amazonian floodplains. *Aquatic Botany* 70: 89-103.

- PAROLIN, P. 2002. Submergence tolerance vs. escape from submergence: two strategies of seedling establishment in Amazonian floodplains. *Environm. and Experim. Botany* 48(2): 177-186.
- PAROLIN, P.; OLIVEIRA, A. C.; PIEDADE, M. T. F.; WITTMANN, F. & JUNK, W. J. 2002. Pioneer trees in Amazonian floodplains: three key species form monospecific stands in different habitats. *Folia Geobotanica* 37: 225-238.
- PIRES, J. M. & PRANCE, G. T. 1985. The vegetation types of the Brazilian Amazon. In.: Prance, G. T. and Lovejoy, T. E. (eds.). *Amazon: Key Environment*. Pergamon Press London. pp. 109-145.
- PRANCE, G. T. 1979. Notes on the vegetation of Amazonia III. The terminology of amazonian forest types subjected to inundation. *Brittonia* 31(1): 26 - 38.
- PRANCE, G. T. 1980. A terminologia dos tipos de florestas Amazônicas sujeitas à inundação. *Acta Amazonica* 10(3): 495 - 504.
- PUHAKKA, M. & KALLIOLA, R. 1993. La vegetación en áreas de inundación en la selva baja de la Amazonia Peruana. In: Kalliola R, Puhakka M, Danjoy W (eds.). *Amazonia Peruana: Vegetación húmeda tropical en el llano subandino*. pp. 113-138. Proyecto Amazonia, Turku.
- PUHAKKA, M.; KALLIOLA, R.; SALO, J. & RAJASILTA, M. 1993. La sucesión forestal que sigue a la migración de rios en la selva baja peruana. In: Kalliola R, Puhakka M, Danjoy W (eds) *Amazonia Peruana: Vegetación húmeda tropical en el llano subandino*. pp. 167-201. Proyecto Amazonia, Turku.
- REVILLA, J. D. C. 1981. *Aspectos florísticos e fitossociológicos do Igapó de Praia Grande, rio Negro, Amazonas*. Dissertação de mestrado, INPA/FUA. Manaus, AM. 191 p.

- REVILLA, J. D. C. 1991. *Aspectos florísticos e estruturais da floresta inundável (várzea) do Baixo Solimões, Amazonas Brasil*. Tese de Doutorado, INPA/FUA, Manaus, AM. 483 p.
- RIBEIRO, J. E. L. DA S., M. J. G. HOPKINS, A. VICENTINI, C. A. SOTHERS, M<sup>A</sup>. A. DA S. COSTA, J. M. DE BRITO, M<sup>A</sup>. A. D. DE SOUZA, L. H. P. MARTINS, L. G. LOHMANN, P. A. C. L. ASSUNÇÃO, E. DA C. PEREIRA, C. F. DA SILVA, M. R. MESQUITA, L. C. PROCÓPIO 1999. Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia central. Manaus:INPA-DFID, Midas Printing Ltd., China. 816 p. il.
- RIPPERT, P.; SCIMEMI, C.; DUBALD, M. & MATRINGE, M. 2004. Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiology*, Vol. 134, pp. 92-100.
- RODRIGUES, W. A. 1961. Estudo preliminar na mata de várzea alta de uma ilha do baixo rio Negro de solo argiloso e úmido. Publicação do INPA - *Série Botânica* 10: 50. Manaus.
- ROUBACH, R. & SAINT-PAUL 1994. Use of fruits and seeds from Amazonian inundated forests in feeding trials with *Calossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Pisces, Characidae). *J. Appl. Ichthyol.* 10: 134-140.
- SATTLER, S. E.; GILLILAND, L. U.; MAGALLANES-LUNDBACK, M.; POLLARD, M. & DELLAPENNA, D. 2004. Vitamin E is Essential for Seed Longevity and for Preventing Lipid Peroxidation during Germination. *The Plant Cell*. 16: 1419-1432.
- SCARANO, F. R. & CRAWFORD, R. M. M. 1992. Ontogeny and the concept of anoxia-tolerance: the case of Amazonian leguminous tree *Parkia pendula*. *Journal of Tropical Ecology* 8: 349-352.
- SCHLÜTER, U. B. 1989. *Morphologische, anatomische und physiologische Untersuchungen zur Überflutungstoleranz zweier charakteristischer Baumarten*

(*Astrocaryum jauari* und *Macrolobium acaciaefolium*) des Weiss- und Schwarzwasserüberschwemmungswaldes bei Manaus. Ein Beitrag zur Ökosystemanalyse von Várzea und Igapó Zentralamazoniens. Ph.D. Thesis, University of Kiel, Kiel, Germany.

SCHLÜTER, U. B. & FURCH, B. 1992. Morphologische, anatomische und physiologische Untersuchungen zur Überflutungstoleranz des Baumes *Macrolobium acaciaefolium*, charakteristisch für die Weiß- und Schwarzwasserüberschwemmungswälder bei Manaus, Amazonas. *Amazoniana* 12: 51-69.

SCHLÜTER, U. B.; FURCH, B. & JOLY, C. A. 1993. Physiological and anatomical adaptations by young *Astrocaryum jauari* Mart. (Araceae) in periodically inundated biotopes of Central Amazonia. *Biotropica* 25(4): 384-396.

SCHNEIDER, C. 2005. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol. Nutr. Food Res.* 49: 7-30.

SCHREIBER, U.; BILGER, W. & NEUBAUER, C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a nondestructive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E. D., Caldwell, M. M. (eds.). *Ecophysiology of Photosynthesis*. pp. 49-70. Springer, Berlin.

SCHÖNGART, J. 2003. Dendrochronologische Untersuchungen in Überschwemmungswäldern der várzea Zentralamazoniens. *Göttinger Beitr Land Forstwirtschaft Tropen Subtropen* 149: 1-257.

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

SCHÖNGART, J.; PIEDADE, M. T. F. & WORBES, M. 2003. Successional differentiation in structure, floristic composition and wood increment of whitewater floodplain forests in Central Amazonia.- In: Lieberei, R., Bianchi, H. K., Boehm, V.

Reissdorf, C. (eds.). *Neotropical Ecosystems*- Proceedings of the German Brazilian Workshop, Hamburg 2000. GKSS Geesthacht, Germany. pp. 589-606.

SEO, E. K.; KIM, N. C.; WANI, M. C.; WALL, M. E.; NAVARRO, H. A.; BURGESS, J. P.; KAWANISHI, K.; KARDONO, L. B. S.; RISWAN, S.; ROSE, W. C.; FAIRCHILD, C. R.; FARNSWORTH, N. R. & KINGHORN, A.D. 2002. Cytotoxic prenylated xanthenes and the unusual compounds anthraquinobenzophenones from *Cratoxylum sumatranum*. *J. Nat. Prod.* 65: 299-305.

SHIELDS, L. M. 1950. Leaf xeromorphy as related to physiological and structural influences. *Bot. Rev.* 16: 339-447.

SHINTANI, D. & DELLAPENNA, D. 1998. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science*, Vol. 282: 2098-2100.

SIOLI, H. 1984. The Amazon and its main affluents: Hydrography, morphology of the river courses, and river types. In: Sioli, H. (ed.). *The Amazon. Limnology and landscape ecology of a might tropical river and its basin*. Dr. W. Junk Publ., Dordrecht, The Netherlands. Cap. 5, pp. 127-165.

SMIRNOFF, N. 1993. Tansley Review No. 52. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125: 27-58.

SOUZA, L. A. DE 2003. *Morfologia e anatomia vegetal: célula, tecidos, órgãos e plântula*. Ponta Grossa, Editora UEPG. 259 p.il.

SOUZA, V. C. & LORENZI H. 2005. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum. 640 p.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia vegetal*. Trad. Eliane Romanato Santarém 3a. ed. – Porto Alegre: Artmed. 719p.

- TANAKA, R.; OSTER, U.; KRUSE, E.; RÜDIGER, W. & GRIMM, B. 1999. Reduced activity of geranylgeranyl reductase leads to loss of chlorophyll and tocopherol and to partially geranylgeranylated chlorophyll in transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for geranylgeranyl reductase. *Plant Physiol.* 120: 695-704.
- TAKEUCHI, M. 1962. The structure of the amazonian vegetation. VI. Igapó. *Journ. Fac. Sci. Univ.*, Tokyo. III, 8(7): 297 - 304.
- TREBST, A. 2003. Function of  $\beta$ -carotene and tocopherol in photosystem II. *Z. Naturforsch.* 58c, 609-620.
- TUPY, J. & RESING, D. 1968. Anaerobic respiration in latex of *Hevea brasiliensis* substrate and limiting factors. *Biol. Plant.* 10: 72-80.
- VARTAPETIAN, B. B. & JACKSON, M. B. 1997. Plant adaptation to anaerobic stress. *Annals of Botany* 79 (Suppl. A): 3-20.
- WALDHOFF, D. & FURCH, B. 1998. Effect of waterlogging and flooding on some abundant tree species of Central Amazonia examined under defined conditions in climatic chambers. *Verhandlungen des Internationalen Vereins Limnologie* 26: 1886-1871.
- WALDHOFF, D.; JUNK, W. J. & FURCH, B. 2000. Comparative measurements of chlorophyll a parameters of *Nectandra amazonum* under different environmental conditions in climate controlled chambers. *Verhandlungen des Internationalen Vereins Limnologie* 27(4): 2052-2056.
- WALDHOFF, D.; JUNK, W. J. & FURCH, B. 1998. Responses of three Central Amazonian tree species to drought and flooding under controlled conditions. *Int. J. Ecol. Environ.* 24: 237-252.
- WALDHOFF, D. & FURCH, B. 2002. Leaf morphology and anatomy in eleven tree species from Central Amazonian floodplains (Brazil). *Amazoniana* XVII (1/2): 79-94.

- WALDHOFF, D. 2003. Leaf structure in trees of Central Amazonian floodplain forests (Brazil). *Amazoniana* XVII (3/4): 451-469.
- WALDHOFF, D.; FURCH, B & JUNK, W. J. 2002. Fluorescence parameters, chlorophyll concentration, and anatomical features as indicators for flood adaptation of an abundant tree species in Central Amazonia: *Symmeria paniculata*. *Environmental and Experimental Botany* 48: 225-235.
- WHITMORE, T. C. 1990. An introduction to tropical rain forests. Blackwell, London.
- WHITTLE, K. J.; DUNPHY, P. J. & PENNOCK, J. F. 1966. The isolation and properties of  $\delta$ -tocotrienol from *Hevea* latex. *Biochem. J.*, Vol. 100, 138-145.
- WITTMANN, F. 1996. *Phänologische Untersuchungen ausgewählter Baumarten der Várzea-Wälder Zentralamazoniens zur Reaktion auf den annualen Flutungsstress*. University of Mannheim, MSc.-Thesis, pp. 96.
- WITTMANN, F. 2001. *Artenverbreitung und bestandesstruktur in amazonischen Várzea-Wäldern und Möglichkeiten der Erfassung von Waldtypen mittels fernerkundlichen Methoden*. PhD Dissertation. University of Mannheim, pp. 203.
- WITTMANN, F. & JUNK, W. J. 2003. Sapling communities in Amazonian white-water forests. *J. Biogeogr.* 30(10): 1533-1544.
- WITTMANN, F. & PAROLIN, P. 1999. Phenology of six tree species from central amazonian várzea. *Ecotropica* 5: 51-57.
- WITTMANN, F.; ANHUF, D. & JUNK, W. J. 2002. Tree species distribution and community structure of Central Amazonian várzea forests by remote sensing techniques. *Journal of Tropical Ecology* 18(6): 805-820.

- WITTMANN, F.; JUNK, W. J. & PIEDADE, M. T. F. 2004. The várzea forests in Amazonia: flooding and the highly dynamic geomorphology interact with natural forest succession. *Forest Ecology and Management* 196: 199-212.
- WITTMANN, F.; SCHÖNGART, J.; MONTERO, J. C.; MOTZER, T.; JUNK, W. J.; PIEDADE, M. T. F.; QUEIROZ, H. L. & WORBES, M. 2006. Tree species composition and diversity gradients in white-water forest across the Amazon Basin. *Journal of Biogeography* 33: 1334-1347.
- WITTMANN, F.; SCHÖNGART, J.; BRITO, J. M.; OLIVEIRA-WITTMANN, A.; GUILLAMET, J. L.; PIEDADE, M. T. F.; PAROLIN, P. & JUNK, W. J. *In prep.* Manual de árvores da várzea da Amazônia Central: taxonomia, ecologia e uso.
- WORBES, M. 1986. Lebensbedingungen und Holzwachstum in zentralamazonischen Überschwemmungswäldern. *Scripta Geobotanica* 17, 1-112.
- WORBES, M. 1992. Occurance of seasonal climate and tree ring research in the tropics. *Lundqua Report* 34: 338-342.
- WORBES, M. 1997. The forest ecosystem of the floodplains. In: Junk W. J. (ed.). *The Central Amazon floodplain: Ecology of a pulsating system*. pp. 223-266. Ecological Studies Vol. 126, Springer Verlag, Heidelberg.
- WORBES, M.; KLINGE, H.; REVILLA, J. D. & MARTIUS, C. 1992. On the dynamics, floristic subdivision and geographical distribution of várzea forests in Central Amazonia. *J. Veg. Sci.* 3: 553 - 564.
- WU, L. & ANTONOVICS, J. 1975. Experimental ecological genetics in *Plantago*. I. Induction of roots and shoots on leaves for large scale vegetative propagation and metal tolerance testing in *Plantago lanceolata*. *New Phytologist*, Vol. 75, n° 2: 277-282.
- ZAGT, R. J. & WERGER, M. J. A. 1998. Community structure and demography of primary species in tropical rain forest. In: Newbery, D. M.; Prins, H.H.T. &

BROWN, N. (eds.). *Dynamics of tropical communities*. pp. 193-220. Blackwell Scientific Publishers, Cambridge, UK.

ZIBURSKI, A. 1991. Dissemination, Keimung und Etablierung eininger Baumarten der Überschwemmungswälder Amazoniens. *Tropische und Subtropische Pflanzenwelt*. Akademie der Wissenschaften und der Literatur Mainz, Franz Steiner Verlag, 77: 1-96. Stuttgart.