

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

TESE DE DOUTORADO

**ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DA ALOCAÇÃO DAS RESERVAS DAS
SEMENTES PARA AS PLÂNTULAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA***

Tatiana Raquel Löwe

Orientadora: Lúcia Rebello Dillenburg

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Botânica.

Porto Alegre - RS

Março de 2011

Agradecimentos

À Lúcia Rebello Dillenburg pela ajuda, paciência e confiança, e, principalmente, por todas as coisas que aprendi e que certamente não irão se perder.

A todas as pessoas que me ajudaram durante o doutorado, pois de nenhuma maneira foi um trabalho solitário. Espero não esquecer de ninguém: Dan Stefano de Paris Fontanari, Tanise Luisa Sausen, Simone Yamasaki, Luciano Silva Figueiredo, Marisa Azzolini, Francine Ferreira Cassana, Carolina Schlindwein, Fernanda Alabarce, Paula Braga Fagundes, Carla Ledi Körndorfer.

Aos amigos: Patrícia Langone, Carla L. Körndorfer, Luciano Silva Figueiredo, Janaína, Jerusa Taís Eichelberger, Marciana e Elisa Retore, Francine Ferreira Cassana, Carolina Schlindwein, Tanise Sausen, Patrícia Marini, Caroline Leivas Moraes, Maria da Graça de Souza Lima e Cristina Mendes, não tenho palavras pra descrever o que todas estas pessoas fizeram por mim, só o que sei é que cada desabafo ou risada, conversa no msn, telefone, pessoalmente (amigo que é amigo sempre tem um jeito), foi indispensável pra que eu seguisse em frente sem pestanejar.

Aos meus pais Arno Löwe e Marlene Neuhaus Löwe pelo apoio incondicional, e por serem meu exemplo de pessoas no mundo. Ao mano Júnior pelo carinho e amizade.

Aos familiares que sempre me apoiaram, meus padrinhos queridos, Arlete e Astor Neuhaus, toda a família Henn (principalmente aquelas que insisto em chamar de “priminhas” mas são maiores que eu). Ao meu avô materno Osvin Neuhaus que no auge de seus 95 anos de idade sempre me transmite alegria de viver e sempre apoiou o que faço.

Ao Diego de Floor e Silva, por sua inesgotável paciência, não esquecerei jamais tua compreensão durante os quatro anos, e também por que dentro das suas possibilidades me ajudou na estatística. A família do Diego também pelo apoio sempre.

Queria fazer um agradecimento especial para a Carolina Schlindwein que me ajudou muito nas medidas de carboidratos, sem a sua ajuda tenho certeza que não seria possível, muito obrigada!!

Ao Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia pelo espaço disponível para a condução dos experimentos. Ao professor Luís Mauro Gonçalves Rosa, por permitir o uso do seu laboratório.

Ao professor Arthur G. Fett Neto pelo uso do espectrofotômetro.

À Capes pela bolsa.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
CAPÍTULO 1 – CHANGES IN LIGHT AND NUTRIENT AVAILABILITIES DO NOT ALTER THE DURATION OF USE OF SEED RESERVES IN <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> SEEDLINGS	22
ABSTRACT.....	23
INTRODUCTION.....	23
MATERIALS AND METHODS.....	24
Plant material.....	24
Growth conditions and treatments.....	24
Plant manipulations and evaluations for determining the duration of use of the seed reserves.....	25
Sample size and statistical analyses.....	25
RESULTS.....	25
DISCUSSION.....	26
ACKNOWLEDGEMENTS.....	28
REFERENCES.....	28
CAPÍTULO 2 – ACÚMULO E DEGRADAÇÃO DAS RESERVAS DO HIPOCÓTILO EM PLÂNTULAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> EM AMBIENTES DISTINTOS QUANTO À DISPONIBILIDADE DE LUZ E NUTRIENTES	29
RESUMO.....	30
INTRODUÇÃO.....	31

MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
Material vegetal.....	32
Condições de cultivo e tratamentos.....	33
Manipulações e avaliações para determinar o acúmulo e depleção das reservas do hipocótilo.....	36
Tamanho amostral e análise estatística.....	37
RESULTADOS.....	38
DISCUSSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	57
CAPÍTULO 3 – A IMPORTÂNCIA DO TAMANHO DA SEMENTE NO CRESCIMENTO INICIAL, SOBREVIVÊNCIA E SUBSTITUIÇÃO DE TECIDOS PÓS-DANO EM PLANTAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> CULTIVADAS SOB ALTA E BAIXA IRRADIÂNCIA.....	61
RESUMO.....	62
INTRODUÇÃO.....	63
MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
Material vegetal e condições gerais de cultivo.....	66
Delineamento experimental.....	68
Efeito do tamanho das sementes nas respostas à disponibilidade de luz.....	68
Efeito do tamanho da semente e da disponibilidade de luz na tolerância ao dano à parte aérea.....	70
Parâmetros vegetais avaliados.....	71
Efeito do tamanho da semente nas respostas à disponibilidade de luz.....	71

Efeito do tamanho da semente e da disponibilidade de luz na tolerância ao dano à parte aérea.....	73
Análise estatística.....	73
RESULTADOS.....	75
Efeito do tamanho da semente nas resposta à disponibilidade de luz.....	75
Efeito do tamanho das sementes e da disponibilidade de luz na tolerância ao dano à parte aérea.....	88
DISCUSSÃO.....	93
Efeito do tamanho da semente e da disponibilidade de luz no desenvolvimento inicial de <i>Araucaria angustifolia</i>	93
O efeito do tamanho da semente na substituição dos tecidos após a remoção da parte aérea em duas condições luminosas contrastantes.....	101
REFERÊNCIAS.....	104
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	109
REFERÊNCIAS.....	111

RELAÇÃO DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Temperature (T) data for the city of Porto Alegre, RS, during the course of the experiment (2008). Data are from the 8th District of Meteorology, Porto Alegre, RS, Brazil..... 24

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Valores de temperatura (°C) para a cidade de Porto Alegre (RS), durante o período de cultivo das plantas em 2008. Estação climatológica principal de Porto Alegre/RS – 8º distrito de meteorologia..... 34

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Dados de temperatura (T) para a cidade de Porto Alegre, RS, durante o período experimental (2009-2010). Dados do 8º Distrito de Meteorologia, Porto Alegre, RS..... 70

Tabela 2: Razão área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), razão raiz/parte aérea (R/PA), área foliar (AF), razão de massa foliar (RMF) e número de folhas (NF) ao final do experimento (342 dias) nos quatro tratamentos avaliados. Valores são médias (\pm EP). As letras *L*, *T* e *L*T* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator tamanho (*T*) e da interação entre ambos (*L*T*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*T*..... 84

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Dry mass accumulation in *Araucaria angustifolia* seedlings under the four experimental conditions ('T', high irradiance; 'i', low irradiance; 'N' high nutrient availability; and 'n', low nutrient availability) and belonging to each of the six groups, which are defined by the number of days after seed sowing when cotyledons were excised and hence access to the megagametophyte removed (G1, 43; G2, 63; G3, 83; G4, 103; G5, 124 and G6, no excision). The vertical bars represent the mean standard errors. Within each treatment, the asterisk indicates significant differences between a given group (G1 through G5) and the Control group (G6) (Dunnett's test $P \leq 0,05$). Different letters in G6 indicate significant differences between treatments (l.s.d test, $P \leq 0,05$)..... 26

Figura 2: Variations in megagametophyte mass along the experimental period, for each of the four experimental conditions ('T', high irradiance; 'i', low irradiance; 'N' high nutrient availability; and 'n', low nutrient availability). The asterisk indicates a significant mass difference (l.s.d test, $P \leq 0,05$) between 'IN' and the 'iN' and 'in' plants. The arrows indicate the period at which the mass accumulated by the high-light (dashed arrow) and the low-light (solid arrow) plants was no longer affected by their connection to the seed. The percentage values at each one of these points indicate the percentage of mass still left in the seed megagametophyte (averaged across all treatments)..... 26

CAPÍTULO 2

Figura 1: Variações na massa do hipocótilo de plântulas de *Araucaria angustifolia* submetidas a distintas disponibilidades de luz e nutrientes durante o cultivo. As barras verticais representam o erro padrão. As letras *L*, *N* e *L*N* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator nutrientes (*N*) e da interação entre ambos (*L * N*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*N*. I - alta irradiância; i - baixa irradiância; N - alta disponibilidade nutricional e n - baixa disponibilidade nutricional..... 39

Figura 2: Taxas médias de acúmulo (A) e degradação (B) de reservas no hipocótilo de *Araucaria angustifolia* submetidas a quatro diferentes combinações da disponibilidade de luz e nutrientes. As barras verticais representam o erro padrão. As letras *L*, *N* e *L*N* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator nutrientes (*N*) e da interação entre ambos (*L * N*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*N*. I - alta irradiância; i - baixa irradiância; N - alta disponibilidade nutricional e n - baixa disponibilidade nutricional..... 40

Figura 3: Variações de massa seca do megagametófito de plântulas de *Araucaria angustifolia* submetidas a distintas disponibilidades de luz e nutrientes durante o cultivo. As barras verticais representam o erro padrão. I - alta irradiância; i - baixa irradiância; N - alta disponibilidade nutricional e n - baixa disponibilidade nutricional..... 42

Figura 4: Razão de massa das quatro partes da planta (raiz principal, raízes laterais, hipocótilo e parte aérea) para a massa total da plântula. A) Razão de massa das plantas aos 43 dias após a semeadura. B) Razão de massa das plantas aos 83 dias após a semeadura. C) Razão de massa das plantas aos 124 dias após a semeadura. D) Razão de massa das plantas aos 145 dias após a semeadura. As letras *L*, *N* e *L*N* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator nutrientes (*N*) e da interação entre ambos (*L*N*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*N*. I - alta irradiância; i - baixa irradiância; N - alta disponibilidade nutricional e n - baixa disponibilidade nutricional..... 43

Figura 5: Massa seca total em plântulas de *Araucaria angustifolia* submetidas a distintas disponibilidades de luz e nutrientes durante o cultivo. As barras verticais representam o erro padrão. As letras *L*, *N* e *L*N* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator nutrientes (*N*) e da interação entre ambos (*L * N*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*N*. I - alta irradiância; i - baixa irradiância; N - alta disponibilidade nutricional e n - baixa disponibilidade nutricional..... 46

CAPÍTULO 3

Figura 1. Altura de plantas de *Araucaria angustifolia* nos quatro diferentes tratamentos avaliados. As barras verticais representam o erro padrão. As letras *L*, *T* e *L*T* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator tamanho (*T*) e da interação entre ambos (*L*T*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas

diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação $L*T$. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos.. 76

Figura 2: Comprimento total de plantas de *Araucaria angustifolia* nos quatro diferentes tratamentos avaliados. As barras verticais representam o erro padrão. A seta indica o início da ramificação lateral, exceto para as plantas ‘in’, que nunca ramificaram. As letras L , T e $L*T$ indicam efeitos significativos do fator luz (L), do fator tamanho (T) e da interação entre ambos ($L*T$) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação $L*T$. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos..... 77

Figura 3: Biomassa seca total em plantas de *Araucaria angustifolia* nos quatro diferentes tratamentos avaliados. As barras verticais representam o erro padrão. As letras L , T e $L*T$ indicam efeitos significativos do fator luz (L), do fator tamanho (T) e da interação entre ambos ($L*T$) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação $L*T$. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos..... 79

Figura 4: Variação de biomassa no hipocótilo de plantas de *Araucaria angustifolia* nos quatro diferentes tratamentos avaliados. As barras verticais representam o erro padrão. As letras L , T e $L*T$ indicam efeitos significativos do fator luz (L), do fator tamanho (T) e da interação entre ambos ($L*T$) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação $L*T$. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos..... 81

Figura 5: Massa seca dos pinhões de *Araucaria angustifolia* submetidos aos quatro tratamentos no decorrer do período experimental. As barras verticais se referem ao erro padrão. As letras *L*, *T* e *L*T* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator tamanho (*T*) e da interação entre ambos (*L*T*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*T*. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos..... 82

Figura 6. Taxa de crescimento relativo das plantas baseada na biomassa acumulada entre dois períodos consecutivos de coleta. As barras verticais representam o erro padrão. As letras *L*, *T* e *L*T* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator tamanho (*T*) e da interação entre ambos (*L*T*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*T*. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos..... 83

Figura 7: Carboidratos não-estruturais totais (CNE) na raiz (A e D), hipocótilo (B e E) e caule (C e F) de plântulas de *A. angustifolia* nos quatro desmontes realizados. A-C Concentração (mg . mg⁻¹). D-F *Pool* de CNE (mg). Barras verticais representam o erro padrão. As letras *L*, *T* e *L*T* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator tamanho (*T*) e da interação entre ambos (*L*T*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*T*. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos..... 86

Figura 8: Sobrevivência de plantas de *Araucaria angustifolia* nos quatro diferentes tratamentos avaliados. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos..... 88

Figura 9: Sobrevivência das plantas após a remoção da parte aérea nos quatro tratamentos avaliados. A seta indica o momento do dano. A) Plantas controle (intactas). B) Plantas com a parte aérea removida (danificadas). I – alta irradiância; i- baixa irradiância. T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos..... 90

Figura 10: Plantas submetidas a altas irradiâncias aos 152 (período em que se efetuou o dano à parte aérea) e aos 342 dias após a semeadura. As barras verticais representam o erro padrão. A) Massa seca total. B) Massa seca da parte aérea (toco + rebrote em plantas com dano). C) massa seca das raízes (raiz principal, raízes laterais e hipocótilo). As letras *D*, *T* e *D*T* indicam efeitos significativos do fator dano a parte aérea (*D*), do fator tamanho de sementes (*T*) e da interação entre ambos (*D * T*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação (*D * T*)..... 92

Introdução Geral

O tamanho das sementes de uma espécie representa a quantidade de investimento materno numa prole individual ou o quanto o embrião está provido de “reservas” para começar a sua jornada de vida. Este tamanho representa um conflito (*trade-off*) fundamental entre a maior produção de sementes pequenas *versus* a menor produção de sementes grandes, para uma mesma quantidade de recurso alocado para a reprodução (Leishman *et al.*, 2000). Vários trabalhos têm mostrado que o tamanho das sementes pode influenciar o desempenho das plântulas sob condições adversas. Plântulas oriundas de sementes grandes parecem ser mais tolerantes às condições de sombra, falta de nutrientes, competição, herbivoria, grande profundidade da semente e seca do solo (Leishman *et al.*, 2000).

Segundo WESTOBY *et al.* (1996), o melhor desempenho das espécies de sementes grandes em tolerar ambientes adversos se deve a um mecanismo comum – o efeito do tamanho da plântula, o efeito metabólico e o efeito de reserva. Este último parece ser o mais relevante em uma ampla gama de situações adversas, e poderia requerer, em espécies de sementes grandes, que porções dos recursos estocados na semente fossem de alguma forma não comprometidos durante a degradação, podendo ser utilizados para sustentar a respiração sob deficiência de carbono. O tamanho de sementes grandes poderia primeiramente surgir devido à seleção por determinado tipo de ambiente adverso, mas poderia subsequentemente ser ecologicamente funcional em relação a outro tipo. De maneira geral, as forças que favorecem o aparecimento de uma característica não são necessariamente as mesmas que mantêm esta característica. Concluindo, se o mecanismo é via efeito de reserva, os benefícios oriundos das sementes grandes são temporários, e após a degradação das reservas da semente para a

plântula as vantagens não seriam mais visíveis. Dessa maneira, as vantagens podem ser importantes apenas onde existe alguma probabilidade de que as condições possam melhorar (Westoby *et al.* 1996).

Embora tenha sido experimentalmente demonstrado que espécies de sementes grandes conferem aumento na tolerância a várias adversidades do ambiente, o único padrão claro no campo é que espécies capazes de se estabelecer sob sombra tendem a ter sementes grandes (Westoby *et al.* 1996; Leishman *et al.*, 2000). A falta de qualquer padrão entre tamanho de sementes e nutrientes do solo é consistente com a idéia de que as vantagens aplicam-se apenas onde as adversidades podem ser temporárias (Westoby *et al.*, 1996). Neste sentido, o sombreamento constitui uma adversidade potencialmente temporária (Westoby *et al.*, 1996).

A espécie alvo deste estudo – *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, o pinheiro brasileiro ou simplesmente araucária – possui sementes (pinhões) grandes, assim como outros membros do gênero, *Araucaria bidwillii* (Burrows, 1992) e *Araucaria araucana* (Cardemil e Reiner, 1982). Com cerca de 5 a 8g de peso fresco (Tompset 1984), as sementes do pinheiro brasileiro figuram entre as maiores dentre as coníferas (Eckenwalder 2009). As duas áreas de reserva de alimento em sementes de araucária são o embrião e o gametófito feminino (Panza *et al.*, 2002), sendo que este último representa ~70% da massa fresca da semente (Mantovani *et al.* 2004), com o amido representando a reserva mais conspícua, embora corpos protéicos e lipídicos estejam também presentes (Panza *et al.*, 2002). Corpos lipídicos, grãos de amido, mitocôndrias e núcleo estão sempre presentes no embrião, além de cristais globóides constituídos principalmente de P, K e Mg, além de S, Ca e Fe (Panza *et al.*, 2002). A espécie exhibe lenta taxa de crescimento (Carvalho 1994) e germinação hipógea (Haines 1983). Os cotilédones, geralmente dois, agem como haustório, transferindo as reservas do

megagametófito para a plântula em crescimento (Rosado *et al.* 1994). O hipocótilo atua como um importante dreno de parte destas reservas iniciais (Dillenburg *et al.*, 2010).

A *A. angustifolia* forma agrupamentos densos, principalmente na parte leste e central do planalto brasileiro, abrangendo os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, ocorrendo ainda como ilhas esparsas, no sul do estado de São Paulo e na Serra da Mantiqueira, internando-se até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro (Reitz e Klein, 1996). Ocorre também em pequenas manchas na Argentina e no Paraguai (Carvalho 1994). Embora tanto estudos a campo (Duarte *et al.*, 2002) quanto em casa de vegetação (Inoue *et al.*, 1979; Inoue e Torres, 1980; Duarte e Dillenburg, 2000; Franco e Dillenburg, 2007) tenham demonstrado que a espécie é tolerante ao sombreamento, tolerância esta atestada pela capacidade de crescer adequadamente sob níveis moderados de irradiância e de sobreviver sob sombreamento intenso, a espécie atua como planta-berçário e pioneira na transição floresta-campo (Duarte *et al.* 2006).

Como componente importante da Floresta Ombrófila Mista, a araucária já foi muito explorada pela alta qualidade de sua madeira, o que provocou grande redução de sua população, e, desde 1992, a espécie encontra-se classificada como vulnerável na lista de espécies ameaçadas de extinção (IBAMA, 1992). Segundo a IUCN (2010), a espécie hoje se encontra criticamente em perigo. O pinhão também é fonte de recursos pelo seu valor nutritivo, tanto para o homem quanto para a fauna associada à Floresta Ombrófila Mista. Sendo assim, devido à importância econômica e ecológica da espécie, trabalhos que enfoquem o padrão da regeneração da mesma se fazem necessários, tanto para compreendermos a sua estratégia ecológica, quanto para que as informações resultantes possam ser utilizadas na adequação do cultivo da espécie para fins de reflorestamento.

Aspectos estruturais e metabólicos da germinação da *A. angustifolia* foram profundamente estudados por Ferreira e colaboradores (e.g., Ferreira *et al.* 1979; Ferreira e Handro 1979; Rosado *et al.* 1994). Por outro lado, a ecofisiologia de plântulas e plantas juvenis da espécie também tem merecido grande atenção nos últimos anos (e.g., Duarte e Dillenburg, 2000; Mósená e Dillenburg, 2004; Zandavalli *et al.*, 2004; Garbin e Dillenburg, 2005; Franco e Dillenburg, 2007; Korndörfer e Dillenburg, 2008). Alguns destes estudos tiveram uma observação em comum: a de que as respostas aos tratamentos impostos se evidenciaram de forma clara após o cultivo relativamente prolongado da espécie, o que foi interpretado como efeito tamponante das reservas nutritivas do pinhão (Zandavalli *et al.* 2004; Franco e Dillenburg 2007). Entretanto, uma importante lacuna ainda existe no que diz respeito à relação entre a disponibilidade de reservas na semente e o desempenho das plântulas. Spoltz (1967) publicou um dos poucos trabalhos nesta linha e demonstrou que plântulas oriundas de sementes grandes atingiam maior altura do que plântulas oriundas de sementes pequenas.

Esta tese visa, de uma maneira geral, caracterizar a importância das reservas nutritivas do pinhão para o sucesso no estabelecimento de novas plantas da espécie. Estão em foco dois aspectos relevantes à compreensão do processo de regeneração da *A. angustifolia*, ambos voltados ao uso e importância das abundantes reservas de seus pinhões. Um se refere à influência da disponibilidade de luz e nutrientes sobre o padrão de consumo e alocação destas reservas durante o crescimento inicial da espécie e o outro à importância da quantidade de reservas estocadas no pinhão para o sucesso no estabelecimento da espécie em ambientes com disponibilidades de luz contrastantes. A tese foi estruturada em três capítulos. No primeiro, o tempo de uso das reservas das sementes foi comparado em ambientes com distintas disponibilidades de luz e nutrientes. No segundo, o acúmulo e a degradação das reservas no hipocótilo das

plantas foram comparados em ambientes com distintas disponibilidades nutricionais e luminosas. No terceiro, foi estudado o efeito do tamanho da semente e suas possíveis vantagens para o crescimento inicial e sobrevivência da espécie em condições sombreadas e analisado o efeito interativo da disponibilidade de luz e do tamanho da semente sobre a tolerância da espécie à remoção de tecidos da parte aérea (simulação de herbivoria).

Referências

- Burrows, G.E.; Boag, TS, Stockey RA (1992) A morphological investigation of the unusual cryptogeal germination strategy of bunya pine (*Araucaria bidwillii*) – an Australian rainforest conifer. *International Journal of Plant Sciences* **153**, 503-512.
- Cardemil, L.; Reineiro, A. (1982) Changes of *Araucaria araucana* seed reserves during germination and early seedling growth. *Canadian Journal of Botany* 60: 1629-1638.
- Carvalho PER (1994) 'Espécies florestais brasileiras. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.' (Embrapa/CNPQ: Brasília, DF)
- Dillenburg, L.R.; Rosa, L. M. G.; Mósen, M. (2010). Hypocotyl of seedlings of the large-seeded species *Araucaria angustifolia*: an important underground sink of the seed reserves. *Trees, structure and function* 24: 705-711.
- Duarte, L.S.; Dillenburg, L.R. (2000) Ecophysiological responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seedlings to different irradiance levels. *Australian Journal of Botany* 48: 531-537.
- Duarte, L.S.; Dillenburg, L.R.; Rosa, L.M.G. (2002) Assessing the role of light availability on the regeneration of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to different irradiance levels. *Australian Journal of Botany* 50: 741-751.

- Duarte, L.S.; Santos, M.M.S.; Hartz, S.M.; Pillar, V.D. (2006) Role of nurse plants in Araucaria Forest expansion over grassland in South Brazil. *Austral Ecology* 31: 520-528.
- Eckenwalder, J. E. (2009) Conifers of the world: the complete reference. Timber Press: Portland, OR. 720p.
- Franco, A.M.; Dillenburg, L.R. (2007) Ajustes morfológicos e fisiológicos em plantas jovens de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em resposta ao sombreamento. *Hoehnea* 34 (2): 135-144.
- Ferreira, A.G.; Dietrich, S.M.C.; Handro, W. (1979) Changes in the metabolismo f *Araucaria angustifolia* during the early phases of germination and growth. *Revista Brasileira de Botânica* 2: 67-71.
- Ferreira, A.G.; Handro, W. (1979) Aspects of seed germination in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Revista Brasileira de Botânica* 2: 7-13.
- Garbin, M.L.; Dillenburg, L.R. (2005) Caracterização das relações entre *Araucaria angustifolia* e nitrogênio inorgânico. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 135p.
- Haines, R.J. (1983) Embryo development and anatomy of *Araucaria* Juss. *Australian Journal of Botany* 31:125-140.
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Lista da flora ameaçada de extinção. Portaria n. 37 N, 3 de abril de 1992.
- Inoue, M.T.; Galvão, F.; Torres, D.V. (1979) Estudo ecofisiológico sobre *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze: fotossíntese em dependência à luz no estágio juvenil. *Revista Floresta* 10: 5-9.

Inoue, M.T.; Torres, D.V. (1980) Comportamento do crescimento de mudas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze em dependência da intensidade luminosa. *Revista Floresta* 11: 7-11.

IUCN. Institute Union for Conservation of Nature
<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/search>

Korndörfer, C.L.; Dillenburg, L.R. (2008) Initial growth of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) under equal soil volumes but contrasting rooting depths. *Trees, structure and function* 22: 835-841.

Leishman, M.R.; Wright, I.J.; Moles, A.T.; Westoby, M. (2000) The evolutionary ecology of seed size. *In* Seeds: the ecology of regeneration in plant communities. (Ed. M. Fenner) pp. 31-57. (University of Southampton: Southampton, UK).

Mantovani, A.; Morellato, L.P.C.; Reis, M.S. (2004). Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. *Revista Brasileira de Botânica* 27: 787- 796.

Mósen, M. ; Dillenburg, L.R. (2004) Early growth of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* [Bertol.] Kuntze) in response to soil compaction and drought. *Plant and Soil* 258: 293-306.

Panza, V.; Láinez, V.; Maroder, H.; Prego, I.; Maldonado, S. (2002). Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140: 273-281.

Reitz, P.R.; Klein, R.M. (1996). Araucariáceas. *Flora Ilustrada Catarinense*, 62p.

Rosado, R.M; Ferreira, A.G.; Mariath, J.E.A.; Cocucci, A.E. (1994) Amido no megagametófito de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze: degradação durante a germinação e desenvolvimento do esporófito. *Acta Botanica Brasilica* 8: 35-43.

- Spoltz, R.M. (1967) Variações em torno do crescimento de mudas de *Araucaria angustifolia* em viveiro. Anais do II Simpósio Florestal de Minas Gerais, Viçosa.
- Tompsett, P.B. (1984) Dessiccation studies in relation to storage of *Araucaria* seed. *The Annals of Applied Biology* 105: 581-586.
- Westoby, M.; Leishman, M.R.; Lord, J. (1996). Comparative ecology of seed size and dispersal. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, London, Series B 351, 1309-1318.
- Zandavalli, R.B.; Dillenburg, L.R. (2004) Growth responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*. *Applied Soil Ecology* 25: 245-255.

Capítulo 1

Changes in light and nutrient availabilities do not alter the duration of use of seed reserves in *Araucaria angustifolia* seedlings

TATIANA R. LÖWE^A AND LÚCIA R. DILLENBURG^{A,B}

^A *Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil*

^B *Corresponding author (lucia.dillenburg@ufrgs.br)*

Changes in light and nutrient availabilities do not alter the duration of use of seed reserves in *Araucaria angustifolia* seedlings

T. R. Löwe^A and L. R. Dillenburg^{A,B}

^ADepartamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

^BCorresponding author. Email: lucia.dillenburg@ufrgs.br

Abstract. Initial plant growth is entirely dependent on seed reserves, until the photosynthetic organs become a significant net carbon source to the growing plant. The time during which these reserves are used may vary within species, depending on the availability of external resources. We have investigated the duration of use of the seed reserves in the large-seeded tree species *Araucaria angustifolia*, when growing under different light and nutrient availabilities. We hypothesised that this duration would not vary with growing conditions, because of the high pressure exerted by predators on these seeds and because of the existing possibility of transferring to and restoring part of their starchy reserves in the underground hypocotyl. Plant growth took place for 139 days under shade cloth in outside gardens, under each of the four combinations of high and low light or nutrient availabilities. Plants within each treatment were separated into six different groups, each including seedlings which were separated from their seeds by cotyledon excision at five different time periods after seed sowing (43, 63, 83, 103 and 124 days), plus a Control group of seedlings which were not deprived from their seeds. Final mass accumulation by seedlings that had full access to the seed reserves was compared with that of seedlings which were separated from their seeds at different time periods after seed sowing. Seed mass evaluations at each excision period allowed us to follow the temporal pattern of seed consumption. We found that seedlings growing under low light used seed reserves for growth longer than those under high light, regardless of their nutrient condition, pointing to the importance of a large seed for seedling establishment under deep shade. However, seed consumption followed a very similar pattern in both light treatments. Nutrient availability did not affect the duration of growth dependency on seed reserves or the pace of seed mass depletion. Our initial hypothesis was then accepted, and the possible implications of the reported early growth behaviour of the species in coping with seed predation and shading are discussed.

Introduction

Seed embryos are fully dependent on seed reserves during germination, and when seedlings are developing organs for the autotrophic acquisition of resources, they are still largely dependent on seed provisions. Later, plants will explore and depend on external resources, but this transition from full dependency on seed resources to full dependency on the outside environment occurs gradually, and includes the simultaneous use of internal (seed) and external resources (Kitajima 1996; Kitajima and Fenner 2000).

The duration of seed dependency for a given seed resource may vary among species, due to differences in seed mass and quality, main function of cotyledons (storage or photosynthesis) and plant growth rate. These characteristics are correlated with plant life strategies (Kitajima 2002). According to Kitajima, shade-tolerant species usually have large seeds, storage cotyledons and slow growth, and this syndrome, by its turn, is associated with a long period of use of the seed reserves. Light-demanding, pioneer species, however, usually have small seeds, photosynthetic cotyledons, and fast growth, and their use of the seed reserves should be shorter.

Intra-specific variation in the duration of use of the seed reserves has received much less attention (e.g. Santos and Buckeridge 2004; Barberis and Dalling 2008). However, taking into consideration the factors acting on inter-specific variations, one could expect, for example, that, within the same species, large seeds would increase the duration of use of the seed reserves. Also, an increased availability of external resources, such as light and nutrients, could reduce this duration through the expected positive effects it would have on plant growth rate and on the demand for the stored seed resources.

Hanley *et al.* (2004) presented an interesting and straightforward methodology for determining the length of duration of the seedling stage: one where the mass accumulated by Control, unmanipulated plants, growing during a given period of time is compared with the mass accumulated by other plant groups which had the storage cotyledons removed. Their approach was used in the present study in order to assess intra-specific variations due to light and nutrient availabilities in the duration of use of the seed reserves of the large-seeded coniferous tree species *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze (Araucariaceae).

This species grows as an emergent and dominant tree in the subtropical montane forests of southern and south-eastern Brazil, and also has a limited distribution in Argentina and Paraguay (Carvalho 1994). It acts as a pioneer species in the process of forest encroachment on adjacent grasslands, but its plasticity in response to light availability also makes it capable of regenerating itself in the forest understory (Duarte *et al.* 2006). Its heavy seeds (~5–8 g fresh weight; Tompsett 1984) are one of the largest among conifers (Eckenwalder 2009), making the species an interesting system for studying seedling behaviour of large-seeded conifer species. The edible and starchy megagametophyte of the seeds is a very important food source for several animal species, some of which act as both seed predators and dispersers (Iob and Vieira 2008). Thus, the pressure exerted by seed predators is expected to have significantly shaped germination and initial growth behaviour of this species. Seeds are recalcitrant (Panza *et al.* 2002), and promptly germinate after dispersion. When germination takes place in the shaded forest understory, seedlings form a shade-tolerant seedling bank, which waits for a gap to accelerate growth towards the upper story (Duarte *et al.* 2002). The species exhibits slow growth (Carvalho 1994) and a hypogeal germination (Haines 1983). Burrows *et al.* (1992) have further classified its germination behaviour as cryptogeal, where the plumule would be forced into the soil before shoot elongation. However, as pointed out by these authors, the burial of the shoot apex into the ground is very limited (<1 cm) in *A. angustifolia*, and, according to our own personal observations, it may even go unnoticed. The cotyledons, usually two, elongate and partially emerge from the seed and act as haustoria, transferring reserves from the starchy megagametophyte which represents ~70% of the seed fresh mass (Mantovani *et al.* 2004) to the growing plant (Rosado *et al.* 1994). The swollen, tuber-like, underground hypocotyl act as an important initial sink for at least some of the seed reserves (Dillenburg *et al.* 2010).

Given the large size of the seeds of *A. angustifolia*, we would expect their reserves to be long-lasting. Empirical data confirm this expectation, showing a duration of 70–120 days (Einig *et al.* 1999; Dillenburg *et al.* 2010). The question we pose here is whether this period of time would vary with the amount of external resources (particularly light and nutrients) available to the growing seedling. In other words, we ask whether the duration of the seedling stage (here defined as the period of time during which plants still use the reserves stored in the seeds) depends on its environment. Our hypothesis is that this period of time will not respond to the availability of light and nutrients in the environment because of the pressure imposed by seed predators. This would imply, for example, in not slowing down the rate of seed-to-seedling transference of the seed reserves under situations when the demand for these reserves is small, which could happen, for example, when seedling growth is limited by shading and/or low nutrient availability. Our hypothesis is also based on the fact that the underground hypocotyl may act as a storage place for any seed material that is not immediately required for plant growth. The possibility of storing part of the seed reserves in the seedling's own body could reduce the chances of losing them through seed predation and increase the chances of seedling survival during establishment. The present study tests that hypothesis

by comparing the length of time during which seedling growth still depends on the supporting megagametophyte, between plants that grew under the combined effects of low or high light and nutrient availabilities. The results from this study will contribute to the understanding of the ecological and physiological significance of large seeds to seedling growth behaviour under contrasting abiotic conditions.

Materials and methods

Plant material

Pine seeds were purchased from local gatherers in the city of São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brazil (29°24'S and 50°22'W; 912 m a.s.l.) on 26 May 2008, and then stored in plastic bags in a refrigerator (49 days) until the beginning of the manipulations. Prior to germination (14–15 July), seeds were immersed in water, and only the ones that did not float were used in the experiment. These were soaked in a sodium hypochlorite 1% solution for 20 min for disinfestation and rinsed with distilled water. Small or damaged seeds were discarded. On 16 July (Day 0 of the experiment), the selected seeds were scarified by removing the external coverings from around the radicle-protruding region, in order to ensure a fast and uniform germination (Ferreira and Handro 1979), and placed in trays with moist vermiculite for germination. Due to differences in germination time, germinated seeds, with ~5-cm-long radicles, were transplanted to pots in 8 blocks, between 22 July and 29 July.

Growth conditions and treatments

The experiment was conducted in an outside garden of the Department of Forage Plants and Agrometeorology in the Federal University of Rio Grande do Sul (30°01'59'S and 51°13'48'W, 4 m a.s.l.), from 22 July to 8 December 2008. Mean temperature data for the region during the study period is shown in Table 1. The pre-germinated seeds were planted in 2-L PET bottles containing 1.5 L of medium-sized, washed sand. Water content in the pots was maintained at a minimum of 70% of field (pot) water capacity (estimated at 0.16 g g⁻¹).

Plants were divided into four groups (treatments), resulting from the factorial combination of two levels of light intensity and two levels of nutrient availability, as follows: 'IN' (high irradiance and high nutrient availability); 'In' (high irradiance and low nutrient availability); 'iN' (low irradiance and high nutrient availability) and 'in' (low irradiance and low nutrient availability).

Table 1. Temperature (*T*) data for the city of Porto Alegre, RS, during the course of the experiment (2008)

Data are from the 8th District of Meteorology, Porto Alegre, RS, Brazil

Month	Mean monthly <i>T</i> (°C)	Mean monthly maximum <i>T</i> (°C)	Mean monthly minimum <i>T</i> (°C)
July	16.2	21.2	13.1
August	15.5	21.1	11.4
September	16.0	21.3	12.1
October	19.3	24.2	15.8
November	21.9	27.8	17.7
December	23.1	29.1	18.4

Low-irradiance (shade) plants were kept in wood cages made of shade cloth and located under the partial shade of a nearby forest. High-irradiance (sun) plants were grown under a lighter shade cloth, ~20 m away from the low-irradiance ones, and received direct sunlight in the early morning and late afternoon. Irradiance measurements were taken with a quantum sensor (LI-190S-1, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) at three different cloudless days and times (1000, 1200 and 1500 hours), in the months of September, October, and November. These measurements included the two light environments and full irradiance conditions. Irradiances (averaged across the 3 days and times) were 1175, 1517 and 1568 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, for September, October and November, respectively, under full irradiance. Because of the shading imposed by nearby trees, high-irradiance plants were grown under reductions that ranged from ~45% (from 900 to 1400 hours) to ~80% (1500 hours to 1800 hours) of full irradiance, with minimum and maximum values of recorded irradiances ranging from 210 to 980 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; low-irradiance plants grew under more stable reductions, of ~98%, with minimum and maximum values of irradiance ranging from 3 to 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively.

A modified 10% Hoagland solution (Taiz and Zeiger 2006) was applied every 2 weeks to plants under high nutrient availability. Nutrient concentrations (μM) in the solution were as follows: 1600 nitrogen, 600 potassium, 400 calcium, 200 phosphorus, 100 sulfur, 100 magnesium, 5 chlorine, 2.5 boron, 0.2 manganese, 0.2 zinc, 0.05 copper, 0.05 molybdenum and 5 iron. The volume provided corresponded to the full water capacity of the pots (320 mL). In order to avoid the accumulation of salts, the pots were washed with 200 mL of water the day before solutions were provided. Plants under low nutrient availability were treated exactly the same way, but the nutrient solution was exchanged for water. It is worth noting that, in the week following these irrigation procedures, an extra amount of solution or water was given to the plants to compensate for losses due to evaporation and percolation. This loss was estimated to be 50 mL from 29 August to 3 September for both shade and sun plants, and 170 and 60 mL from 7 to 13 November for sun and shade plants, respectively.

Temperature and relative humidity conditions in both growing environments were recorded every hour at two periods of the year (28 October to 2 November, and 27 November to 6 December), using temperature and humidity data-loggers (Logbox RHT, Novus, Rio Grande do Sul, Brazil). These data revealed slightly higher temperatures (+1.8 to 3.0°C) and lower relative humidities (-9.5 to 10.0%) for the high-irradiance plants than for the low-irradiance ones. Total precipitation in the area during the course of the study, recorded at the nearest meteorological station, amounted to 690.5 mm.

Plant manipulations and evaluations for determining the duration of use of the seed reserves

The assessment of the time needed for seedlings to acquire independence from the reserves of the pine seed followed the methodology proposed by Hanley *et al.* (2004), in which the mass accumulation by plants that have made full use of these reserves was compared with that of plants whose connection to the seeds

was broken at different time intervals after planting, by excising the cotyledons.

Six groups of plants (G1, G2, G3, G4, G5 and G6) were established for each treatment, each group comprising 32 plants (eight for each treatment). Of the 192 plants used in the experiment, seven were lost because of death or abnormal growth. However, every treatment within each group included at least seven experimental units. Plants from all groups were grown for a total period of 139 days under the experimental conditions (145 days, counted from seed sowing), thus ensuring total consumption of the seed reserves (Dillenburg *et al.* 2010). Plants from G6 did not suffer any kind of intervention during this period, but plants from G1, G2, G3, G4 and G5 had the cotyledons excised and were then separated from their seeds, and hence megagametophyte, 43, 63, 83, 103 and 124 days, respectively, after seed sowing. At each excision period, the dry mass of the seeds (seed coat + megagametophyte) and of the megagametophyte ('naked' seeds) was recorded. At the end of the experiment, all plants were removed from the pots, oven-dried (60°C) and weighed. Total plant mass did not include seeds and cotyledons. An additional batch of 29 seeds was dried and weighed to determine the seed megagametophyte mass before germination.

Sample size and statistical analysis

To estimate the time during which seedlings used the seed reserves, we compared total mass accumulation of G6 plants (Control) to the total mass of every other group, for each one of the four treatments. Dunnett's test ($P \leq 0.05$) was used for these pairwise comparisons. From G1 to G5, that last group of plants whose final mass was significantly lower than the final mass of G6 plants indicated the approximate period of time during which plants made use of the seed reserves. It was only possible to make a single estimate of this period of time for each treatment, so that statistical comparisons between treatments were not possible. Additionally, we also compared final plant mass among treatments in the G6 group (Control plants) and seed and megagametophyte masses among treatments for each excision period, using factorial ANOVA and l.s.d. mean comparison test ($P \leq 0.05$). The statistical program Statistix 8.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA) was used in all analyses.

Results

In the low-irradiance plants ('iN' and 'in'), there were significant differences in total dry mass among the first four groups (G1, G2, G3 and G4) and the Control group (G6). In the high-irradiance plants ('IN' and 'In'), these differences in mass occurred only between the first three groups (G1, G2 and G3) and G6 (Fig. 1). Thus, it was estimated that the duration of use of the seed reserves by shade plants is between 103 and 124 days, regardless of the level of nutrient availability, while that of sun plants lies between 83 and 103 days. The use of shoot instead of total plant mass yielded the same results (data not shown).

Comparisons made within the G6 group (in which plants did not have their cotyledons excised) showed that final mass accumulation was only affected by light availability (Fig. 1), with sun plants accumulating twice the mass of the shade plants.

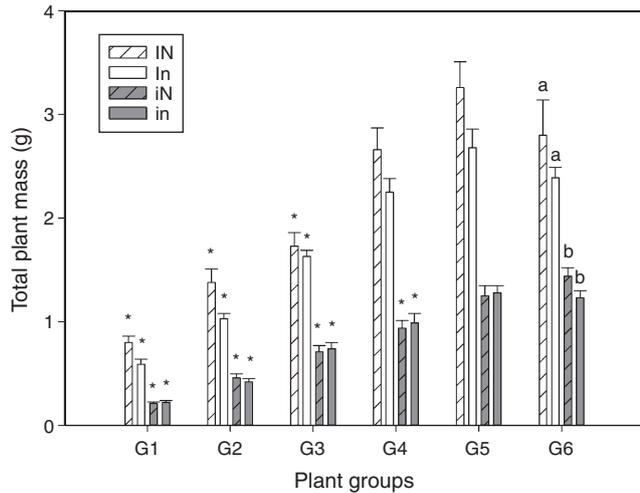


Fig. 1. Dry mass accumulation in *Araucaria angustifolia* seedlings under the four experimental conditions ('I', high irradiance; 'i', low irradiance; 'N', high nutrient availability; and 'n', low nutrient availability) and belonging to each of the six groups, which are defined by the number of days after seed sowing when cotyledons were excised and hence access to the megagametophyte removed (G1, 43; G2, 63; G3, 83; G4, 103; G5, 124 and G6, no excision). The vertical bars represent the mean standard errors. Within each treatment, the asterisk indicates significant differences between a given group (G1 through G5) and the Control group (G6) (Dunnnett's test, $P \leq 0.05$). Different letters in G6 indicate significant differences between treatments (l.s.d. test, $P \leq 0.05$).

Although the pattern of mass depletion of the seed megagametophyte was quite similar among treatments (Fig. 2), there was a light effect 43 days after sowing, when 'IN' plants

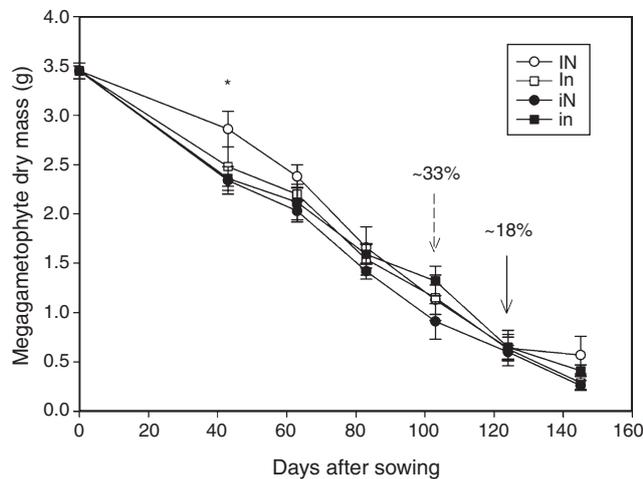


Fig. 2. Variations in megagametophyte mass along the experimental period, for each of the four experimental conditions ('I', high irradiance; 'i', low irradiance; 'N', high nutrient availability and 'n', low nutrient availability). The asterisk indicates a significant mass difference (l.s.d. test, $P \leq 0.05$) between 'IN' and the 'iN' and 'in' plants. The arrows indicate the period at which the mass accumulated by the high-light (dashed arrow) and low-light (solid arrow) plants was no longer affected by their connection to the seed. The percentage values at each one of these points indicate the percentage of mass still left in the seed megagametophyte (averaged across all treatments).

had more mass in their megagametophytes than both plant groups growing under low light. At this stage, the 'IN' plants still had ~83% of the initial mass, while the low-light plants had only ~68%. By the time seedlings growing under high light had their accumulated mass no longer affected by the connected seed, there was still 33% of the megagametophyte mass remaining in the seed. In the case of shade-grown plants, this value amounted to only 18%. At the end of the experimental period, there was no difference in mass between treatments, and the megagametophyte retained an average of ~13% of the original mass.

Discussion

Mass comparisons among the different plant groups and treatments at the end of the experiment indicated that seedling growth of *A. angustifolia* in the light exhibited a shorter dependency on the seed reserves than growth in the shade. This could indicate (1) that high-light plants used up these reserves faster than low-light ones, because of the greater growth demand of the former; (2) that seedlings growing under high light stopped using these reserves earlier, because of their more favourable conditions for carbon fixation through photosynthesis and (3) in both light treatments the seed reserves were transferred to the plants at the same pace, but these seed resources had a longer lasting effect on the growth of shade-grown plants than in light-grown ones.

The time course of mass reduction of seeds and megagametophytes adds some additional information to these possible scenarios. The overall pattern of seed mass decrease was quite similar among all four treatments. However, during the initial period of seed consumption, those seedlings growing under high availability of both light and nutrients ('IN' plants) retained a larger fraction of their megagametophyte mass than plants from low-light treatments, indicating that their seed-to-seedling transference of the seed reserves was lagging behind that of low-light plants. However, these differences disappeared later during seedling development, and at the end of the experimental period the different treatments had the same amount of mass left in the whole seed and in the megagametophyte. By the time high-light plants no longer depended on the seed provisions to grow, they had more megagametophyte mass left in their seeds than did the low-light ones when they turned independent, but this difference only happened because light-grown plants became growth-independent of their seeds quite earlier. In both light treatments, seed consumption proceeded, and in a quite similar pattern, after it no longer affected plant growth, indicating that all plants were still making use of the seed reserves even when they no longer had an effect on mass accumulation. It is important to note that Dillenburg *et al.* (2010) also reported no difference in the temporal decay of seed mass (seed cover + megagametophyte) when comparing light- and dark-grown seedlings. Based on this seed consumption pattern, we exclude a faster seed consumption and an earlier interruption in the use of seed reserves by high-light plants as possible explanations of their earlier independence. Despite the slower start of the 'IN' plants, all treatments led to the same amount and duration of seed consumption. The important difference

was that seed reserves resulted in increased plant mass for a longer time in the low-light than in the high-light plants. In other words, plants differed in terms of how long seed reserves supported their growth.

One important question then arises: what are seed reserves being used for after they no longer have an impact on mass accumulation? A comparison of the mass changes of seeds and seedlings reported by Dillenburg *et al.* (2010) indicates that a substantial amount of the seed reserves is respired, probably to fund metabolic activities of germination and seedling establishment. Taking into account the losses of carbon through respiration and the fact that the relative contribution of the non-respired seed carbon to the overall carbon gain of the growing seedling gets progressively smaller as the seedlings grow and become more photoautotrophic, changes in plant mass associated with these reserves might get too small to be of physiological significance and/or to be detected under our experimental conditions. Because of the higher photosynthetic rates associated to the high-light plants, this reduction in the contribution of seed reserves to the overall mass accumulation will happen earlier in these plants than in heavily shaded ones. This scenario would be particularly relevant if seed/seedling respiration increased at later stages of plant development. The role of respiration on the carbon balance of the growing seedling deserves attention in the future.

The behaviour of seedling growth and seed consumption in response to light reported in this study is similar to that reported by Barberis and Dalling (2008) in the large-seeded tree species *Gustavia superba* (Lecythidaceae, seeds fresh mass 13.80 ± 0.36 g). In contrast, the use of cotyledonary reserves by *Hymenaea courbaril* (Fabaceae; seeds with fresh mass 4.6–5.3 g) was faster in the presence of light (Santos and Buckeridge 2004). Taking into account that both species possess non-photosynthetic cotyledons, the reported discrepancies could be associated with the main allocation of the cotyledonary reserves: to the shoot in *H. courbaril*, and roots in *G. superba*. The latter species was shown to store seed reserves in the root system, such that they were important only in the first weeks after plant emergence, when the transfer of storage material from the seeds to the root had not yet been completed (Barberis and Dalling 2008). In *A. angustifolia*, at least part of the seed reserves is stored in the underground hypocotyl (Dillenburg *et al.* 2010). However, our results are an apparent contradiction to those of Ferreira *et al.* (1979) and Rosado *et al.* (1994). These authors evaluated the consumption of starch grains from the megagametophyte in seedlings of *A. angustifolia* growing in the light and in the dark and found that, after attaining the same stage of development (defined by the number of leaves), seedlings that grew in the dark had a higher amount of starch in their megagametophytes than those grown in the light. However, the authors did not provide information regarding the time it took for both group of plants to reach that same stage, not allowing for a direct comparison of our results with theirs.

In contrast to light, the availability of mineral nutrients did not have an effect either on how long seed reserves were important for plant growth or in the pattern of seed consumption. Also, in contrast to light treatments, the final mass accumulated by those plants which remained attached to their seeds throughout the

experimental period (G6 plants) was not affected by nutrient availability. Panza *et al.* (2002) noted that *A. angustifolia* has globoid crystals in the embryo, present in large vacuoles or protein bodies, consisting of phosphorus, potassium, magnesium, sulfur, calcium and iron. In contrast to carbon reserves, it is possible that these nutrients present in the embryo are supplying adequate amounts of nutrients needed by seedlings during the establishment period. This mineral sufficiency of the embryo could not only explain the lack of effects of nutrient availability on seed dependency but also on the final mass accumulated by plants which remained attached to their seeds throughout the experimental period (G6 plants). Kitajima (2002) observed that the tree species *Challichlamys latifolia* showed a longer duration of dependency on seed nitrogen when compared with two other species. That species also had nitrogen-richer seeds than the two others.

The hypothesis that the duration of use of the seed reserves of *A. angustifolia* was not dependent on the availability of key resources such as light and nutrients is then accepted. Although low-irradiance seedlings used these reserves longer in order to accumulate mass than high-irradiance ones, the temporal mass depletion of the starchy megagametophyte revealed similar patterns in all treatments. Seed predation in natural forests is greater than in grasslands and reforested areas, and small mammals are the most important seed predators (Iob and Vieira 2008; Pereira and Ganade 2008; Brum *et al.* 2010). One possible ecological consequence of the reported behaviour is that, by not slowing down the transference of seed reserves under low-light conditions, the species is not under greater risk of losing seed material to seed predators in the forest understory, where seed predation pressure is greater, than in more open and/or degraded areas. In *Quercus robur*, also a large-seeded tree species, a fast transference of the reserves from the seed to the seedling was interpreted as a strategy to reduce predation or damage of the seed cotyledon by jays (García-Cebrián *et al.* 2003). Although the seed-to-seedling transference in *A. angustifolia* cannot be characterised as being fast, the lack of variation in its seed consumption pattern under different resource availability conditions may provide the species with similar chances of seedling survival to seed predation in contrasting environments.

Several studies have attested the shade tolerance of *A. angustifolia* (e.g. Inoue and Torres 1980; Duarte and Dillenburg 2000; Duarte *et al.* 2002; Franco and Dillenburg 2007). One of the possible advantages of having a large seed is to better cope with adverse conditions, such as shading (Leishman *et al.* 2000). Our experiment was not designed to evaluate the role of seed size on the shade tolerance of the species, but it clearly indicates that its large seeds will have a longer lasting impact on the mass acquired by the seedling when this is growing under deep shade than under high irradiance. Not slowing down the deployment of seed reserves under shading might look disadvantageous, considering the potential advantages of the so-called 'reserve effect' in this situation (Westoby *et al.* 1996; reviewed by Leishman *et al.* 2000), where a high proportion of the seed reserves remains uncommitted, being available to support respiration in dense shade. However, large-seeded species also usually store part of the seed reserves in storage organs, like roots and stems

(Castro-Diez *et al.* 1998; Barberis and Dalling 2008), and the underground hypocotyl plays this role in *A. angustifolia* (Dillenburg *et al.* 2010). It would be particularly relevant in the future to verify whether the patterns of accumulation and use of the hypocotyl reserves are under the influence of resource availability, and whether this underground structure may operate in a possible 'reserve effect' in this species.

Acknowledgements

We thank the Department of Forage Plants and Agrometeorology of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) for providing space for the experiment; the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES/Brazil) for a scholarship to the first author; and the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq/Brazil) for a research fellowship to the second author. The authors also thank CNPq/Brazil for financial support (CNPq 481969/2007–1). This article is part of the PhD thesis of the first author, conducted in the Graduate Program in Botany, UFRGS, Brazil.

References

- Barberis IM, Dalling JW (2008) The effect of light, seed size and biomass removal on cotyledon reserve use and root mass allocation in *Gustavia superba* seedlings. *Journal of Tropical Ecology* **24**, 607–617. doi:10.1017/S0266467408005440
- Brum FT, Duarte LS, Hartz SM (2010) Seed removal patterns by vertebrates in different successional stages of *Araucaria* forest advancing over southern Brazilian grasslands. *Community Ecology* **11**, 35–40. doi:10.1556/ComEc.11.2010.1.6
- Burrows GE, Boag TS, Stockey RA (1992) A morphological investigation of the unusual cryptogal germination strategy of bunya pine (*Araucaria bidwillii*) – an Australian rainforest conifer. *International Journal of Plant Sciences* **153**, 503–512. doi:10.1086/297056
- Carvalho PER (1994) 'Espécies florestais brasileiras. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.' (Embrapa/CNPq: Brasília, DF)
- Castro-Diez P, Puyravaud JO, Cornelissen JHC, Villar-Salvador P (1998) Stem anatomy and relative growth rate in seedlings of a wide range of woody plant species and types. *Oecologia* **116**, 57–66. doi:10.1007/s004420050563
- Dillenburg LR, Rosa LMG, Mósena M (2010) Hypocotyl of seedlings of the large seeded species *Araucaria angustifolia*: an important underground sink of the seed reserves. *Trees (Berlin)* **24**, 705–711. doi:10.1007/s00468-010-0440-y
- Duarte LS, Dillenburg LR (2000) Ecophysiological responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seedlings to different irradiance levels. *Australian Journal of Botany* **48**, 531–537. doi:10.1071/BT98046
- Duarte LS, Dillenburg LR, Rosa LMG (2002) Assessing the role of light availability in the regeneration of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Australian Journal of Botany* **50**, 741–751. doi:10.1071/BT02027
- Duarte LS, Santos MMG, Hartz SM, Pillar VD (2006) Role of nurse plants in *Araucaria* Forest expansion over grassland in south Brazil. *Austral Ecology* **31**, 520–528. doi:10.1111/j.1442-9993.2006.01602.x
- Eckenwalder JE (2009) 'Conifers of the world: the complete reference.' (Timber Press: Portland, OR)
- Einig W, Mertz A, Hamp R (1999) Growth rate, photosynthetic activity, and leaf development of Brazilian pine seedlings [*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.]. *Plant Ecology* **143**, 23–28. doi:10.1023/A:1009835720660
- Ferreira AG, Handro W (1979) Aspects of seed germination in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Revista Brasileira de Botânica* **2**, 7–13.
- Ferreira AG, Dietrich SMC, Handro W (1979) Changes in the metabolism of *Araucaria angustifolia* during the early phases of germination and growth. *Revista Brasileira de Botânica* **2**, 67–71.
- Franco AMS, Dillenburg LR (2007) Ajustes morfológicos e fisiológicos em plantas jovens de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em resposta ao sombreamento. *Hoehnea* **34**, 135–144.
- García-Cebrián F, Estesio-Martínez J, Gil-Pelegrín E (2003) Influence of cotyledon removal on early seedling growth in *Quercus robur* L. *Annals of Forest Science* **60**, 69–73. doi:10.1051/forest:2002075
- Haines RJ (1983) Embryo development and anatomy in *Araucaria* Juss. *Australian Journal of Botany* **31**, 125–140. doi:10.1071/BT9830125
- Hanley ME, Fenner M, Whibley H, Darvill B (2004) Early plant growth: identifying the end point of the seedling phase. *New Phytologist* **163**, 61–66. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01094.x
- Inoue TK, Torres DV (1980) Comportamento do crescimento de mudas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. em dependência da intensidade luminosa. *Revista Floresta* **11**, 7–11.
- Iob G, Vieira EM (2008) Seed predation of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) in the Brazilian *Araucaria* Forest: influence of deposition site and comparative role of small and 'large' mammals. *Plant Ecology* **198**, 185–196. doi:10.1007/s11258-007-9394-6
- Kitajima K (1996) Ecophysiology of tropical tree seedling. In 'Tropical forest plant ecophysiology'. (Eds SS Mulkey, RL Chazdon, AP Smith) pp. 559–596. (Chapman and Hall: New York)
- Kitajima K (2002) Do shade-tolerant tropical tree seedlings depend longer on seed reserves? Functional growth analysis of three Bignoniaceae species. *Functional Ecology* **16**, 433–444. doi:10.1046/j.1365-2435.2002.00641.x
- Kitajima K, Fenner M (2000) Ecology of seedling regeneration. In 'Seeds: the ecology of regeneration in plant communities'. (Ed. M Fenner) pp. 331–359. (University of Southampton: Southampton, UK)
- Leishman MR, Wright IJ, Moles AT, Westoby M (2000) The evolutionary ecology of seed size. In 'Seeds: the ecology of regeneration in plant communities'. (Ed. M Fenner) pp. 31–57. (University of Southampton: Southampton, UK)
- Mantovani A, Morellato LPC, Reis MS (2004) Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. *Revista Brasileira de Botânica* **27**, 787–796.
- Panza V, Láinez V, Maroder H, Prego I, Maldonado S (2002) Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **140**, 273–281. doi:10.1046/j.1095-8339.2002.00093.x
- Pereira F, Ganade G (2008) Spread of a Brazilian keystone-species in a landscape mosaic. *Forest Ecology and Management* **255**, 1674–1683. doi:10.1016/j.foreco.2007.11.026
- Rosado RM, Ferreira AG, Mariath JEA, Cocucci AE (1994) Amido no megagametófito de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze: degradação durante a germinação e desenvolvimento do esporófito. *Acta Botanica Brasílica* **8**, 35–43.
- Santos HP, Buckeridge MS (2004) The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. *Annals of Botany* **94**, 819–830. doi:10.1093/aob/mch209
- Taiz L, Zeiger E (2006) 'Plant physiology.' 4th edn. (Sinauer Associates: Sunderland, MA)
- Tompsett PB (1984) Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. *The Annals of Applied Biology* **105**, 581–586. doi:10.1111/j.1744-7348.1984.tb03085.x
- Westoby M, Leishman M, Lord J (1996) Comparative ecology of seed size and dispersal. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **351**, 1309–1318. doi:10.1098/rstb.1996.0114

Capítulo 2

Acúmulo e degradação das reservas do hipocótilo em plântulas de *Araucaria angustifolia* em ambientes contrastantes de disponibilidade de luz e nutrientes

TATIANA R. LÖWE^A AND LÚCIA R. DILLENBURG^{A,B}

^A *Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil*

^B *Corresponding author (lucia.dillenburg@ufrgs.br)*

Resumo

Araucaria angustifolia possui o segundo maior tamanho de semente entre as coníferas. Suas reservas amiláceas representam uma importante fonte de alimento para os animais associados à Floresta Ombrófila Mista. O tempo de uso destas reservas é longo e não se altera frente a diferentes disponibilidades de luz e de nutrientes em que a plântula se estabelece. O principal dreno destas reservas iniciais é o hipocótilo subterrâneo da espécie. Baseado neste longo e ininterrupto tempo de uso das reservas da semente e na já verificada estocagem destas no hipocótilo, este trabalho testa as seguintes hipóteses: 1) o acúmulo das reservas no hipocótilo independe da disponibilidade de luz e nutrientes; 2) a depleção e realocação das reservas do hipocótilo depende destes fatores. Para tanto, as plantas foram cultivadas por 139 dias em quatro combinações distintas de disponibilidade de luz e nutrientes. Dentro de cada tratamento as plantas foram distribuídas em quatro grupos de desmontes periódicos: 43, 83, 124 e 145 dias após a semeadura. A massa do hipocótilo e suas taxas de acúmulo e depleção foram comparadas nos diferentes tratamentos. O acúmulo se mostrou indiferente à disponibilidade de luz e nutrientes em que a plântula se estabelecia, enquanto que a depleção e a realocação destas reservas foi influenciada por estes fatores. De maneira geral, o efeito da luz no crescimento e alocação de massa das plântulas foi maior que o efeito dos nutrientes. As vantagens da transferência ininterrupta das reservas da semente para o hipocótilo e os mecanismos envolvidos na depleção e realocação diferencial destas reservas para a plântula em crescimento são discutidos.

Palavras chave : reservas iniciais – dreno – fatores abióticos.

Introdução

O tamanho das sementes de uma espécie representa a quantidade de investimento materno numa prole individual, ou o quanto o embrião está provido de “reservas” para começar a sua jornada de vida. As espécies de sementes grandes são mais tolerantes às adversidades que a plântula pode enfrentar no início de seu estabelecimento, e os possíveis mecanismos para esta tolerância são os chamados efeito do tamanho da plântula, o efeito de reserva e o efeito metabólico. Dentre estes, o efeito de reserva requer que a massa armazenada aumente em maior taxa que a massa da plântula ficando estas reservas retidas por um longo período, sem serem comprometidas com o desenvolvimento de estruturas fixas, como raízes e folhas (Leishman *et al.*, 2000). Várias espécies que possuem sementes grandes estocam parte de suas reservas no caule e/ou raízes (Castro-Diez *et al.*, 1998; Dillenburg *et al.*, 2010; Barberis e Dalling, 2008; Kabeya e Sakai, 2003), e, em alguns casos, estas reservas armazenadas são utilizadas para o rebrote após o ataque de herbívoros (Barberis e Dalling, 2008; Bonfil 1998).

A espécie em estudo, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, tem sua distribuição geográfica nos estados do sul e sudeste do Brasil, e parte da Argentina e Paraguai (Carvalho 1994). A espécie possui sementes grandes (~5-8 g massa fresca; Tompsett 1984) e germinação hipógea (Haines 1983). Suas abundantes sementes, os chamados “pinhões”, são importante fonte de alimento para a fauna associada à floresta com araucárias, onde alguns animais podem atuar também como dispersores das mesmas (Iob e Vieira 2008; Brum *et al.* 2010). Uma fração considerável destas reservas iniciais das sementes é armazenada no hipocótilo subterrâneo (Dillenburg *et al.*, 2010), o que poderia ser vantajoso, segundo os autores, para o estabelecimento da plântula, protegendo estas reservas da predação e também as transferindo para um órgão mais tolerante à dessecação do que as próprias sementes; as quais, segundo Panza (2002), são

recalcitrantes. O tempo de uso das reservas das sementes é longo e não sofre influência da disponibilidade de luz e nutrientes no ambiente em que a plântula se estabelece (Löwe e Dillenburg, 2011). Porém, uma vez que as reservas armazenadas no hipocótilo da espécie são oriundas das reservas iniciais da semente, o conhecimento dos padrões de acúmulo e degradação das reservas no hipocótilo da espécie frente a condições ambientais contrastantes ajudaria a elucidar as estratégias da alocação de reservas durante o crescimento inicial e estabelecimento da espécie.

Embora tenha sido recentemente demonstrado que o tempo de transferência das reservas da semente à plântula é indiferente à disponibilidade de dois recursos abióticos, luz e nutrientes (Löwe e Dillenburg, 2011), a degradação e realocação destas reservas do hipocótilo poderiam responder àqueles mesmos fatores (luz e nutrientes), tendo em vista que esta degradação se dá quando a maior parte da transferência semente-plântula está concluída (Dillenburg *et al.*, 2010). O objetivo deste trabalho foi responder às seguintes questões: 1) O acúmulo das reservas do hipocótilo depende da disponibilidade de luz e nutrientes à plântula em crescimento? 2) A degradação e realocação das reservas do hipocótilo dependem da disponibilidade destes mesmos fatores?

Materiais e métodos

MATERIAL VEGETAL

Os pinhões foram comprados de catadores em São Francisco de Paula (RS) no dia 26 de maio de 2008, acondicionados em embalagens plásticas e, então, armazenados em refrigerador durante cerca de 45 dias.

As sementes utilizadas foram selecionadas com base no teste d'água, retirando-se as sobrenadantes. Posteriormente, os pinhões foram desinfestados com hipoclorito de sódio a 1% por 20 minutos e enxaguados com água destilada. Após esta etapa, foi

realizada uma seleção manual, onde os pinhões de menor tamanho foram desprezados, além daqueles com algum tipo de dano mecânico (“bichados”). As sementes foram escarificadas, removendo-se parcialmente os integumentos, para acelerar e uniformizar a germinação (Ferreira e Handro 1979). Como suporte e substrato para a germinação, foram utilizadas bandejas com vermiculita úmida.

Um lote adicional com 23 plantas foi utilizado para estimar a massa seca de todas as plantas no momento do transplante. Com base na relação entre massa fresca e a massa seca deste lote, foi possível calcular uma equação de regressão linear, para estimar o valor de massa seca das plantas no momento do transplante para a casa de vegetação. Para tanto, o peso fresco das plantas a serem transplantadas (raiz principal, hipocótilo, cotilédone e pinhão, que estavam presentes neste momento) foi aferido. Em virtude do grande número de unidades amostrais, o transplante das plântulas para a casa de vegetação se deu em diferentes intervalos de tempo. Estes foram utilizados como critério de bloqueamento (8 blocos). As plântulas (pinhões com radícula de até cerca de 5 cm) foram transplantadas aos vasos entre os dias 22 a 29 de julho de 2008.

CONDIÇÕES DE CULTIVO E TRATAMENTOS

O experimento foi conduzido em canteiros do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da UFRGS (30°01'59'S e 51°13'48'W) no período de 22 de julho a 8 de dezembro de 2008. Durante este período, foram obtidos dados de temperatura média mensal e de temperaturas médias mensais das máximas e mínimas para a cidade de Porto Alegre – RS (Tabela 1). Durante dois intervalos de tempo no ano de 2009 (de 28 de outubro a 2 de novembro; e de 27 de novembro a 6 de dezembro), foram registradas, a cada hora, a temperatura e umidade nas duas condições de cultivo estudadas, usando-se coletores de temperatura e umidade do ar (Logbox RHT, Novus, Rio Grande do Sul,

Brasil). As plantas no sol tiveram temperaturas mais altas (1,8 a 3 °C) e umidades relativas mais baixas (9,5 a 10%) do que as plantas na sombra.

Tabela 1. Valores de temperatura (°C) para a cidade de Porto Alegre (RS), durante o período de cultivo das plantas (2008). Estação climatológica principal de Porto Alegre/RS – 8º Distrito de meteorologia.

Mês	Temp. média mensal	Temp. média mensal das máximas	Temp. média mensal das mínimas
Julho	16,2	21,2	13,1
Agosto	15,5	21,1	11,4
Setembro	16	21,3	12,1
Outubro	19,3	24,2	15,8
Novembro	21,9	27,8	17,7
Dezembro	23,1	29,1	18,4

Garrafas *PET* de 2 L foram utilizadas como recipientes de cultivo após terem a porção superior mais estreita cortada. O substrato consistiu de areia média lavada, e o volume de areia inserido em cada vaso foi de 1,5 L, mantido com um mínimo de 70% da capacidade de vaso (estimada em 0,16 g g⁻¹).

A fim de testarmos a influência dos fatores abióticos na partição de reservas e no tempo de consumo das mesmas, diferentes disponibilidades de recursos foram utilizadas, resultantes da combinação de dois níveis de intensidade luminosa e dois níveis de disponibilidades de nutrientes.

Segue abaixo a relação nominal dos quatro tratamentos utilizados:

1. IN (alta irradiância e alta disponibilidade nutricional);
2. In (alta irradiância e baixa disponibilidade nutricional);
3. iN (baixa irradiância e alta disponibilidade nutricional);
4. in (baixa irradiância e baixa disponibilidade nutricional);

As plantas na sombra (baixa irradiância) foram mantidas em gaiolas fechadas com sombrite e localizadas sob influência do sombreamento adicional de uma mata

próxima. As plantas no sol (alta irradiância) cresceram sob telado de sombrite, porém de baixo nível de sombreamento.

Foram realizadas medições de irradiância para quantificar os níveis de luz ao quais as plântulas estavam submetidas, assim como o nível máximo de irradiância no local de estudo, fazendo uso de um sensor de quanta de luz LI-190S-1 de um porômetro de estado estacionário (modelo LI-1600, Licor Inc., Nebraska, EUA). Essas medições foram realizadas em três diferentes dias, em três horários distintos (10; 12 e 15 horas) a cada dia, nos meses de setembro, outubro e novembro de 2008, respectivamente. Os valores médios diários da irradiância plena, medidos ao ar livre, sem a presença de nuvens e sem a influência do sombrite, foram de 1.175, 1.517 e 1.568 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nos meses de setembro, outubro e novembro, respectivamente. Devido ao sombreamento imposto por árvores próximas às plantas no sol, estas foram submetidas a reduções luminosas que foram de ~45% (9 as 14 horas) a ~80% (15 as 18 horas) da radiação total, com valores mínimos e máximos registrados de 210 a 980 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plantas na sombra foram submetidas a reduções luminosas mais estáveis (~98%), com valores mínimos e máximos de irradiância de 3 e 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. A intensidade luminosa do ambiente de sombra é similar à encontrada na mata nativa de *Araucaria* por Duarte *et al.* (2002).

A solução de Hoagland modificada (Taiz & Zeiger 2004) a 10% de sua força foi aplicada quinzenalmente nas plantas sob alta disponibilidade de nutrientes, fornecendo-se um volume correspondente à quantidade total de água na capacidade do vaso (320 mL). Cabe ressaltar que foi realizada a lavagem prévia (com 200 mL de água) dos vasos um dia antes da aplicação das soluções, a fim de evitar o acúmulo de sais. Na semana seguinte a cada aplicação, forneceu-se a quantidade de solução nutritiva perdida (por evaporação e percolação). Esta perda foi estimada em 50 mL. Com a chegada de dias

mais quentes e com o maior tamanho das plântulas (consequentemente, com o maior uso da água), foi realizada uma nova medida de perda de água semanal, da qual se obtiveram 170 mL e 60 mL para plântulas de sol e de sombra, respectivamente. As plantas sob baixa disponibilidade nutricional foram tratadas exatamente da mesma forma, apenas trocando-se a solução nutritiva por água. Cabe ressaltar que a irrigação das plantas (água ou solução nutritiva) foi realizada quinzenalmente a fim de manter a capacidade de vaso em 70%; conforme anteriormente citado, a água perdida foi resposta semanalmente.

MANIPULAÇÕES E AVALIAÇÕES PARA DETERMINAR O ACÚMULO E DEPLEÇÃO DAS RESERVAS DO HIPOCÓTILO

Foram estabelecidos quatro grupos de plantas, os quais tiveram suas biomassas avaliadas aos 43, 83, 124 e 145 dias após a sementeira. Esses desmontes avaliaram se o acúmulo e a degradação das reservas do hipocótilo, baseados na variação de massa deste órgão no decorrer do período de cultivo, foram afetados pela disponibilidade de luz e nutrientes às plantas. O acúmulo e o consumo das reservas do hipocótilo estão sendo definidos aqui como o aumento e a redução na massa do hipocótilo, respectivamente. Salienta-se o fato de que mesmo quando há aumento em massa, pode também ocorrer o consumo das reservas, assim como, quando há redução na massa, pode também estar ocorrendo concomitantemente a deposição de reservas; portanto, avaliou-se o acúmulo e consumo líquidos. Além da massa do hipocótilo, foi avaliada também a massa seca do megagametófito, a fim de compararmos a dinâmica de massa destas duas estruturas de reserva da plântula.

Para a estimativa da taxa de acúmulo e/ou depleção das reservas do hipocótilo, foi calculada, dentro de cada tratamento, taxas médias de acúmulo e depleção de reservas, com base na diferença em massa desta estrutura entre os períodos avaliados.

Até os 83 dias após a semeadura, estas diferenças representam acúmulo líquido de reservas; então efetuou-se a subtração entre cada período e o seu período cronologicamente anterior (inicial). Aos 124 dias após a semeadura, as diferenças observadas representam depleção líquida das reservas, sendo realizada a subtração entre o período inicial (mais antigo) e o período final (mais recente). A comparação destas taxas entre os tratamentos (IN, In, iN e in) evidencia diferenças no acúmulo e degradação das reservas hipocotilares com base nas diferenças na disponibilidade de luz e nutrientes a que as plantas estavam submetidas.

A massa seca total da planta também foi avaliada, o que permite concluir sobre o acúmulo total de massa em cada tratamento, e a possível influência dos fatores avaliados para o crescimento total em massa da planta.

A razão de massa da raiz principal, raízes laterais, hipocótilo e parte aérea, foram avaliadas para demonstrar como se dá a distribuição da massa na planta entre os diferentes tratamentos avaliados. A distribuição diferencial de massa entre as partes da planta, nos diferentes tratamentos, em cada grupo de plantas, indicam se a alocação de massa é influenciada pelas diferenças no ambiente de luz e nutricional em que a planta se estabelece (no caso, luz e nutrientes).

TAMANHO AMOSTRAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Considerando-se os quatro tratamentos, cada um com quatro grupos de plantas, e usando-se oito réplicas (8 blocos) por grupo e tratamento, fizeram-se necessárias 128 unidades experimentais (plantas) para a condução do experimento.

O delineamento estatístico utilizado foi o de blocos casualizados. Foi realizada ANOVA fatorial para todas as comparações feitas dentro de cada grupo de plantas; estes grupos se diferenciaram quanto aos dias em que foram realizados os desmontes. As comparações feitas dentro de cada grupo incluem comparações de massa e taxas de

acúmulo e depleção das reservas do hipocótilo. Os dados que apresentaram significância pelo teste F a 5% para os fatores luz, nutrientes ou interação entre luz e nutrientes foram comparados pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). O programa Statistix 8 (Analytical Software) foi utilizado em todas as análises.

Resultados

O acúmulo inicial das reservas no hipocótilo de *Araucaria angustifolia* se deu até os 83 dias após a semeadura. Durante o acúmulo, nos dois períodos avaliados (43 e 83 dias), a massa seca deste órgão não variou significativamente com as mudanças na disponibilidade de luz e nutrientes a que as plantas foram submetidas (Figura 1). A taxa de acúmulo das reservas no hipocótilo exibiu o mesmo resultado da massa seca do órgão, não sendo percebidas, portanto, diferenças significativas entre os tratamentos avaliados, nos dois períodos de acúmulo (aos 43 e 83 dias – Figura 2A).

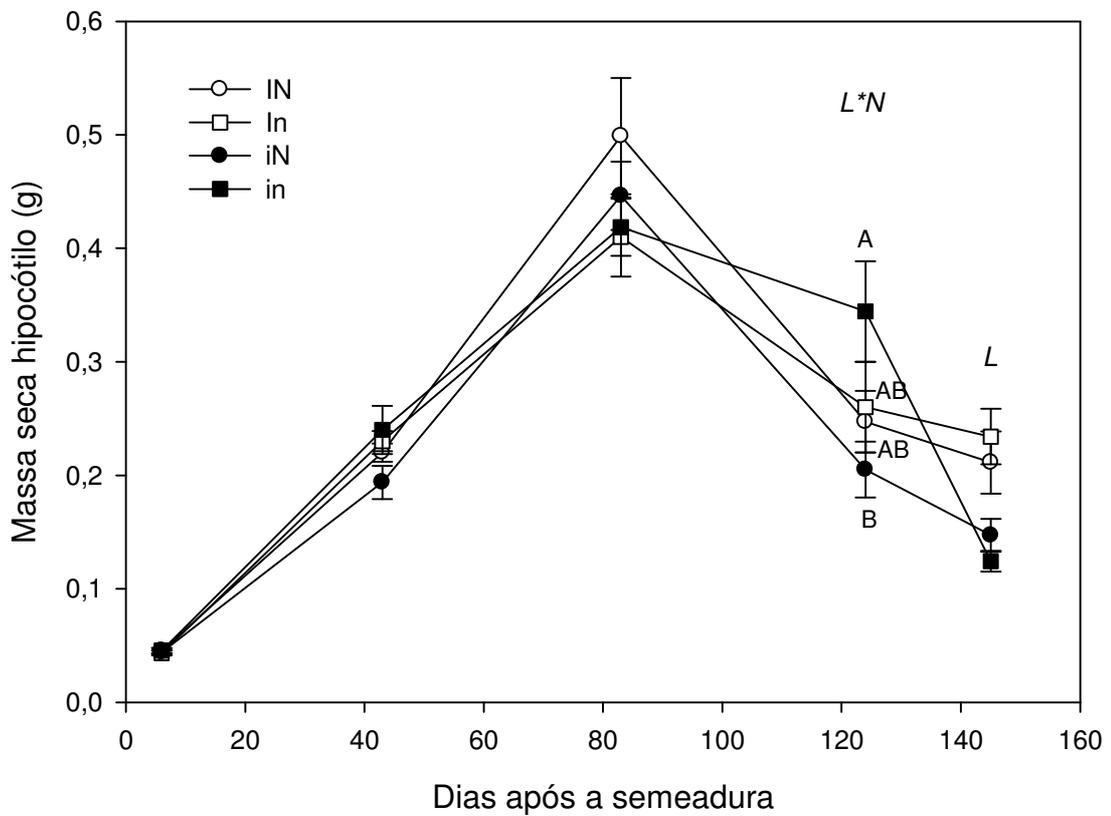


Figura 1 – Variações na massa do hipocótilo de plântulas de *Araucaria angustifolia* submetidas a distintas disponibilidades de luz e nutrientes durante o cultivo. As barras verticais representam o erro padrão. As letras *L*, *N* e *L*N* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator nutrientes (*N*) e da interação entre ambos (*L * N*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*N*. I - alta irradiância; i - baixa irradiância; N - alta disponibilidade nutricional e n - baixa disponibilidade nutricional.

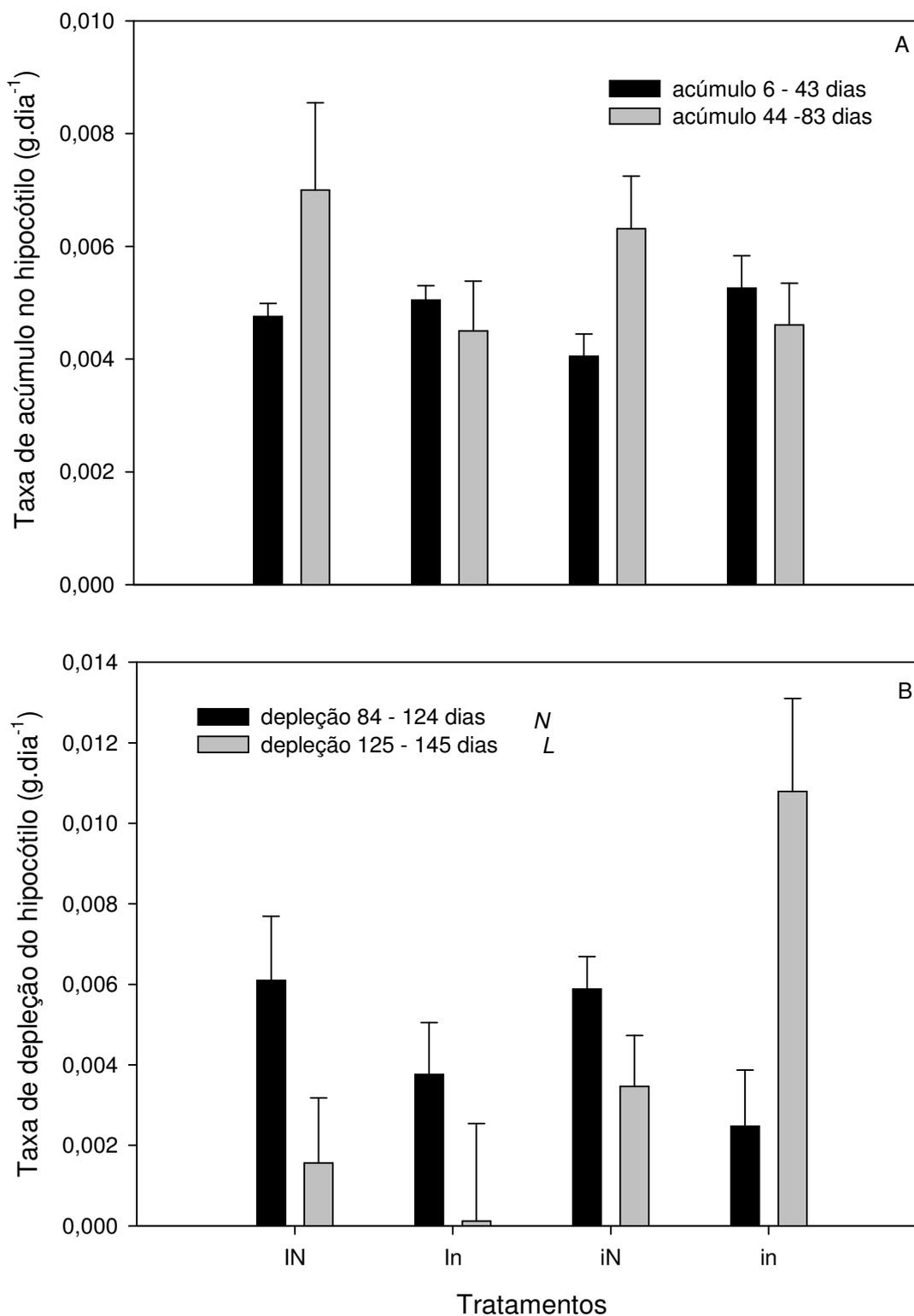


Figura 2 - Taxas médias de acúmulo (A) e degradação (B) de reservas no hipocótilo de *Araucaria angustifolia* submetidas a quatro diferentes combinações da disponibilidade de luz e nutrientes. As barras verticais representam o erro padrão. As letras L, N e L*N

indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator nutrientes (*N*) e da interação entre ambos (*L * N*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*N*. I - alta irradiância; i - baixa irradiância; N - alta disponibilidade nutricional e n - baixa disponibilidade nutricional.

A massa seca do hipocótilo, assim como as taxas de depleção deste órgão, nos dois últimos desmontes (aos 124 e 145 dias após a semeadura), foram responsivas ao ambiente em que a planta se estabeleceu (Figura 1 e 2). Aos 124 dias após a semeadura, a massa seca do órgão respondeu à aplicação de solução nutritiva (efeito dos nutrientes; $P = 0,0354$), mas a significância estatística deste efeito apenas ocorreu na menor disponibilidade luminosa em virtude da interação significativa entre os dois fatores ($P = 0,0333$), onde as plantas nas condições mais desfavoráveis (in) tiveram a maior massa hipocotilar (Figura 1). No período entre 84 e 124 dias, as taxas de depleção das reservas do hipocótilo também responderam ao efeito da aplicação de nutrientes ($P = 0,0377$), sendo que as plantas em condições nutricionais mais favoráveis tiveram maior taxa de depleção do hipocótilo do que as que receberam apenas água (Figura 2B). Cabe ressaltar que, neste período, as plantas sob as condições menos favoráveis (in) tiveram as menores taxas de depleção das reservas do hipocótilo (Figura 2B), e conseqüentemente, foram as plantas que exibiram o maior tamanho em massa deste órgão (Figura 1). No último desmonte (145 dias), se observou apenas o efeito da luz ($P = 0,0478$ e $P = 0,0068$; para massa e taxa de depleção do órgão, respectivamente), onde as plantas no sol tiveram a maior massa deste órgão (Figura 1) e a menor depleção das reservas do hipocótilo em relação ao desmonte anterior (Figura 2B), quando comparadas às plantas na sombra.

As variações em massa no megagametófito (Figura 3) no decorrer do período de cultivo não foram afetadas pelas diferentes disponibilidades de luz e nutrientes a que as plantas estavam submetidas.

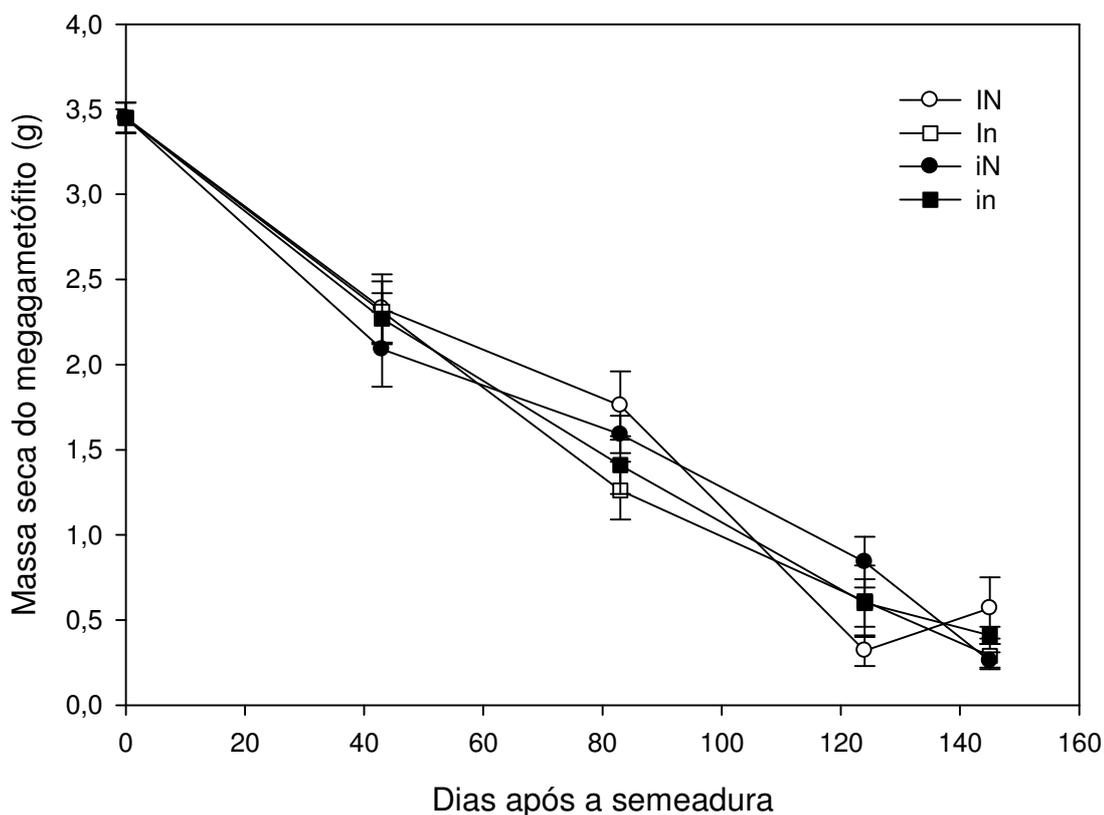


Figura 3 – Variações de massa seca do megagametófito de plântulas de *Araucaria angustifolia* submetidas a distintas disponibilidades de luz e nutrientes durante o cultivo. As barras verticais representam o erro padrão. I - alta irradiância; i - baixa irradiância; N - alta disponibilidade nutricional e n - baixa disponibilidade nutricional.

A razão de massa do hipocótilo (especificamente aos 83 dias) foi influenciada pela disponibilidade de luz ($P = 0,0036$), onde as plantas na sombra exibiram maior contribuição do hipocótilo para a massa seca total do que plantas sob maiores disponibilidades luminosas (Figura 4). Isto se deveu, em grande parte, a uma maior contribuição relativa da parte aérea ($P = 0,0021$, efeito significativo do fator luz) e

raízes laterais ($P = 0,0007$, efeito significativo do fator luz) nas plantas sob níveis favoráveis de radiação e a conseqüente diminuição da contribuição do hipocótilo (Figura 4) para a massa seca relativa das mesmas.

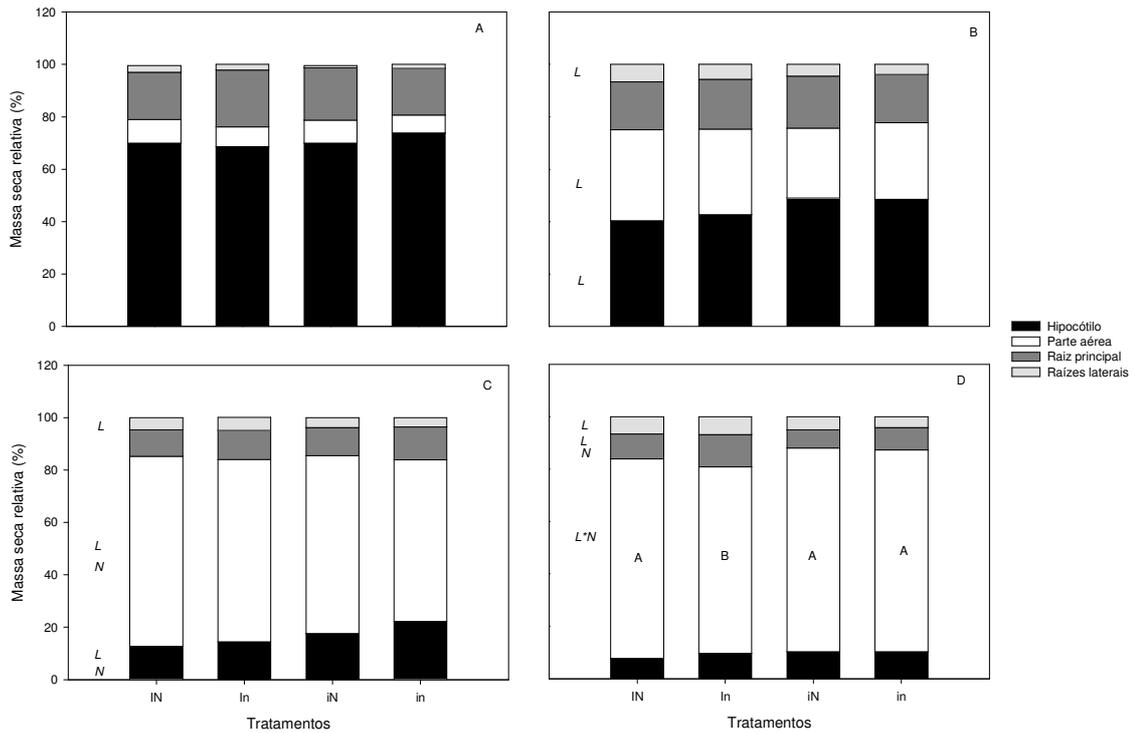


Figura 4 – Razão de massa das quatro partes da planta (raiz principal, raízes laterais, hipocótilo e parte aérea) para a massa total da plântula. A) Razão de massa das plantas aos 43 dias após a semeadura. B) Razão de massa das plantas aos 83 dias após a semeadura. C) Razão de massa das plantas aos 124 dias após a semeadura. D) Razão de massa das plantas aos 145 dias após a semeadura. As letras *L*, *N* e *L*N* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator nutrientes (*N*) e da interação entre ambos (*L * N*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*N*. I

- alta irradiância; i - baixa irradiância; N - alta disponibilidade nutricional e n - baixa disponibilidade nutricional.

Aos 124 dias após a semeadura, observam-se novamente diferenças na contribuição relativa da parte aérea, raiz lateral e hipocótilo das plantas. A parte aérea e o hipocótilo exibiram diferenças quanto ao fator luz ($P = 0,0002$ e $P = 0,0000$; parte aérea e hipocótilo, respectivamente) e também quanto ao fator nutrientes ($P = 0,0054$ e $P = 0,0255$; parte aérea e hipocótilo, respectivamente), sendo que a parte aérea respondeu positivamente ao aumento na quantidade de luz e nutrientes, enquanto que o hipocótilo exibiu um efeito negativo destes fatores sobre a sua contribuição no acúmulo total de massa pela planta. Quanto à resposta da raiz lateral neste período, esta exibiu somente o efeito positivo da luz ($P = 0,0512$) na sua contribuição para a massa seca total.

No último desmonte realizado, aos 145 dias após a semeadura, a razão de massa da parte aérea sofreu interação entre os fatores ($P = 0,0223$, efeito significativo da interação dos fatores luz e nutrientes), onde o efeito positivo da aplicação de solução nutritiva foi apenas significativo na maior intensidade luminosa, enquanto que o efeito negativo da maior intensidade luminosa foi apenas significativo na menor disponibilidade nutricional. As razões de massa da raiz principal e das raízes laterais responderam positivamente a maior disponibilidade de radiação solar ($P = 0,0000$ e $P = 0,0002$, efeito significativo do fator luz para a raiz principal e raízes laterais, respectivamente). A razão de massa da raiz principal foi também influenciada pela disponibilidade de nutrientes ($P = 0,0000$), sendo maior nas plantas que foram tratadas apenas com água.

Com relação ao acúmulo total de massa pelas plantas, este começa a diferir a partir da segunda coleta (83 dias), onde houve efeito positivo da boa disponibilidade de luz ($P = 0,0129$) e da aplicação de nutrientes ($P = 0,0371$) (Figura 5). O efeito da interação ($P = 0,0357$) destes fatores se manifesta pelo efeito significativo da disponibilidade de nutrientes no crescimento das plantas apenas para as plantas bem iluminadas, enquanto que o efeito da disponibilidade luminosa no crescimento das plantas foi apenas significativo nas plantas onde foi aplicada a solução nutritiva (Figura 5). Aos 124 dias após a semeadura, a massa total acumulada pelas plantas exibe efeito promotor da luz ($P = 0,0152$) e interação entre os dois fatores avaliados ($P = 0,0444$). O efeito positivo da melhor disponibilidade luminosa no crescimento das plantas foi significativo apenas na presença da solução nutritiva. No último desmonte, aos 145 dias, houve apenas o efeito da luz ($P = 0,0000$), onde as plantas sob maiores disponibilidades luminosas tiveram aproximadamente duas vezes mais massa comparada às plantas na sombra (Figura 5).

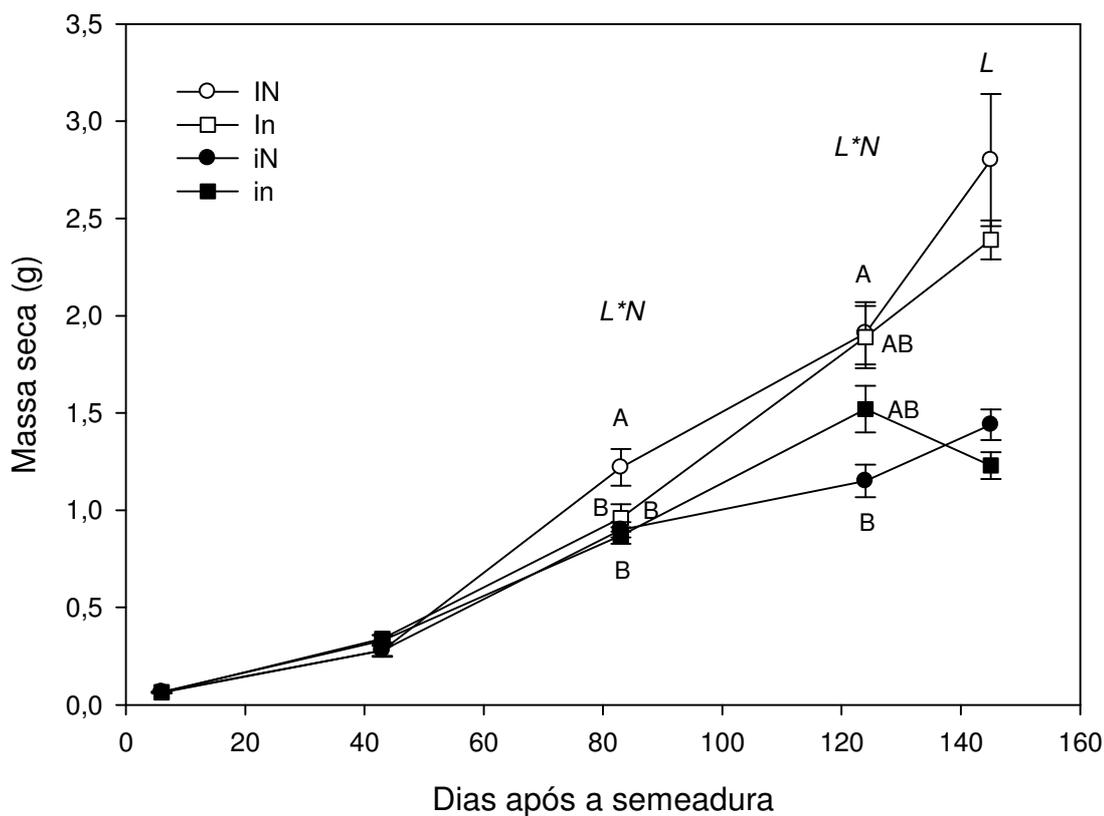


Figura 5 – Massa seca total em plântulas de *Araucaria angustifolia* submetidas a distintas disponibilidades de luz e nutrientes durante o cultivo. As barras verticais representam o erro padrão. As letras *L*, *N* e *L*N* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator nutrientes (*N*) e da interação entre ambos (*L * N*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*N*. *I* - alta irradiância; *i* - baixa irradiância; *N* - alta disponibilidade nutricional e *n* - baixa disponibilidade nutricional.

Discussão

Em resposta à primeira pergunta levantada neste estudo, a quantidade de reservas acumuladas no hipocótilo e as taxas de acúmulo durante o período inicial de desenvolvimento das plântulas de *A. angustifolia* (até 83 dias após a semeadura) não foram afetadas pela disponibilidade de luz e de nutrientes às mesmas. O consumo da biomassa do pinhão foi coerente com este cenário, ao evidenciar padrões semelhantes de depleção de reservas para as quatro condições ambientais testadas, tanto no presente estudo quanto no relatado por Löwe e Dillenburg (2011). Sabe-se que o hipocótilo constitui o dreno preferencial inicial das reservas da semente (Dillenburg *et al.*, 2010), e seu padrão de acúmulo inicial de massa sugere que o processo inicial de transferência de reservas da semente à plântula é indiferente à disponibilidade externa de recursos, sendo provavelmente controlado principalmente por fatores endógenos.

O fato da transferência das reservas da semente ao seu principal dreno (hipocótilo) ocorrer em um mesmo ritmo sob as diferentes condições de luz e de nutrientes é, até certo ponto, uma consequência direta do padrão observado por Löwe e Dillenburg (2011) no que diz respeito ao ritmo de consumo das reservas do pinhão: para que o consumo das reservas da semente possa estar desvinculado da disponibilidade externa de recursos e, conseqüentemente, da taxa de crescimento da plântula, como demonstrado por estes autores, é necessário que algum órgão na plântula armazene estas reservas. O presente estudo de fato mostra que, no período inicial de vida das plântulas, a quantidade de massa estocada no hipocótilo é também pouco responsiva às condições externas à mesma.

Esta resposta de estocagem inicial no hipocótilo, aliada à grande contribuição deste órgão para a massa inicial das plântulas, sugere uma estratégia de sobrevivência

da espécie neste estágio de desenvolvimento da mesma: ao garantir uma quantidade substancial e pouco variável de reservas estocadas e não comprometidas com o crescimento (mesmo com condições favoráveis para tal), a espécie pode assegurar que um evento desfavorável como herbivoria ou qualquer outro evento que resulte na perda de tecidos permita a adequada reposição dos mesmos. A quantidade de carboidratos armazenada no hipocótilo subterrâneo poderia, assim, aumentar a chance de a plântula rebrotar ou simplesmente prolongar sua longevidade em condições adversas até a degradação completa destas reservas. Soma-se a este fato a já discutida relevância da existência de um órgão subterrâneo para reestocagem das reservas da semente para reduzir as chances de predação dos pinhões (Löwe e Dillenburg, 2011).

O acúmulo de parte das reservas das sementes em outros órgãos subterrâneos como raízes tem sido documentado em várias espécies arbóreas (Kabeya e Sakai 2003; Myers e Kitajima 2007; Barberis e Dalling 2008), que, à semelhança de *A. angustifolia*, são espécies suscetíveis à predação de suas sementes. À semelhança do presente estudo, em *Gustavia superba*, a razão de massa de raiz (RMR) até os 20 dias após a expansão total das folhas não foi influenciada pelo ambiente de luz. Em *Quercus crispula* foi observado o acúmulo substancial de carboidratos nas raízes quando a fase de expansão foliar iniciou, demonstrando também que para esta espécie uma parte dos recursos das sementes seria translocada para as raízes e estocada como reserva em um período inicial de desenvolvimento da planta (Kabeya e Sakai 2003). Os autores também creditaram importância ecológica deste armazenamento por reduzir os riscos de perda de todas as reservas pela predação dos cotilédones (Kabeya e Sakai 2003). Uma estratégia bem diferente destas anteriormente citadas se observa em *Dryobalanops lanceolata*, uma espécie também arbórea e de sementes grandes, onde as reservas dos cotilédones seriam

rapidamente transferidas para a construção da planta, não servindo de suporte de longo prazo para a plântula (Ichie *et al.* 2001).

Apesar dos semelhantes padrões de acúmulo de massa no período inicial de desenvolvimento das plântulas, a razão de massa do hipocótilo diferiu entre os tratamentos ao final deste período de acúmulo (83 dias), tendo uma contribuição relativa significativamente menor nas plantas sob altas do que nas plantas sob baixas irradiâncias. Esta menor contribuição em plantas mais irradiadas reflete o maior crescimento tanto da parte aérea quanto das raízes laterais nestas plantas. Como a emergência da parte aérea já se manifesta mesmo durante o período de armazenamento no hipocótilo, este maior crescimento é provavelmente reflexo da maior produção fotossintética das plantas com maior quantidade de luz disponível. A emergência da parte aérea já durante o período de armazenamento inicial no hipocótilo contrasta com o da espécie *Araucaria bidwillii*, em que primeiramente se dá todo o acúmulo de reservas no hipocótilo, que chega a formar um tubérculo, para somente então emergir a parte aérea, com a conseqüente degradação destas reservas (Burrows *et al.* 1992).

Em resposta à segunda pergunta colocada neste trabalho, os dados de massa do hipocótilo e taxas de depleção do mesmo evidenciam que a degradação das reservas do hipocótilo (após 83 dias) não é a mesma nas diferentes condições testadas, sendo influenciada pela disponibilidade de recursos externos à plântula. No período inicial de degradação de reservas, esta foi afetada pelo estado nutricional da planta, sendo que as plantas com maior disponibilidade nutricional exibiram maiores taxas de depleção de massa no hipocótilo. No período posterior, a degradação de reservas do hipocótilo foi favorecida pela menor luminosidade.

Dillenburg *et al.* (2010) enfatizaram a importância das reservas inicialmente acumuladas no hipocótilo para o crescimento da parte aérea. Ao mesmo tempo, esta estrutura subterrânea pode subsequentemente servir de dreno para parte da produção fotossintética da parte aérea já desenvolvida. Estas informações são importantes para interpretarmos os resultados obtidos. O fato das plantas melhor nutridas exibirem uma maior redução inicial em massa no hipocótilo pode indicar que o desvio de reservas do hipocótilo para a parte aérea pode ser inicialmente controlado pelo adequado acesso da planta a nutrientes do solo, o que seria conquistado ou por um bom desenvolvimento radicular e/ou por uma alta disponibilidade nutricional. Desta forma, a planta asseguraria o esperado balanço funcional entre parte aérea e sistema radicular (Grechi *et al.* 2009; Fonseca *et al.* 2010). Uma resposta semelhante (desvio de reservas do hipocótilo para o crescimento da parte aérea) seria também esperada para plantas submetidas a baixa disponibilidade luminosa; entretanto, a baixa luminosidade não estimulou a degradação de reservas do hipocótilo no período inicial de depleção do mesmo. No entanto, uma resposta induzida apenas pela disponibilidade nutricional num estágio inicial de desenvolvimento garantiria à plântula um maior investimento em parte aérea apenas após assegurado o acesso adequado aos nutrientes, especialmente se for considerado o fato de que a principal função da parte aérea (síntese de carboidratos pela fotossíntese) está sendo, neste estágio de desenvolvimento, parcialmente substituída pelas sementes grandes e ricas em amido da espécie.

Ao final deste primeiro período de degradação (124 dias), a alocação de massa entre as diferentes partes da planta revela que as plantas com baixa disponibilidade de luz e de nutrientes ('in') contrastam com as demais pela baixa alocação de massa à parte aérea e pela maior contribuição do hipocótilo. Estas plantas provavelmente limitaram o crescimento da parte aérea por terem forte limitações nutricionais, impostas tanto pela

baixa disponibilidade externa de nutrientes quanto pela limitada contribuição fotossintética para a construção de raízes laterais. Consistente com o período anterior de avaliação, as plantas sob maiores irradiâncias apresentaram maior investimento em raízes laterais do que as plantas sob baixas irradiâncias. Ao contrário do relatado para muitas espécies perenes (Reich *et al.* 1998; Nakazono *et al.* 2001), a araucária não respondeu ao sombreamento com uma maior alocação de massa à parte aérea neste estágio de desenvolvimento. Do contrário, as plantas com restrição tanto luminosa quanto nutricional restringiram esta alocação, mantendo uma fração maior de sua massa no hipocótilo subterrâneo.

Num período mais avançado de uso das reservas do hipocótilo (124-145), a baixa disponibilidade luminosa passou a ser o fator promotor da depleção das reservas do hipocótilo e, conseqüentemente, de acordo com Dillenburg *et al.* (2010), do crescimento da parte aérea. Embora a resposta faça sentido do ponto de vista do balanço funcional da planta, deve-se considerar que neste período o hipocótilo já deve estar atuando também como dreno de fotossintatos produzidos pela parte aérea, e o armazenamento de fotossintatos no hipocótilo de plantas deve ser maior sob maior disponibilidade luminosa, fato também relatado por Dillenburg *et al.* 2010. Isto explicaria a degradação de reservas ao menos “aparentemente” menor do hipocótilo e a já visível estabilização em massa deste órgão em plantas sob altas irradiâncias. Sob forte restrição luminosa, a degradação das reservas do hipocótilo não veio acompanhada de um substancial acúmulo de fotossintatos e sua massa decresceu continuamente até o final do período experimental. No entanto, a alocação de massa no hipocótilo ao final deste período experimental já não difere entre os tratamentos. Em *G. superba*, a RMR (razão de massa de raiz) aumentou nas plantas no sol e diminuiu nas plantas sombreadas cerca de 20 dias após a completa expansão das folhas; este aumento em plantas bem

iluminadas estaria condizente tanto com a transferência de reservas das sementes e de fotossintatos para a raiz. Por outro lado, a diminuição da RMR nas plantas sombreadas reflete a transferência destas reservas (da raiz) para a construção da parte aérea (Barberis e Dalling 2008).

Da mesma forma que ocorre no uso das reservas das sementes, onde as plantas na sombra utilizam as reservas da semente para o crescimento da planta por mais tempo do que as plantas em condições luminosas mais favoráveis (Löwe and Dillenburg 2011), o uso das reservas hipocotilares também deve se prolongar em condições de sombra. O menos intenso e provavelmente mais curto uso das reservas acumuladas no hipocótilo (que passa inclusive à condição de dreno) em plantas bem iluminadas reflete a independência da planta em relação às reservas iniciais (da semente) e a presença de outras fontes de energia (fotossíntese) para o crescimento.

As raízes laterais das plantas sob sombra contribuíram significativamente menos para a massa total da planta ao final do período experimental, padrão este que já havia sido revelado desde os 83 dias após a germinação. Esta resposta indica um menor investimento em estruturas de absorção de água e de nutrientes sob restrição luminosa, independente da disponibilidade nutricional. As plantas na sombra também investiram menos em raiz principal do que as plantas sob maiores irradiâncias, mas, para este órgão, também fica evidente um efeito nutricional dentro de cada nível de luz: uma menor disponibilidade nutricional levou a uma maior alocação de massa à raiz principal. Embora a menor alocação de massa para as raízes laterais sob sombra faça sentido do ponto de vista funcional, a resposta nutricional sobre o sistema radicular observado tanto nas plantas de luz quanto nas de sombra favoreceu a porção da raiz (raiz pivotante) menos apta a ampliar a área de absorção (Boot 1989). Quanto à alocação de massa à parte aérea, percebe-se que as plantas sob deficiência nutricional limitaram o

crescimento da parte aérea quando cultivadas com alta irradiância. A limitação nutricional na sombra não induziu a mesma resposta, pois provavelmente a limitação nutricional efetiva para a planta era menor em virtude da limitação de crescimento imposta pela sombra.

Enquanto o aumento na disponibilidade luminosa resultou em um maior acúmulo de massa pelas plantas já a partir dos 83 dias após a semeadura, a maior disponibilidade nutricional teve um efeito menos consistente (só se manifestou em plantas sob alta irradiância) e menos duradouro, sendo significativo apenas no início do desenvolvimento da planta (83 dias após semeadura), quando a parte aérea, tanto em massa quanto em altura, se mostrava pequena e contribuía menos do que o hipocótilo para a massa seca da planta. Löwe e Dillenburger (2011) recentemente relataram que a disponibilidade de nutrientes não afeta o ritmo de consumo das reservas do pinhão e nem o período de tempo durante o qual as plantas dependem destas reservas para acumular massa em seus órgãos. Esta baixa responsividade ao ambiente nutricional foi atribuída pelos autores à suficiência de nutrientes fornecidos pelo próprio pinhão para atender a demanda de crescimento da plântula. Apesar do amido ser o componente de reserva mais abundante nos pinhões, estes também armazenam grandes quantidades de nutrientes, especificamente em cristais globóides do próprio embrião (Panza *et al.* 2002). Por se tratar de uma espécie de sementes grandes (~5-8 g massa fresca; Tompsett 1984) e de lento crescimento (Carvalho 1994), seria de esperar que a demanda inicial da planta por recursos externos, como o de nutrientes, fosse baixa. Raaimakers e Lambers (1996) comparam duas espécies em diferentes estágios de sucessão, *Tapirira obtusa* (pioneira) e *Lecythis corrugata* (climácica), quanto a suas respostas ao suprimento nutricional de fósforo (P) durante a fase de plântula: a primeira aumentou sua biomassa total e a concentração de P nos tecidos, enquanto que a segunda não apresentou maior

crescimento em resposta ao maior nível de P, apenas maior concentração deste elemento nos tecidos. Os autores creditaram a baixa taxa de crescimento e as reservas de P existentes na semente (média das sementes 954mg de massa seca) de *Lecythis corrugata* como os responsáveis pela falta de resposta de crescimento à aplicação de fósforo. Nos desmontes subsequentes, que representam o período de depleção das reservas hipocotilares, não houve mais o efeito da aplicação de nutrientes, apenas o efeito promotor da maior disponibilidade de luz sobre o crescimento das plantas de *A. angustifolia*, à semelhança do relatado por Dillenburg *et al.* (2010) e Löwe e Dillenburg (2011). É provável que, atingido um maior tamanho, as plantas passassem a responder ao acréscimo de nutrientes no meio de cultivo.

Durante o processo de germinação e crescimento inicial da araucária, a transferência de reservas da semente à plântula ocorre de forma contínua e independente da disponibilidade de recursos externos à semente (Löwe e Dillenburg 2011). Neste processo o hipocótilo armazena inicialmente uma fração considerável destas reservas e a intensidade deste armazenamento também ocorrerá de forma independente do ambiente externo onde a plântula se desenvolve. Mais tarde, porém, a disponibilidade externa de luz e de nutrientes condicionará a redistribuição destas reservas hipocotilares e os padrões de alocação de massa dentro da plântula em crescimento. As avaliações finais indicam que, à medida que as plantas crescem e o hipocótilo diminui sua função como fonte de recursos para este crescimento, as plantas respondem mais fortemente à disponibilidade externa de recursos, tanto em termos de crescimento quanto em termos de alocação de massa. Assim, tanto as reservas do pinhão quanto do hipocótilo tamponam até certo estágio as variações de crescimento e de alocação de massa que seriam esperadas pelas condições contrastantes de disponibilidade de recursos.

Segundo Westoby *et al.* (1996), o melhor desempenho das espécies de sementes grandes em tolerar ambientes adversos se deve, em uma ampla gama de situações, ao efeito de reserva. Este efeito requereria, em espécies de sementes grandes como as da araucária, que porções dos recursos estocados na semente fossem de alguma forma não comprometidos durante a degradação, podendo ser utilizados para sustentar a respiração sob deficiência de carbono. O hipocótilo da araucária parece ter um papel importante neste mecanismo ao atuar como órgão secundário de armazenamento das reservas da semente, permitindo o não comprometimento imediato das reservas da semente com estruturas de crescimento sob condições desfavoráveis. Segundo estes autores, quando o efeito de reserva é atuante, os benefícios oriundos das sementes grandes são temporários, e, após a completa degradação das reservas da semente (e no presente caso, também do hipocótilo), as vantagens não seriam mais visíveis. Assim, as sementes grandes só seriam vantajosas se houvesse alguma probabilidade das condições ambientais se tornarem mais favoráveis.

A araucária tanto se regenera no sub-bosque florestal quanto coloniza e se estabelece em campos abertos adjacentes às florestas, tendo se mostrado uma espécie plástica no que diz respeito à disponibilidade luminosa (Duarte e Dillenburg, 2000; Duarte *et al.*, 2002; Franco e Dillenburg, 2007). Os resultados do presente trabalho nos permitem tentar descrever o provável comportamento das plântulas da espécie em condições naturais. Este resultados indicam que, em ambos os cenários, contrastantes nos regimes de irradiância, o hipocótilo armazenará uma fração majoritária das reservas da semente após a germinação e as plantas não diferirão inicialmente em termos de massa. No entanto, a maior disponibilidade luminosa às partes aéreas emergidas irá, inevitavelmente, acarretar um maior crescimento, tanto da parte aérea quanto das raízes, das plantas no campo aberto do que naquelas que crescem no sub-bosque florestal.

Aquelas plantas que tiverem adequado suprimento nutricional consumirão mais intensamente as reservas estocadas no hipocótilo, alocando estas reservas principalmente para o crescimento da parte aérea. Esta resposta é esperada para as plantas no campo aberto, que, em função da maior luminosidade, têm maior crescimento das raízes laterais, desde que o acesso das mesmas aos nutrientes no solo não seja limitado por fatores edáficos ou por competição. No sub-bosque florestal, as plantas que encontrarem manchas mais férteis de solo também deverão exibir esta resposta, apesar do crescimento mais limitado das suas raízes laterais. Aquelas que tiverem limitado acesso a nutrientes restringirão o crescimento da parte aérea e limitarão o uso das reservas do hipocótilo. Em um estágio final de vida das plântulas, a manutenção das limitações de luz (cenário onde nenhuma clareira é aberta sobre as plântulas do sub-bosque florestal), o uso das reservas hipocotilares será estimulado e, eventualmente, o chamado efeito reserva das sementes grandes não conferirá mais vantagens a estas plantas que crescem sob condições adversas de luz. Uma questão fundamental e que precisa ser experimentalmente abordada diz respeito ao que garantirá a sobrevivência de mais longo prazo destas plântulas. Cabe ressaltar que o crescimento e a sobrevivência tanto das plântulas de sub-bosque quanto das de campo aberto também dependerá da ação de herbívoros. Sugere-se que, enquanto houver reservas armazenadas no hipocótilo e/ou na semente, estas poderão ser desviadas para a reposição de tecidos, embora, conforme relatado no capítulo anterior, a estocagem destas reservas no hipocótilo (ao invés da permanência prolongada nas sementes) reduz os riscos de perdas das mesmas por ação de predadores de pinhões (Dillenburg *et al.* 2010), os quais atuam com maior intensidade no ambiente florestal do que no campo aberto (Iob e Vieira 2008; Brum *et al.* 2010). A importância destas reservas na

tolerância à herbivoria será preliminarmente abordada no próximo capítulo e deverá ser futuramente investigada em maior profundidade.

Referências

- Barberis, I.M.; Dalling, J.W. (2008) The effect of light, seed size and biomass removal on cotyledon reserve use and root mass allocation in *Gustavia superba* seedlings. *Journal of Tropical Ecology* 24: 607-617.
- Bonfil, C. (1998). The effects of seed size, cotyledon reserves, and herbivory on seedling survival and growth in *Quercus rugosa* and *Quercus laurina* (Fagaceae). *American Journal of Botany* 82:79-87.
- Boot, R.G.A. (1989) The significance of size and morphology of root systems for nutrient acquisition and competition. In: Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants. (Eds. H. Lambers, M.L. Cambridge, H. Konings and T.L. Ponds. Pp. 299-311. SPB Academic Publishing.
- Brum, F.T.; Duarte, L.S.; Hartz, S.M. (2010) Seed removal patterns by vertebrate in different successional stages of *Araucaria* forest advancing over southern Brazilian grasslands. *Community Ecology* 11:35-40.
- Burrows, G.E.; Boag, TS, Stockey RA (1992) A morphological investigation of the unusual cryptogeal germination strategy of bunya pine (*Araucaria bidwillii*) – an Australian rainforest conifer. *International Journal of Plant Sciences* **153**, 503-512.
- Carvalho, P.E.R. (1994) Espécies florestais brasileiras. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Embrapa/CNPQ: Brasília, DF.
- Castro-Diez, P.; Puyravaud, J.P.; Cornelissen, J.H.C.; Villar-Salvador, P. Stem anatomy and relative growth rate in seedlings of a wide range of woody plant species and types. *Oecologia* 116: 57-66.

- Chapin, F.S. III; Bloom, A.J.; Field, C.B.; Waring, R.H. (1987) Plant responses to multiple environmental factors. *Bioscience* 37 (1): 49-57.
- Duarte, L.S.; Dillenburg, L.R. (2000) Ecophysiological responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seedlings to different irradiance levels. *Australian Journal of Botany* 48: 531-537.
- Duarte, L.S.; Dillenburg, L.R.; Rosa, L.M.R. (2002) Assessing the role of light availability in the regeneration of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Australian Journal of Botany* 50: 741-751.
- Dillenburg, L.R.; Rosa, L. M. G.; Mósena, M. (2010) Hypocotyl of seedlings of the large-seeded species *Araucaria angustifolia*: an important underground sink of the seed reserves. *Trees* 24 (4): 705-711.
- Ferreira, A.G.; Handro, W. (1979) Aspects of seed germination in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Revista Brasileira de Botânica* 2: 7-13.
- Fonseca, M.B.; França, M.G.C.; Zonta, E.; Giorni, V. (2010) Crescimento inicial de *Dimorphandra wilsonii* (Fabaceae – Caesalpinioideae) em diferentes condições de fertilidade em solo de cerrado. *Acta Botanica Brasílica* 24 (2): 322-327.
- Franco, A.M.S.; Dillenburg, L.R. (2007) Ajustes morfológicos e fisiológicos em plantas de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em resposta ao sombreamento. *Hoehnea* 34: 135-144.
- Haines, R.J. (1983) Embryo development and anatomy in *Araucaria* Juss. *Australian Journal of Botany* 31:125-140.
- Grechi, I.; Vivin, P.; Hilbert, G.; Milin, S.; Robert, T.; Gaudillére, J.P. (2007) Effect of light and nitrogen supply on internal C:N balance and control of root-to-shoot biomass allocation in grapevine. *Environmental and Experimental Botany* 59:139-149.

- Ichie, T.; Ninomiya, I.; Ogino, K. (2001) Utilization of seed reserves during germination and early seedling growth by *Dryobalanops lanceolata* (Dipterocarpaceae). *Journal of Tropical Ecology* 17: 371-378.
- Iob, G.; Vieira, E.M. (2008) Seed predation of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) in the Brazilian Araucaria Forest: influence of deposition site and comparative role of small and 'large' mammals. *Plant Ecology* 198: 185-196.
- Kabeya, D.; Sakai, S. (2003) The role of roots and cotyledons as storage organs in early stages of establishment in *Quercus crispula*: a quantitative analysis of the nonstructural carbohydrate in cotyledons and roots. *Annals of Botany* 92: 537-545.
- Löwe, T.R.; Dillenburg, L. R. (2011) Changes in light and nutrient availabilities do not alter the duration of use of seed reserves in *Araucaria angustifolia* seedlings. *Australian Journal of Botany* 59:32-37.
- Leishman, M.R., Wright, I.J., Moles, A.T. & Westoby, M. The evolutionary ecology of seed size. In: *Seeds – Ecology of Regeneration in Plant Communities* (ed. M. Fenner). CAB International, Wallingford, 2000. p.31–57.
- Myers, J.A.; Kitajima, K. (2007) Carbohydrate storage enhances seedling shade and stress tolerance in a neotropical forest. *Journal of Ecology* 95: 383-395.
- Nakazono, E.M.; Costa, M.C.; Futatsugi, K.; Paulilo, M.T.S. (2001) Crescimento inicial de *Euterpe edulis* Mart. em diferentes regimes de luz. *Revista Brasileira de Botânica* 24 (2): 173-179.
- Panza, V.; Láinez, V.; Maroder, H.; Prego, I.; Maldonado, S. (2002). Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140: 273-281.

- Raaimakers, D.; Lambers, H. Response to phosphorus supply of tropical tree seedlings: a comparison between a pioneer species *Tapirira obtusa* and a climax species *Lecythis corrugata*. *New Phytologist* 132: 97-102, 1996.
- Reich, P.B; Tjoelker, M.G.; Walters, M.B.; Vanderklein, D.W.; Buschena, C. (1998) Close association of RGR, leaf and root morphology, seed mass and shade tolerance in seedlings of nine boreal tree species grown in high and low light. *Functional Ecology* 12: 327-338.
- Tompsett, P.B. (1984) Desiccation studies in relation to storage of *Araucaria* seed. *The Annals of Applied Biology* 105: 581-586.
- Taiz, L. Zeiger, E. (2004) *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed.
- Westoby, M.; Leishman, M; Lord. J. (1996) Comparative ecology of seed size and dispersal. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 351: 1309-1318.

Capítulo 3

A importância do tamanho da semente no crescimento inicial, sobrevivência e substituição de tecidos pós-dano em plantas de *Araucaria angustifolia* cultivadas sob alta e baixa irradiância

TATIANA R. LÖWE^A AND LÚCIA R. DILLENBURG^{A,B}

^A *Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil*

^B *Corresponding author (lucia.dillenburg@ufrgs.br)*

Resumo

O tamanho das sementes é importante na regeneração de espécies arbóreas florestais sendo uma característica de espécies tolerantes a sombra. A espécie de estudo, *Araucaria angustifolia* é considerada tolerante a sombra durante o estágio inicial de vida, e exibe variações intraespecíficas no tamanho da massa dos seus pinhões. Nesse sentido, investigamos o efeito do tamanho da semente no crescimento e sobrevivência inicial de plantas de *A. angustifolia* submetidas a distintas disponibilidades de luz. As avaliações consistiram de medição mensais (altura, comprimento total e sobrevivência das plantas) e desmontes periódicos (aos 44, 82, 152 e 342 dias após a semeadura) para avaliar o acúmulo em massa durante o período de cultivo. Em um período inicial, as plantas oriundas de sementes grandes tiveram maior crescimento do que plantas de sementes pequenas, tanto no sol quanto na sombra; enquanto que a sobrevivência não foi afetada pelo tamanho das sementes, porém foi maior nas plantas submetidas as mais altas irradiâncias. As plantas de sementes grandes tiveram maiores quantidades de reservas armazenadas em seus hipocótilos (aos 82 dias), assim como um maior *pool* de carboidratos não-estruturais neste período, independentemente da condição luminosa. Após cinco meses da semeadura foi feita a remoção da parte aérea (simulando herbivoria) em metade das plantas ainda vivas, então, efetuaram-se medidas mensais de sobrevivência da planta após o dano, e o crescimento foi avaliado 190 dias após o corte. A remoção da parte aérea provocou a grande mortalidade das plantas na sombra e o crescimento em massa após o dano não foi afetado pelo tamanho das sementes. Os mecanismos envolvidos na tolerância à sombra e ao dano serão discutidos.

Palavras-chave: variações intraespecíficas – irradiâncias – herbivoria – sementes grandes.

Introdução

O tamanho da semente de uma espécie representa a quantidade de investimento materno em uma prole individual, ou o quanto o embrião estará provido de reservas para iniciar a sua jornada de vida. O tamanho da semente representa um *trade-off* entre a produção de maior quantidade de sementes pequenas, ou uma menor quantidade de sementes grandes, para uma mesma quantidade de recurso alocado para a reprodução (Leishman *et al.* 2000). Espécies de sementes grandes teriam maior tolerância a condições adversas, como competição, sombra densa, desfoliação, baixa disponibilidade de nutrientes no solo, enterramento e ambientes secos. Entretanto, o único padrão claro que se observa no campo é a tendência de espécies que se estabelecem na sombra exibirem sementes grandes (Westoby *et al.* 1996).

A massa de sementes é um dos componentes da tolerância à sombra de espécies arbóreas florestais (Poorter e Rose, 2005). Espécies tolerantes à sombra tendem a possuir sementes grandes, cotilédones de armazenamento e lenta taxa de crescimento relativo via baixa área foliar específica e baixa razão de massa foliar. Por outro lado, as espécies dependentes da luz teriam sementes pequenas, cotilédones fotossintéticos e rápida taxa de crescimento relativo via alta área foliar e alta razão de massa foliar (Kitajima 2002). A relação entre a taxa de crescimento relativo e a massa das sementes é fortemente dependente da luz. As maiores mudanças na relação entre os atributos taxa de crescimento relativo, LAR e área foliar específica e a massa de sementes ocorrem nos menores intervalos de luz, entre 0 e 10-30% da irradiância. Em baixas irradiâncias, espécies oriundas de sementes pequenas exibem taxas de crescimento relativo menores, similares ou maiores do que espécies de sementes grandes. Contudo, em altas irradiâncias, as espécies oriundas de sementes pequenas têm sempre maior taxa de crescimento relativo do que as espécies oriundas de sementes grandes (Poorter e Rose

2005). Assim, em grandes clareiras, a vantagem inicial (tamanho) das espécies de sementes grandes poderia ser ultrapassada pelo rápido crescimento das espécies oriundas de sementes pequenas (Boot 1996).

Um outro aspecto relevante da importância do tamanho da semente na tolerância ao sombreamento é que espécies de sementes grandes sobrevivem mais na sombra densa no estágio cotiledonar do que no estágio foliar. No estágio cotiledonar ainda estão sendo degradadas as reservas da semente, e a sobrevivência na sombra é diretamente causada pelas reservas extras que não foram comprometidas em crescimento (Saverimuttu e Westoby 1996).

A maior parte dos trabalhos que correlacionam o tamanho das sementes com a tolerância à sombra abordam variações interespecíficas na massa das sementes (Saverimuttu e Westoby 1996; Hewitt 1998; Osunkoya *et al.* 1994; Poorter e Rose 2005; Baraloto e Forget 2007). Trabalhos que relacionaram a massa de sementes com a tolerância à sombra dentro de uma mesma espécie são menos frequentes (Ke and Werger 1999; Khan 2004; Parker *et al.* 2006; Yanlong *et al.* 2007; Du and Huang 2008) e demonstram que plantas oriundas de sementes grandes teriam melhor desempenho do que plantas oriundas de sementes pequenas na germinação, sobrevivência e crescimento das plantas quando na sombra (Du and Huang 2005; Khan 2004; Yanlong *et al.* 2007).

Em florestas temperadas norte-americanas tem-se observado que a relação entre a maior massa das sementes e a tolerância à sombra se expressa apenas em angiospermas (Hewitt 1998). Os poucos trabalhos com gimnospermas que avaliaram a relação entre variação na massa de sementes e a tolerância à sombra estão mais focados na etapa de germinação das sementes (Parker *et al.* 2006; Mamo *et al.* 2006).

A gimnosperma deste estudo, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Ktze (Araucariaceae), possui sementes grandes (~5-8g de peso fresco; Tompsett 1984), os

chamados pinhões. Estes são importante fonte alimentar para vários animais associados à floresta de ocorrência da espécie (Floresta Ombrófila Mista), alguns dos quais podem atuar como predadores e dispersores de sementes (Iob e Vieira 2008). As sementes da espécie exibem variação em massa, sendo o efeito materno o principal componente desta variação (Mantovani *et al.* 2004). O megagametófito, de origem materna, responde pela maior proporção da massa fresca da semente (~70%; Mantovani *et al.* 2004). Estas diferenças em tamanho das sementes da espécie foram objeto de um trabalho em viveiro (Spoltz 1967), que atestou a superioridade em altura de plantas originadas de sementes maiores.

A espécie de estudo possui várias características de uma espécie tolerante à sombra, como alta razão de área foliar e alto comprimento caulinar específico (Franco e Dillenburg 2007), a capacidade de crescer adequadamente em níveis intermediários de luz (Duarte e Dillenburg 2000; Inoue e Torres 1980), e de sobreviver sob sombreamento intenso (Franco e Dillenburg 2007; Duarte e Dillenburg 2000). Por outro lado, a espécie atua como planta nucleadora na transição floresta-campo (Duarte *et al.* 2006), onde estaria sujeita a elevadas irradiâncias. Levando em consideração a capacidade da espécie de habitar ambientes contrastantes quanto ao fator luz e a sua visível variação na massa de sementes, estudos avaliando a influência do tamanho das sementes de *A. angustifolia* em ambientes contrastantes quanto ao fator luz nos informarão qual o papel do tamanho das sementes no sucesso de estabelecimento e colonização da espécie nestes ambientes.

Este trabalho tem por objetivo caracterizar a importância do tamanho das sementes para o crescimento inicial e a sobrevivência de plântulas da espécie em condições luminosas contrastantes e os efeitos interativos do tamanho da semente e das condições luminosas sobre a capacidade de reparo e sobrevivência quando danos são

infligidos à parte aérea. Baseado neste objetivo, as seguintes hipóteses foram formuladas: 1) sementes grandes geram plantas com maior crescimento e porcentagem de sobrevivência do que sementes pequenas, sendo estes efeitos maiores na sombra do que na luz; 2) a vantagem conferida pelas sementes grandes permanece mesmo após a degradação das reservas do pinhão; 3) plantas oriundas de sementes grandes possuem maior acúmulo inicial de biomassa no hipocótilo do que plântulas oriundas de sementes pequenas, independente do regime de irradiância; 4) plantas oriundas de sementes grandes armazenam maior quantidade de carboidratos não-estruturais do que as oriundas de sementes pequenas, sendo este armazenamento mais pronunciado no hipocótilo; e 5) as plantas oriundas de sementes grandes são mais tolerantes a danos à parte aérea (capacidade de substituição dos tecidos e maior sobrevivência após o dano) do que plantas oriundas de sementes pequenas, sendo esta maior tolerância mais pronunciada em plantas na sombra do que em plantas no sol.

Materiais e métodos

MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES GERAIS DE CULTIVO

Os pinhões foram comprados de catadores em São Francisco de Paula (RS) no dia 27 de maio de 2009, acondicionados em embalagens plásticas e então armazenados em refrigerador a 4 °C durante 39 dias.

No dia 6 de julho de 2009, procederam-se algumas manipulações para o início do experimento. Nesse dia, as sementes foram selecionadas com base no teste d'água, retirando-se as sobrenadantes. Posteriormente, estas foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 20 minutos e enxaguadas com água destilada. Após esta etapa, foi realizada uma seleção manual, onde as sementes foram separadas em dois grupos que diferiam visualmente em tamanho (sementes grandes e pequenas). As

sementes foram então escarificadas, removendo-se parcialmente os integumentos, para acelerar e uniformizar a germinação (Ferreira e Handro 1979). A massa fresca das sementes nesse momento foi aferida, o que foi utilizado como critério para a divisão dos dois grupos de tamanho de sementes: grandes (massa fresca ≥ 8 g) e pequenas (massa fresca ≤ 6 g).

Após a classificação das sementes, estas foram colocadas para germinar em bandejas plásticas contendo vermiculita úmida no dia 7 de julho de 2009 (Dia 0 do experimento). Após 13 dias de cultivo nas bandejas, as plantas foram transplantadas para as condições de cultivo em períodos de tempo diferentes, quando as radículas tinham aproximadamente 2-3 cm, períodos estes que foram utilizados como critério de bloqueamento.

O experimento foi conduzido em canteiros do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da UFRGS (30°01'59'S e 51°13'48'W), no período de 20 de julho de 2009 a 15 de junho de 2010. Garrafas *PET* de 2 L foram utilizadas como recipientes de cultivo. O substrato consistiu de areia média lavada, e o volume de areia inserido em cada vaso foi de 1,5 L, mantido em boas condições hídricas, através de regas semanais nas plantas de sol, e do monitoramento das plantas de sombra, estas necessitavam de menores quantidades de água devido a menor evaporação do substrato (regas aproximadas entre duas e três semanas).

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

EFEITO DO TAMANHO DA SEMENTE NAS RESPOSTAS À DISPONIBILIDADE DE LUZ

A fim de testarmos e compararmos a influência do tamanho das sementes na capacidade das plantas de sobreviver e crescer sob altas e baixas irradiâncias, as mesmas foram distribuídas em quatro tratamentos resultantes das possíveis combinações de dois tamanhos de sementes e dois ambientes de luz, sendo alocadas 60 plantas para cada tratamento. Segue a relação nominal dos quatro tratamentos utilizados: 'IT' (alta irradiância e sementes grandes); 'It' (alta irradiância e sementes pequenas); 'iT' (baixa irradiância e sementes grandes); e 'it' (baixa irradiância e sementes pequenas).

As plantas na sombra (baixa irradiância) foram mantidas em gaiolas fechadas com sombrite e localizadas sob influência do sombreamento de uma mata próxima. As plantas no sol (alta irradiância) cresceram sob telado de sombrite, porém de baixo nível de sombreamento. O tempo de duração do experimento foi de 342 dias após a semeadura. Levando-se em conta que as plantas foram transplantadas a partir dos 13 dias após a semeadura, as mesmas foram submetidas às condições experimentais por 329 dias. Ao longo de todo o período experimental foram realizados quatro desmontes para avaliações destrutivas: 44, 82, 152 e 342 dias após a semeadura. Em cada um, foram utilizadas 10 das 60 plantas disponíveis dentro de cada tratamento. Metade das plantas restantes (de 23 a 28 por tratamento) foi utilizada, já desde o terceiro desmonte, para introduzir um terceiro fator ao estudo.

Medições de irradiância foram realizadas para quantificar o nível de luz ao qual as plântulas estavam submetidas, assim como o nível máximo de irradiância no local de estudo, fazendo uso de um sensor de quanta de luz LI-190S-1 de um porômetro de estado estacionário (modelo LI-1600, Licor Inc., Nebraska, EUA). Essas medições foram realizadas em dois diferentes dias, em três horários distintos (~10; ~12 e ~15

horas) a cada dia, nos meses de agosto e dezembro de 2009. Os valores médios diários da irradiância plena (média do dia e média dos horários), medidos ao ar livre, sem a presença de nuvens e sem a influência do sombrite, foram de 1.163 e 1.705 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nos meses de agosto e dezembro, respectivamente. Devido ao sombreamento imposto por árvores próximas às plantas no sol, estas foram submetidas a reduções luminosas que foram de ~40% (das 9 as 14 horas) até ~80% (das 15 as 18 horas) da radiação total, com valores mínimos e máximos registrados de 177 e 1.097 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. As plantas na sombra foram submetidas a reduções luminosas de ~96%, com valores mínimos e máximos de irradiância de 2 a 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente.

Durante dois intervalos de tempo no ano de 2009 (de 28 de outubro a 2 de novembro; e de 27 de novembro a 6 de dezembro) foram registradas, a cada hora, a temperatura e umidade nas duas condições de cultivo estudadas, usando-se coletores de temperatura e umidade do ar (Logbox RHT, Novus, Rio Grande do Sul, Brasil). As plantas no sol tiveram temperaturas mais altas (+ 1,8 a 2,1 °C) e umidades relativas mais baixas (- 7,4 a 9,5%) do que as plantas na sombra. A média dos dados de temperatura fornecidos por uma estação meteorológica próxima (INMET- 8º Distrito), durante o período de estudo, são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados de temperatura (T) para a cidade de Porto Alegre, RS, durante o período experimental (2009-2010). Dados do 8º Distrito de Meteorologia, Porto Alegre, RS.

Mês/ano	Média mensal T (°C)	Média mensal T máxima (°C)	Média mensal T mínima (°C)
Julho 2009	12,0	17,9	8,2
Agosto 2009	16,7	23,1	12
Setembro 2009	17,1	22,0	14,0
Outubro 2009	18,9	25,1	14,5
Novembro 2009	23,2	28,0	19,7
Dezembro 2009	23,8	29,0	19,9
Janeiro 2010	25,1	30,3	21,2
Fevereiro 2010	26,4	32,3	22,4
Março 2010	23,7	29,0	19,9
Abril 2010	20,2	26,0	15,9
Mai 2010	17,3	21,4	14,5
Junho 2010	15,1	20,5	11,1

EFEITO DO TAMANHO DA SEMENTE E DA DISPONIBILIDADE DE LUZ NA TOLERÂNCIA AO DANO À PARTE AÉREA

Para avaliarmos as vantagens de uma semente grande no crescimento e sobrevivência de plantas que sofreram danos na parte aérea em dois ambientes constratantes de luz, introduziu-se um terceiro fator (dano à parte aérea) ao experimento anterior. Após aproximadamente cinco meses (152 dias após a semeadura) do início do experimento anterior, as plantas sobreviventes em cada tratamento (28 'IT', 27 'It', 23 'iT' e 25 'it') foram divididas em dois grupos: aproximadamente metade foi danificada pela remoção da parte aérea e a outra metade (controle) permaneceu intacta. Nas danificadas, foi feita a remoção de ~90% do comprimento total da parte aérea utilizando uma tesoura, restando apenas um pedaço de cerca de 2 cm, que será aqui chamado de toco. Esta remoção da parte aérea adicionou mais um fator de variação em nosso experimento, resultando em oito tratamentos: 'IT', 'It', 'iT', 'it' / com dano e 'IT', 'It', 'iT', 'it' / controle. A sobrevivência das plantas em resposta a esse novo fator foi monitorada e,

após 190 dias do corte das plantas (342 dias após a semeadura), o experimento foi encerrado e a biomassa acumulada nas plantas nos diferentes tratamentos foi avaliada.

PARÂMETROS VEGETAIS AVALIADOS

EFEITO DO TAMANHO DA SEMENTE NAS RESPOSTAS Á DISPONIBILIDADE DE LUZ

Avaliações mensais não destrutivas

Altura das plantas: avaliada 76 dias após a semeadura, e, a partir de então, através de medições mensais. Quando emergiram os ramos laterais, foi realizada também a medição do **comprimento total da planta** (altura/ou comprimento vertical + comprimento de todos os ramos laterais).

Sobrevivência das plantas: avaliada a cada mês pela observação visual das mesmas.

Avaliações destrutivas (desmontes): exceto pelas medidas de área foliar, número de folhas, área foliar específica, razão de massa foliar, razão de área foliar e análise de carboidratos não-estruturais, que possuem um menor número de repetições, as demais variáveis representam todas as plantas sobreviventes (~10 até o terceiro desmonte; e, no quarto desmonte, 12 'IT'; 14 'It'; 8 'iT' e 7 'it') até o final do experimento.

Biomassas: aferidas após a secagem do material em estufa a 60 °C. Foram avaliadas separadamente as massas secas de raiz, hipocótilo, parte aérea (caule + folhas) e folhas. Foram avaliadas também as massas secas dos pinhões ('casca' + megagametófito)..

Taxas de crescimento relativo (TCR): calculadas com base nas diferenças entre as massas secas totais entre desmontes consecutivos, para os quatro desmontes realizados, totalizando 3 taxas. Abaixo segue um exemplo da taxa de crescimento relativo entre o segundo e o primeiro desmonte, para observação da fórmula utilizada:

$$TCR = (massa\ seca\ desmonte\ 2 - massa\ seca\ do\ desmonte\ 1) / (número\ de\ dias\ entre\ os\ dois\ desmontes * massa\ seca\ do\ desmonte\ 1).$$

Área foliar (AF): foi realizada a medição da área foliar total da planta utilizando um medidor automático de área foliar (LI-3100, Licor Inc.). O número de repetições para esta variável foi de 5 plantas.

Área foliar específica (AFE): 10 folhas que se localizavam na porção mediana do caule foram retiradas de cada planta, nessa ocasião foi medida a área foliar (cm²) e posteriormente o peso seco (60°C). A AFE foi calculada como a razão entre a área foliar e a massa seca da folha.

Número de folhas (NF): foi realizada a contagem do número total de folhas da planta no mesmo momento em que se realizava a medição de área foliar. O número de repetições para esta variável foi de 5 plantas.

Razão de massa foliar (RMF): razão entre a massa seca das folhas e a massa seca total. O número de repetições para esta variável foi de 5 plantas.

Razão raiz/parte aérea (R/PA): razão entre a massa seca de raiz (incluindo raiz principal, raízes laterais e hipocótilo) e a massa seca da parte aérea.

Razão de área foliar (RAF): razão entre a área foliar total das plantas e a massa seca total. O número de repetições para esta variável foi de 5 plantas.

Análise de carboidratos não-estruturais totais (CNE): para os açúcares solúveis foi utilizada a extração em etanol 80% a 75 °C, a partir de 10mg de massa seca de tecido vegetal. As quantificações seguiram o método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956). O resíduo (pellet) dos açúcares foi utilizado para extração e quantificação de amido (fração não solúvel dos CNE). A extração se deu em ácido perclórico 52% e as quantificações seguiram o método por reação com antrona (Mccready *et al.* 1950). A **concentração de CNE** foi considerada a soma entre o teor de açúcar e o teor de amido. O **pool de CNE** representa produto da concentração dos mesmos e a massa seca do órgão. O número de repetições para esta variável foi de ~5 plantas.

EFEITO DO TAMANHO DA SEMENTE E DA DISPONIBILIDADE DE LUZ NA TOLERÂNCIA AO DANO À PARTE AÉREA

Avaliações mensais não destrutivas

Sobrevivência da planta: medições mensais de sobrevivência da planta após a remoção da parte aérea pela observação visual das mesmas.

Avaliações destrutivas (desmontes):

Devido à grande mortalidade das plantas em condições sombreadas após a remoção da parte aérea, as comparações de biomassa entre as plantas controle e as danificadas foi apenas possível nas plantas no sol.

Biomassas: foram aferidas após a secagem do material em estufa a 60°C, as massas secas subterrânea (raiz principal, laterais e hipocótilo), massa da parte aérea (composta do rebrote e toco, no caso das plantas com dano) e massa total da planta.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Fizeram-se necessárias 240 plantas (unidades amostrais) para a execução dos dois experimentos.

Experimento 1: efeito do tamanho da semente nas respostas à disponibilidade de luz

Nos três primeiros desmontes (44; 82 e 152 dias após a semeadura) foram coletadas 10 plantas de cada tratamento, sendo necessárias então 40 plantas por desmonte, fizeram-se necessárias, portanto 120 plantas para os três desmontes. O último desmonte deste experimento (aos 342 dias após a semeadura) foi realizado em todas as plantas sobreviventes de cada tratamento (12 'IT'; 14 'It'; 8 'iT' e 7 'it'). As porcentagens de sobrevivência foram avaliadas com base em uma média de 17 plantas em cada tratamento.

A perda de plantas no decorrer do experimento e o conseqüente número desigual de repetições por tratamento impediram o uso do delineamento em blocos casualizados no último desmonte. Assim, optou-se pela utilização do delineamento em blocos casualizados apenas para os três primeiros desmontes. Portanto, o último desmonte, assim como os dados de altura e comprimento total de plantas, que também oscilavam em número de plantas no decorrer do período de cultivo, foram tratados como um delineamento completamente casualizado.

Foi realizada ANOVA fatorial, independentemente do delineamento utilizado, para as comparações dos fatores luz e tamanho das sementes. Os parâmetros que apresentaram significância pelo teste F a 5%, foram comparados pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). O programa Statistix 8 (Analytical Software) foi utilizado em todas as análises. Os dados de sobrevivência, por se tratarem apenas de uma estimativa, não foram comparados estatisticamente.

Experimento 2: Efeito do tamanho da semente e da disponibilidade de luz na tolerância ao dano à parte aérea.

Logo após o terceiro desmonte, foi feita a remoção da parte aérea de aproximadamente metade das plantas ainda vivas, em todos os quatro tratamentos, o que resultou em uma média de 12 plantas por tratamento.

Devido à perda quase total das plantas estabelecidas na sombra após a simulação de herbivoria, o fator luz não foi considerado para as avaliações destrutivas, apenas o tamanho das sementes. Neste caso foi realizada a ANOVA fatorial (luz x dano à parte aérea) em todas as plantas sobreviventes [T Controle (12); T dano (4); t controle (14) e t dano (9)]. Os dados de sobrevivência, por se tratarem apenas de uma estimativa não foram comparados estatisticamente, mas são relatados para os oito tratamentos.

Resultados

EFEITO DO TAMANHO DA SEMENTE NAS RESPOSTAS À DISPONIBILIDADE DE LUZ

Altura e comprimento total das plantas

A primeira medida de altura (aos 76 dias após a semeadura) já evidenciou diferenças entre os tratamentos, onde foi significativo o efeito positivo da maior disponibilidade luminosa no crescimento vertical das plantas. Na medida seguinte (108 dias), o crescimento respondeu positivamente aos efeitos da alta irradiância e da maior massa do pinhão. Na quase totalidade restante das medidas de altura (141 dias em diante), somente se verificaram diferenças significativas entre os dois tamanhos de sementes avaliados, onde fica evidente a maior resposta em crescimento da planta oriunda de semente grande (Figura 1).

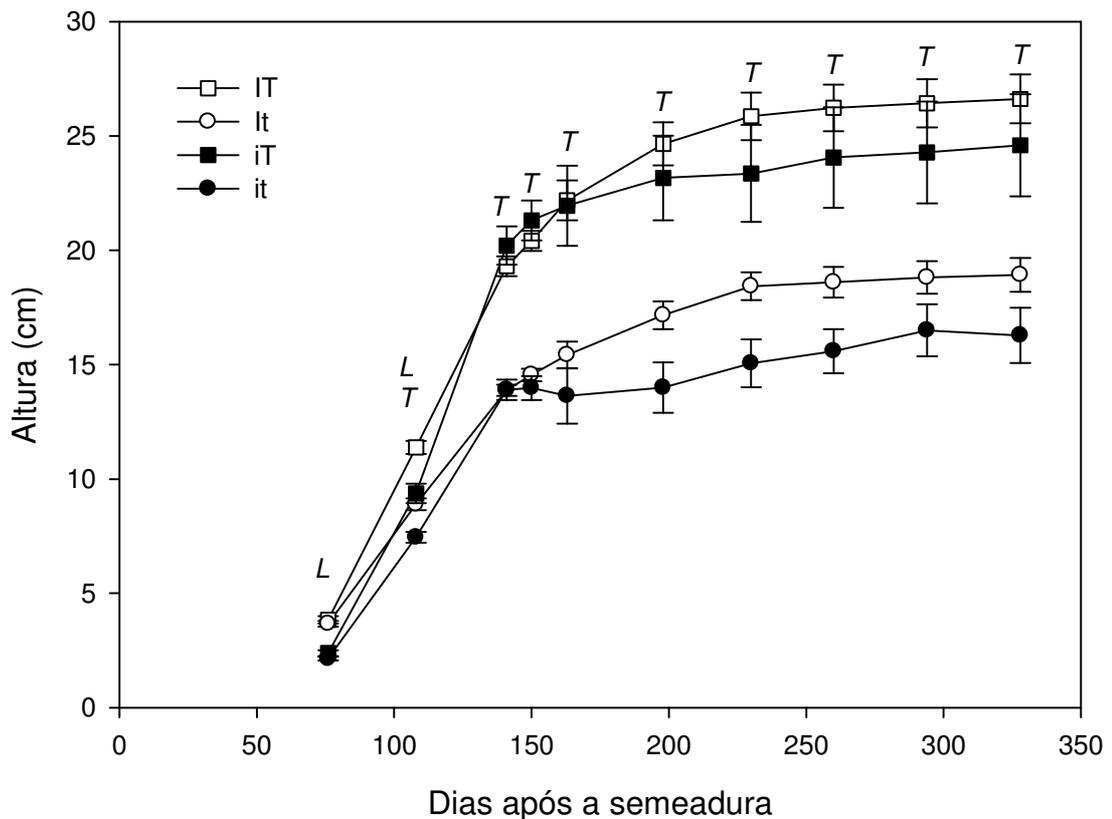


Figura 1. Altura de plantas de *Araucaria angustifolia* nos quatro diferentes tratamentos avaliados. As barras verticais representam o erro padrão. As letras *L*, *T* e *L*T* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator tamanho (*T*) e da interação entre ambos (*L*T*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*T*. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos.

Os ramos laterais das plantas emergiram cerca de 200 dias após a semeadura, nos tratamentos ‘IT’, ‘It’ e ‘iT’, enquanto que as plantas oriundas de sementes pequenas e cultivadas na sombra (‘it’) não exibiram ramos laterais até o término do experimento. O comprimento total das plantas após estes 200 dias exibiu um efeito do tamanho da semente e do ambiente de luz, sendo que as plantas oriundas das maiores sementes tiveram maior comprimento total do que as oriundas de sementes pequenas, e as plantas

bem iluminadas tiveram maior comprimento total que as de sombra. Cabe ressaltar que as plantas oriundas de sementes grandes quando estabelecidas na sombra atingiram o mesmo comprimento total de ramos ao final do experimento que as plantas oriundas de sementes menores e estabelecidas na maior disponibilidade luminosa (Figura 2).

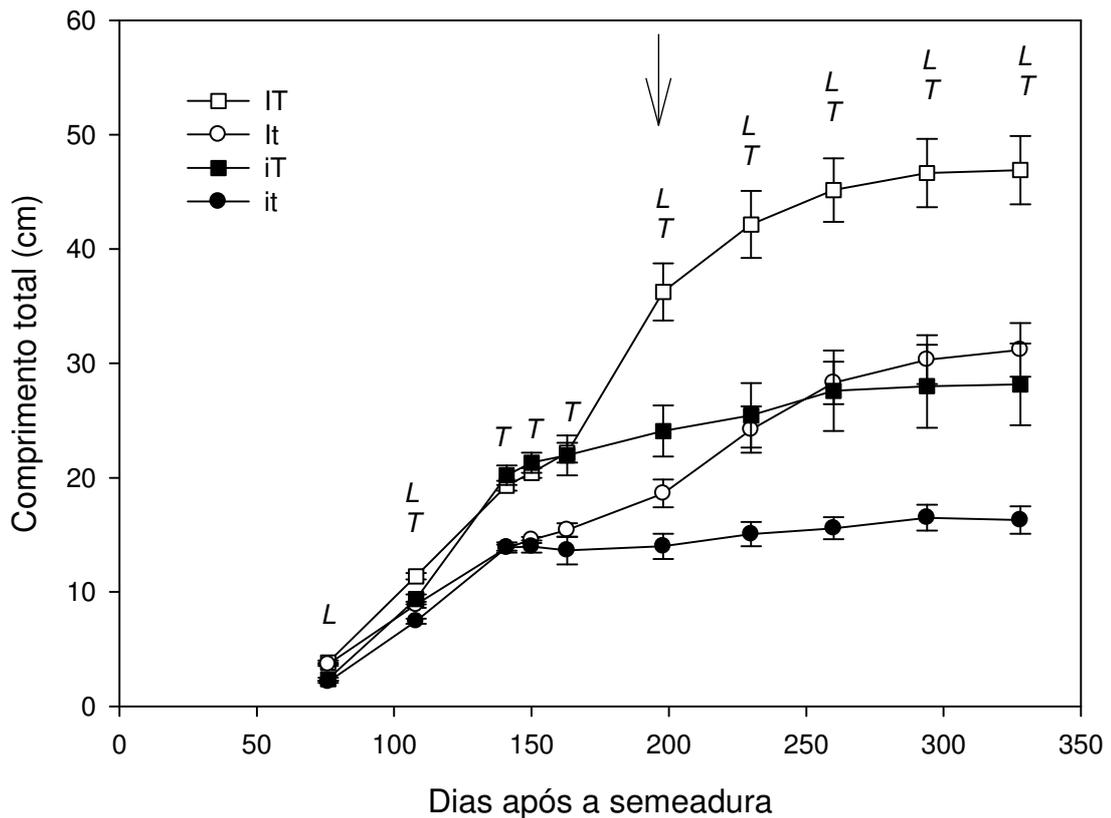


Figura 2. Comprimento total de plantas de *Araucaria angustifolia* nos quatro diferentes tratamentos avaliados. As barras verticais representam o erro padrão. A seta indica o início da ramificação lateral, exceto para as plantas ‘in’, que nunca ramificaram. As letras L, T e L*T indicam efeitos significativos do fator luz (L), do fator tamanho (T) e da interação entre ambos (L*T) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação L*T. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos.

Crescimento em biomassa

A biomassa total acumulada foi responsiva ao efeito positivo do maior tamanho da semente e da maior disponibilidade de luz nos desmontes um e dois (44 e 82 dias após a semeadura). Nos desmontes seguintes, além do efeito positivo da maior disponibilidade de luz e do tamanho da semente na biomassa, houve efeito da interação entre os dois fatores. No terceiro desmonte, o maior efeito do tamanho da semente no crescimento da planta é observado no maior nível de luz em que as mesmas se estabelecem, assim como o maior efeito da luz no aumento em biomassa da planta é observado nas plantas originadas das maiores sementes. No último desmonte, o efeito do tamanho de sementes no crescimento em massa da planta foi significativo apenas nas maiores irradiâncias; enquanto que o efeito promotor da luz no crescimento foi maior nas plantas oriundas das maiores sementes. O padrão de variação da biomassa total ao longo do período de cultivo mostra também a estabilização no acúmulo em massa das plantas na sombra, independentemente do tamanho da semente que lhe deu origem (Figura 3).

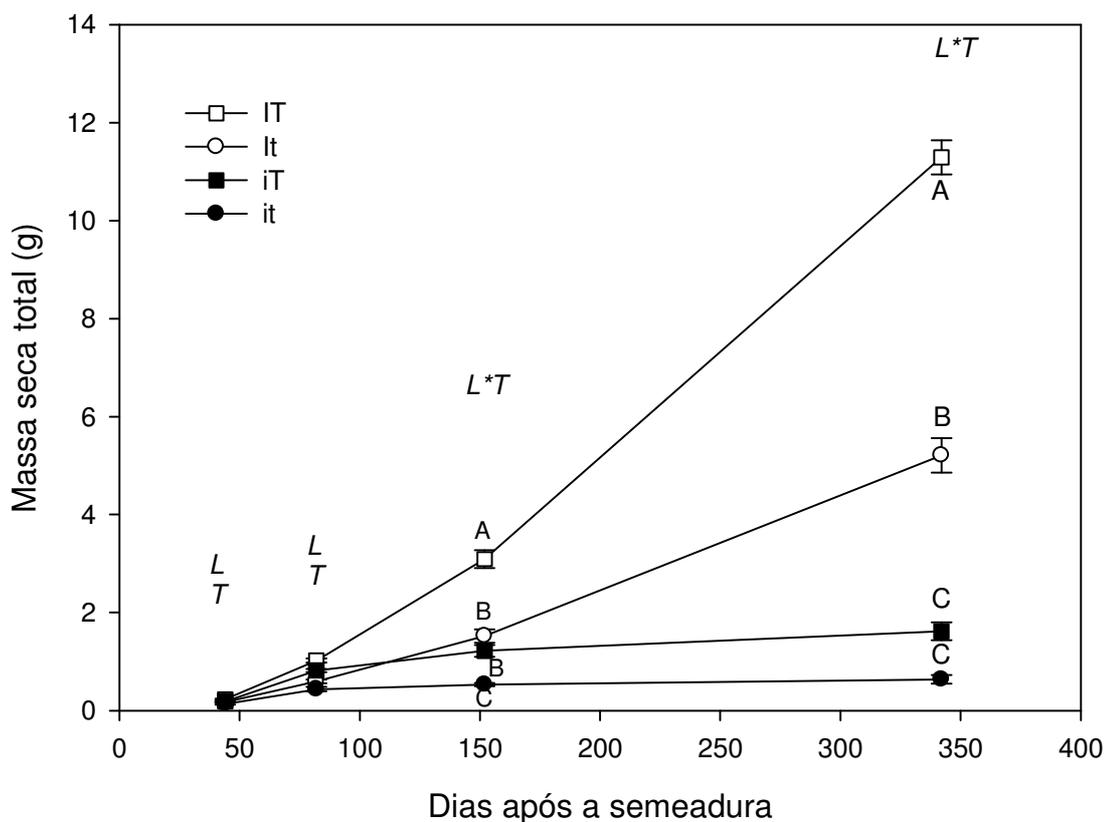


Figura 3. Biomassa seca total em plantas de *Araucaria angustifolia* nos quatro diferentes tratamentos avaliados. As barras verticais representam o erro padrão. As letras *L*, *T* e *L*T* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator tamanho (*T*) e da interação entre ambos (*L*T*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*T*. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos.

Quanto às variações de massa no hipocótilo subterrâneo, no primeiro desmonte, a massa acumulada no hipocótilo foi dependente do fator luz e do fator tamanho das sementes, onde o ambiente com maior disponibilidade luminosa assim como o maior tamanho de sementes promoveram o maior crescimento deste órgão. No segundo desmonte, período de maior acúmulo das reservas no hipocótilo, apenas o efeito do

tamanho das sementes teve influência na massa do mesmo, sendo que plantas oriundas de sementes maiores exibiram os hipocótilos com maior massa, independente do ambiente luminoso em que estava a planta. No terceiro desmonte, quando já se evidenciou a degradação das reservas hipocotilares, a massa do hipocótilo foi responsiva aos dois fatores avaliados, sendo que a menor disponibilidade de luz e o menor tamanho das sementes conduziram a uma menor massa no hipocótilo das plantas. Ao final do experimento se evidenciou a interação entre os fatores avaliados, de forma semelhante ao observado para a massa total, onde o efeito positivo do maior tamanho da semente foi maior no ambiente com a maior disponibilidade de luz; já o efeito positivo da maior disponibilidade de luz no acúmulo em massa no hipocótilo apenas foi significativo nas plantas oriundas de sementes grandes. A depleção das reservas hipocotilares de plantas estabelecidas na sombra prosseguiu por um período maior que o das plantas iluminadas. Estas últimas tiveram um aumento na massa de seus hipocótilos ao final do experimento (Figura 4).

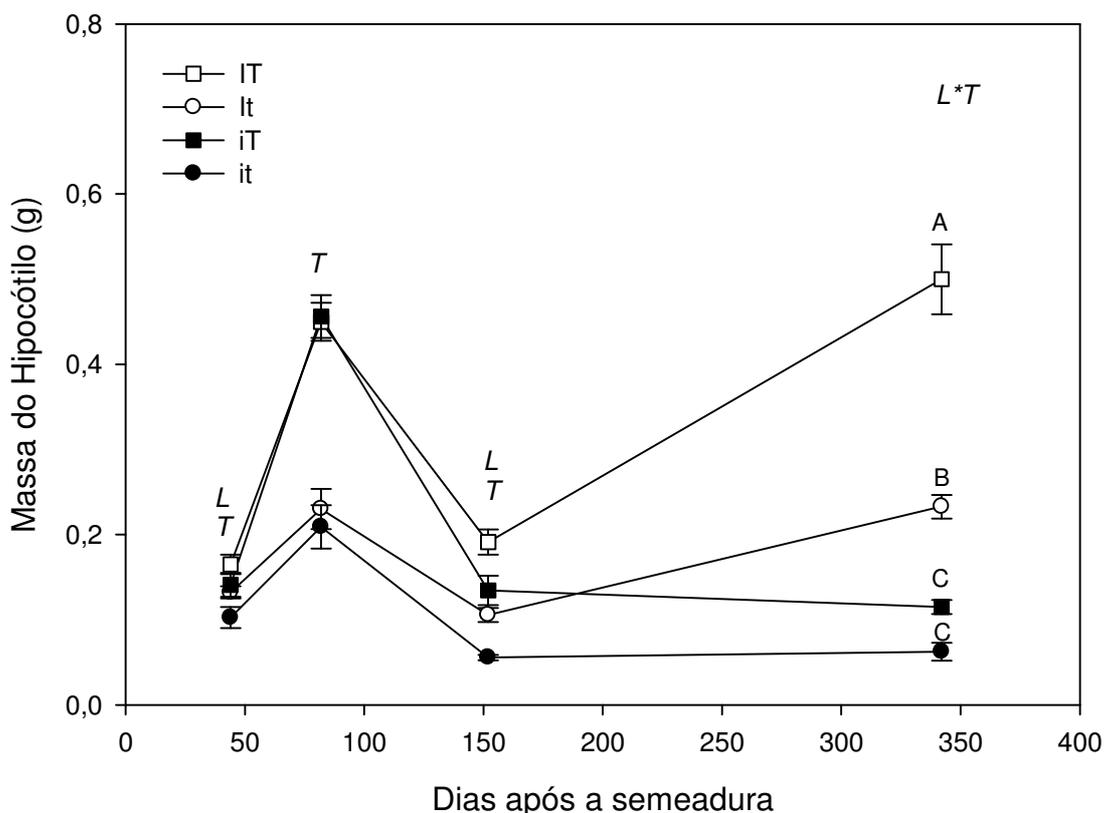


Figura 4. Variação de biomassa no hipocótilo de plantas de *Araucaria angustifolia* nos quatro diferentes tratamentos avaliados. As barras verticais representam o erro padrão. As letras *L*, *T* e *L*T* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator tamanho (*T*) e da interação entre ambos (*L*T*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*T*. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos.

Quanto às variações da massa seca dos pinhões, estas exibiram diferenças apenas quanto ao fator tamanho das sementes (Figura 5), independentemente do ambiente luminoso a que as plantas estavam submetidas. A estabilização em massa dos pinhões se deu a partir de cerca de 150 dias após a sementeira (Figura 5).

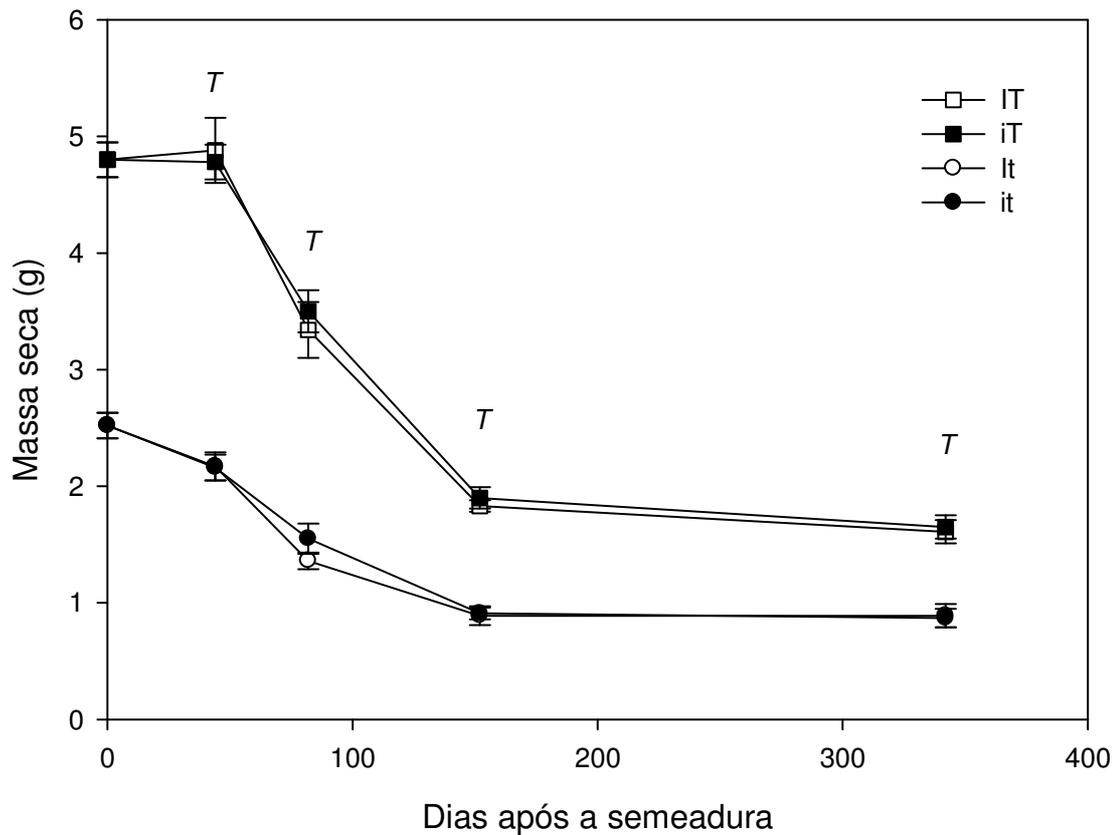


Figura 5. Massa seca dos pinhões de *Araucaria angustifolia* submetidos aos quatro tratamentos no decorrer do período experimental. As barras verticais se referem ao erro padrão. As letras *L*, *T* e *L*T* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator tamanho (*T*) e da interação entre ambos (*L*T*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*T*. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos.

Taxas de crescimento relativo e razões de crescimento

A taxa de crescimento relativo (baseada na biomassa total) respondeu primeiramente ao efeito do tamanho da semente, onde as plantas com maiores sementes tiveram maior taxa de crescimento do que as plantas de menores sementes. Após os 82 dias da

semeadura, apenas o efeito do ambiente de luz foi significativo, onde as plantas bem iluminadas tiveram maior taxa de crescimento do que as plantas sombreadas (Figura 6).

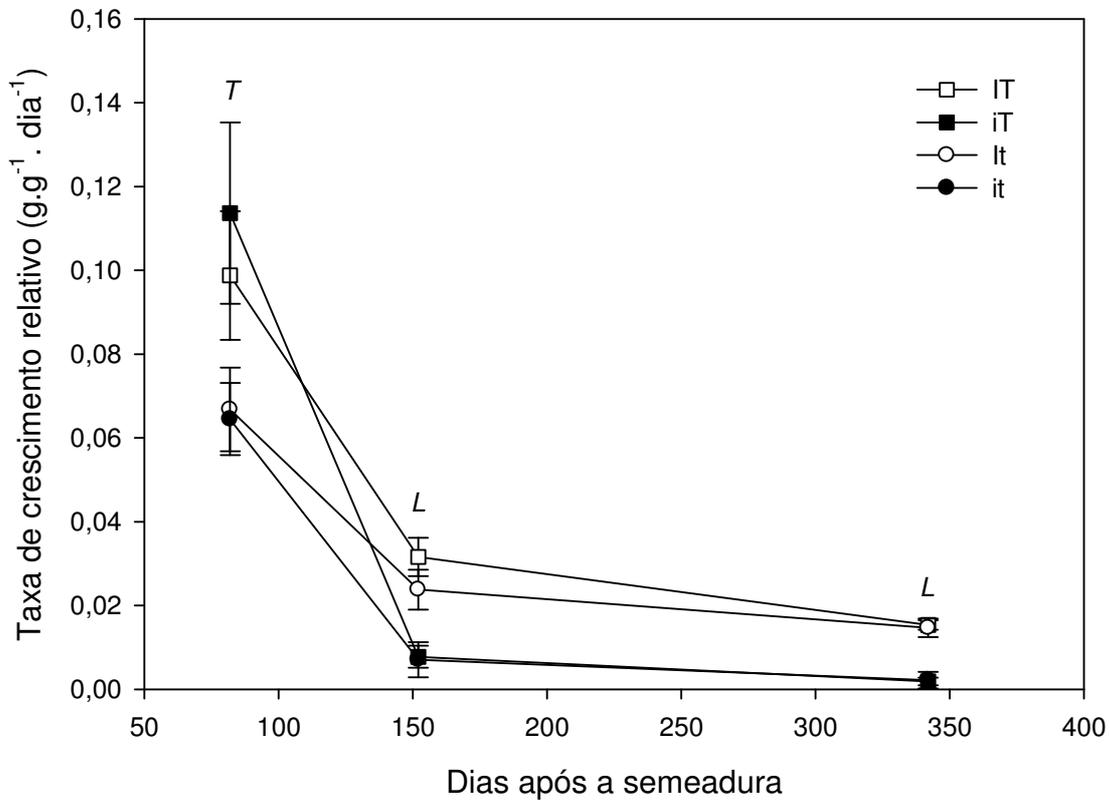


Figura 6. Taxa de crescimento relativo das plantas baseada na biomassa acumulada entre dois períodos consecutivos de coleta. As barras verticais representam o erro padrão. As letras *L*, *T* e *L*T* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator tamanho (*T*) e da interação entre ambos (*L*T*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*T*. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos.

A tabela 2 ilustra diversos parâmetros de alocação de crescimento das plântulas nos diferentes tratamentos. O NF por planta exibiu efeitos positivos do maior tamanho das sementes e da maior disponibilidade luminosa. A AF das plantas exibiu efeitos

interativos entre o tamanho das sementes e o ambiente de luz: o efeito positivo da melhor disponibilidade de luz na área foliar total das plantas foi maior no maior tamanho de sementes, enquanto que o efeito positivo do maior tamanho de sementes foi maior na maior disponibilidade luminosa. A AFE foi significativamente aumentada tanto pelo sombreamento quanto pela redução no tamanho da semente. A R/PA foi menor e a RMF e a RAF foram maiores em plantas na sombra do que nas plantas cultivadas sob alta irradiância.

Tabela 2. Razão área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), razão raiz/parte aérea (R/PA), área foliar (AF), razão de massa foliar (RMF) e número de folhas (NF) ao final do experimento (342 dias) nos quatro tratamentos avaliados. Valores são médias (\pm EP). As letras *L*, *T* e *L*T* indicam efeitos significativos do fator luz (*L*), do fator tamanho (*T*) e da interação entre ambos (*L*T*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação *L*T*.

	NF	AF	AFE	RMF	RAF	R/PA
		(cm ²)	(cm ² .g ⁻¹)	(g.g ⁻¹)	(cm ² .g ⁻¹)	(g.g ⁻¹)
	(<i>L, T</i>)	(<i>L*T</i>)	(<i>L, T</i>)	(<i>L</i>)	(<i>L</i>)	(<i>L</i>)
IT	410,2 \pm 19,5	227,1 \pm 7,8 A	63,1 \pm 2,1	0,35 \pm 0,01	19,5 \pm 0,3	0,791 \pm 0,01
iT	184,2 \pm 29,5	101,3 \pm 9,2 B	124,8 \pm 2,9	0,55 \pm 0,01	58,8 \pm 2,5	0,235 \pm 0,01
It	343,0 \pm 39,4	117,2 \pm 15,9 B	73,2 \pm 3,7	0,35 \pm 0,01	20,0 \pm 1,2	0,815 \pm 0,02
it	108,4 \pm 8,4	39,3 \pm 9,3 C	146,1 \pm 9,1	0,50 \pm 0,02	57,4 \pm 4,4	0,325 \pm 0,04

Análise de carboidratos não-estruturais (CNE)

As concentrações de CNE na raiz principal foram afetadas pelos tratamentos nos dois últimos desmontes, enquanto no hipocótilo só o foram no último desmonte. No

penúltimo (152 dias após a semeadura) a concentração de CNE na raiz principal foi maior na presença da luz do que na ausência da mesma. No último desmonte (342 dias) a concentração de CNE nas raízes exibiu efeitos interativos entre os dois fatores avaliados, sendo que o efeito da luz foi apenas significativo no maior tamanho de sementes, enquanto que o efeito do tamanho das sementes o foi apenas na maior disponibilidade de luz (Figura 7A). No quarto desmonte (342 dias), as concentrações de CNE no hipocótilo evidenciaram efeitos interativos entre os fatores testados, onde o efeito positivo da maior disponibilidade de luz na concentração de CNE apenas foi significativo no maior tamanho de sementes (Figura 7B). As concentrações de CNE no caule principal não foram significativamente diferentes entre os tratamentos (Figura 7C). De maneira geral, a quantidade de CNE armazenada foi maior no hipocótilo, seguido da raiz e do caule (Figuras 7A-C).

O *pool* de CNE na raiz principal no terceiro desmonte foi maior nas plantas sob maior irradiância e maior tamanho de sementes. No último desmonte foram observados efeitos interativos entre os fatores: o efeito positivo da luz no *pool* de CNE foi maior em sementes grandes do que em sementes pequenas, enquanto o efeito do maior tamanho das sementes apenas foi significativo na maior disponibilidade de luz (Figura 7D).

O *pool* de CNE no hipocótilo da planta no segundo (82 dias após a semeadura) e terceiro desmonte foi maior nas plantas de maior tamanho de sementes. O último desmonte exibiu efeito interativo entre os fatores, assim sendo, o efeito promotor da luz nesta característica foi maior em plantas com as maiores sementes, enquanto que o efeito do maior tamanho de semente apenas foi significativo nas maiores irradiâncias (Figura 7E).

O *pool* de CNE no caule da planta aos 82 dias após a semeadura (segundo desmonte) foi maior nas plantas de maiores sementes. O terceiro desmonte exibiu

efeitos interativos, onde o efeito do ambiente de luz foi apenas significativo nas plantas com as maiores sementes e o efeito do tamanho das sementes foi apenas significativo na maior disponibilidade de luz. No último desmonte, as plantas sob maior disponibilidade luminosa e maior tamanho de sementes tiveram maior pool de carboidratos no caule (Figura 7F).

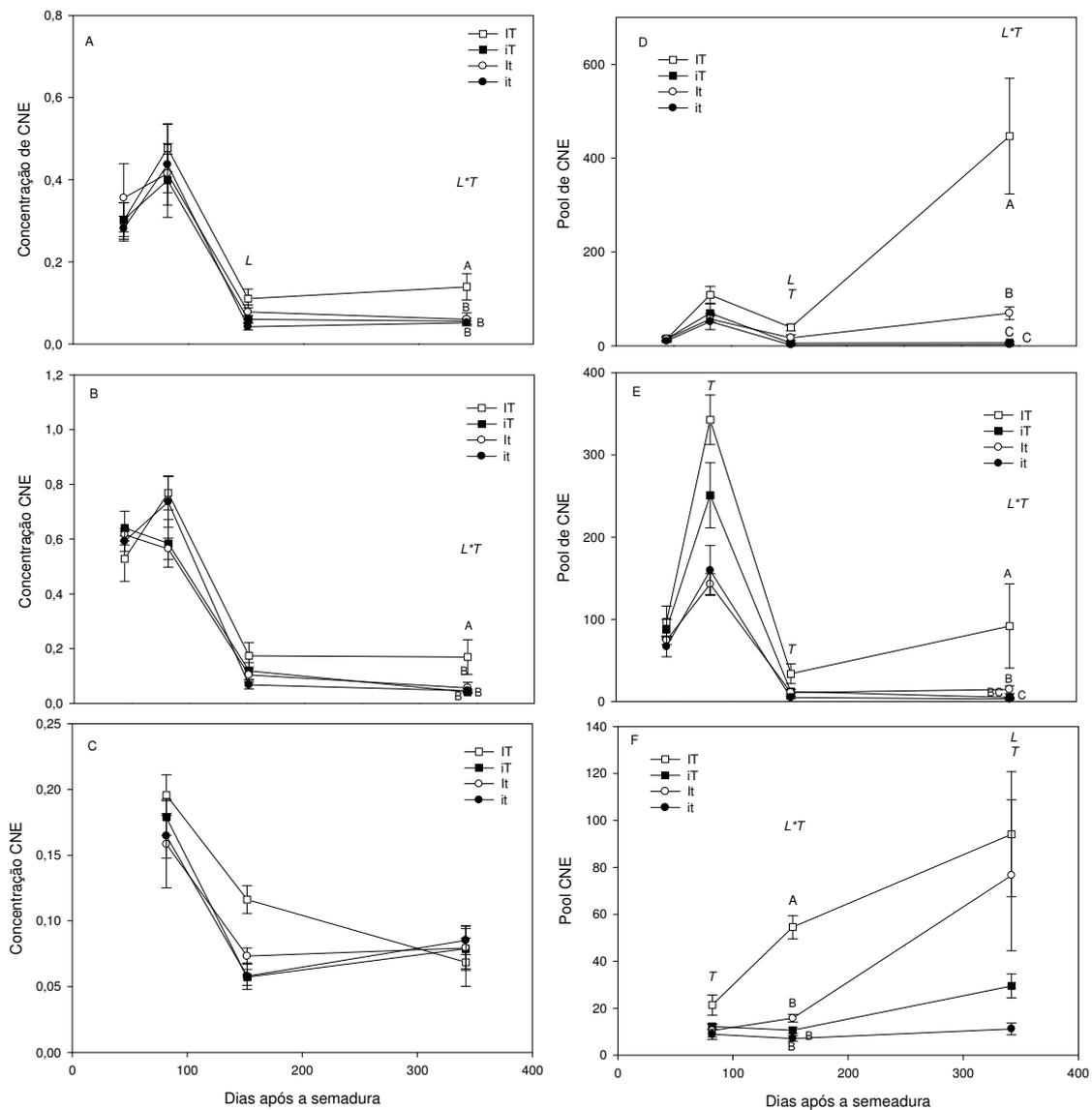


Figura 7. Carboidratos não-estruturais totais (CNE) na raiz (A e D), hipocótilo (B e E) e caule (C e F) de plântulas de *A. angustifolia* nos quatro desmontes realizados. A-C Concentração (mg . mg⁻¹). D-F Pool de CNE (mg). Barras verticais representam o erro padrão. As letras L, T e L*T indicam efeitos significativos do fator luz (L), do fator

tamanho (T) e da interação entre ambos ($L*T$) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação $L*T$. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos.

Sobrevivência das plantas

As plantas submetidas às maiores disponibilidades de luz tiveram maior porcentagem de sobrevivência do que as plantas submetidas à sombra. Ao final do experimento, as plantas em condições sombreadas e as bem iluminadas exibiam ~40 e ~80% de sobrevivência, respectivamente. As plantas oriundas de sementes grandes tiveram sobrevivência um pouco menor do que as provenientes de sementes pequenas. Este efeito foi mais consistente nas plantas no sol, pois nas que estavam na sombra este padrão inverteu ao final do experimento (Figura 8).

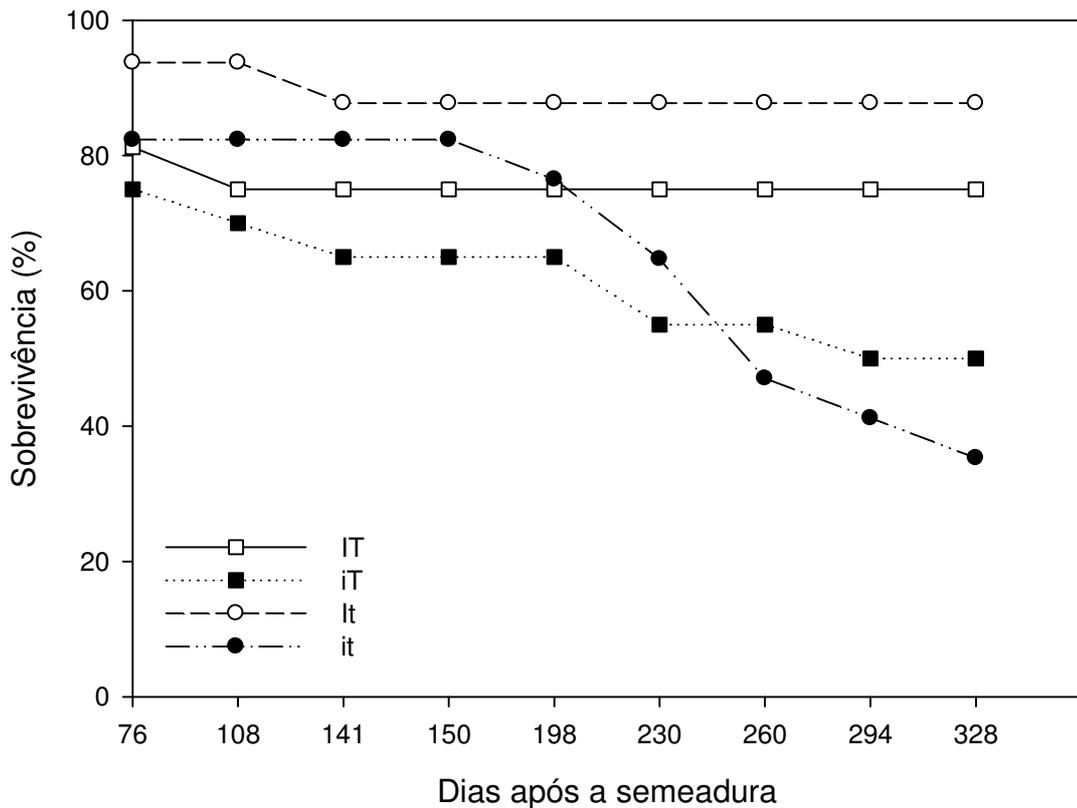


Figura 8. Sobrevivência de plantas de *Araucaria angustifolia* nos quatro diferentes tratamentos avaliados. I – alta irradiância; i- baixa irradiância; T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos.

EFEITO DO TAMANHO DAS SEMENTES E DA DISPONIBILIDADE DE LUZ NA TOLERÂNCIA AO DANO À PARTE AÉREA

Sobrevivência das plantas

As plantas controle submetidas às maiores irradiâncias exibiram 100% de sobrevivência para os dois tamanhos de sementes. Em baixas irradiâncias, as plantas de sementes pequenas tiveram menores taxas de sobrevivência (~40%) do que as plantas de sementes grandes (~80%; Figura 9 A).

A remoção da parte aérea diminuiu a sobrevivência das plantas nos quatro tratamentos. A remoção da parte aérea em plantas sombreadas ocasionou a mortalidade total das plantas de sementes grandes, enquanto que apenas uma planta de semente pequena sobreviveu nesta condição (Figura 9 B). As plantas submetidas ao dano exibiram maior sobrevivência quando originadas de sementes pequenas, nas duas condições luminosas (Figura 9 B).

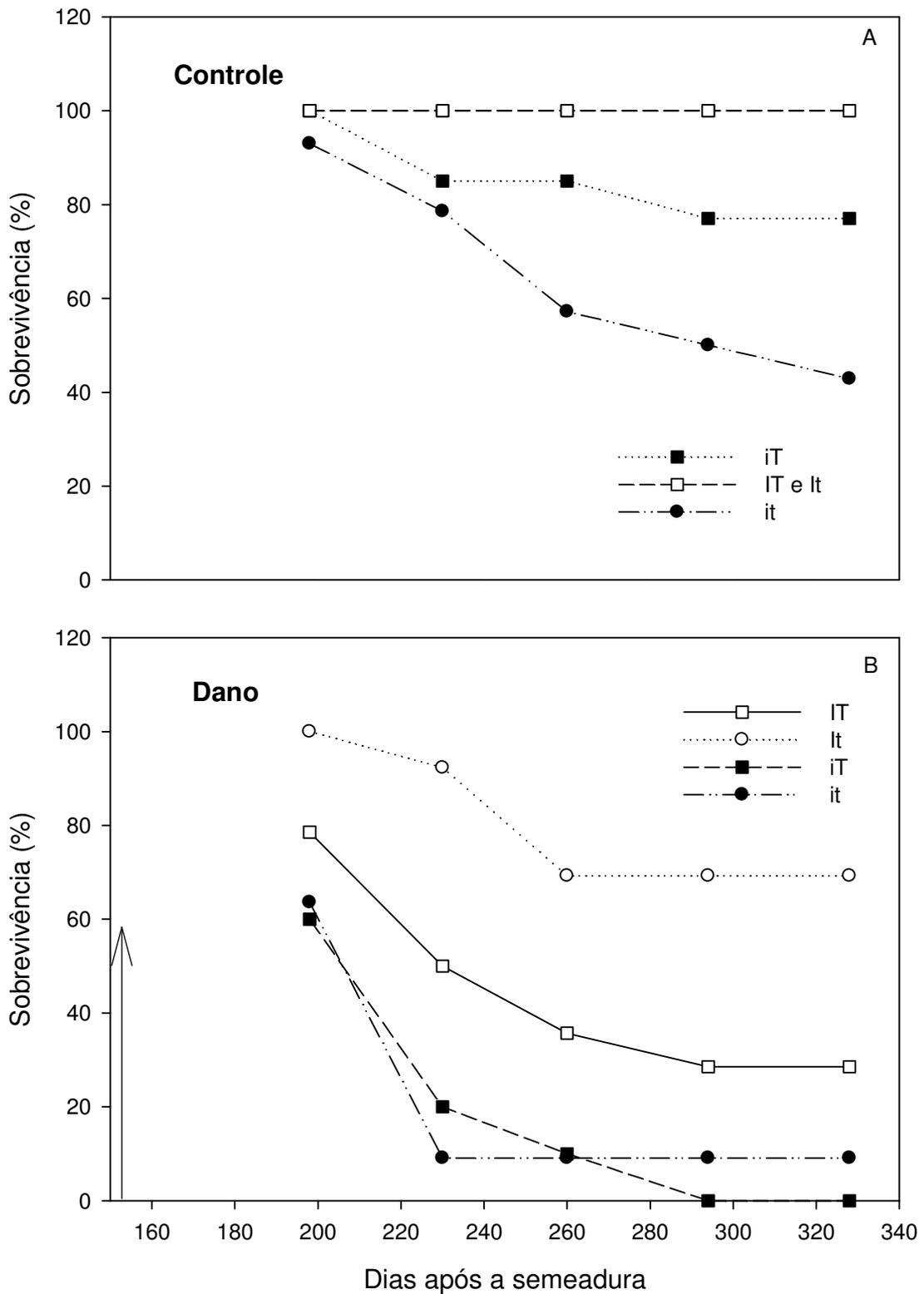


Figura 9. Sobrevivência das plantas após a remoção da parte aérea nos quatro tratamentos avaliados. A seta indica o momento do dano. A) Plantas controle (íntactas).

B) Plantas com a parte aérea removida (danificadas). I – alta irradiância; i- baixa irradiância. T – pinhões grandes; t – pinhões pequenos.

Crescimento em biomassa

Devido à quase total mortalidade das plantas submetidas ao dano e estabelecidas à sombra, o fator luz não foi incluído nestas análises, sendo apenas avaliado o papel do tamanho das sementes.

O corte da parte aérea reduziu significativamente a massa total acumulada (Figura 10 A), a massa da parte aérea (Figura 10 B) e a massa seca das raízes (Figura 10 C) ao final do experimento, nos dois tamanhos de sementes testados. O efeito positivo do maior tamanho de sementes nestes acúmulos de massa foi apenas significativo nas plantas não cortadas (Figura 10 A-C).

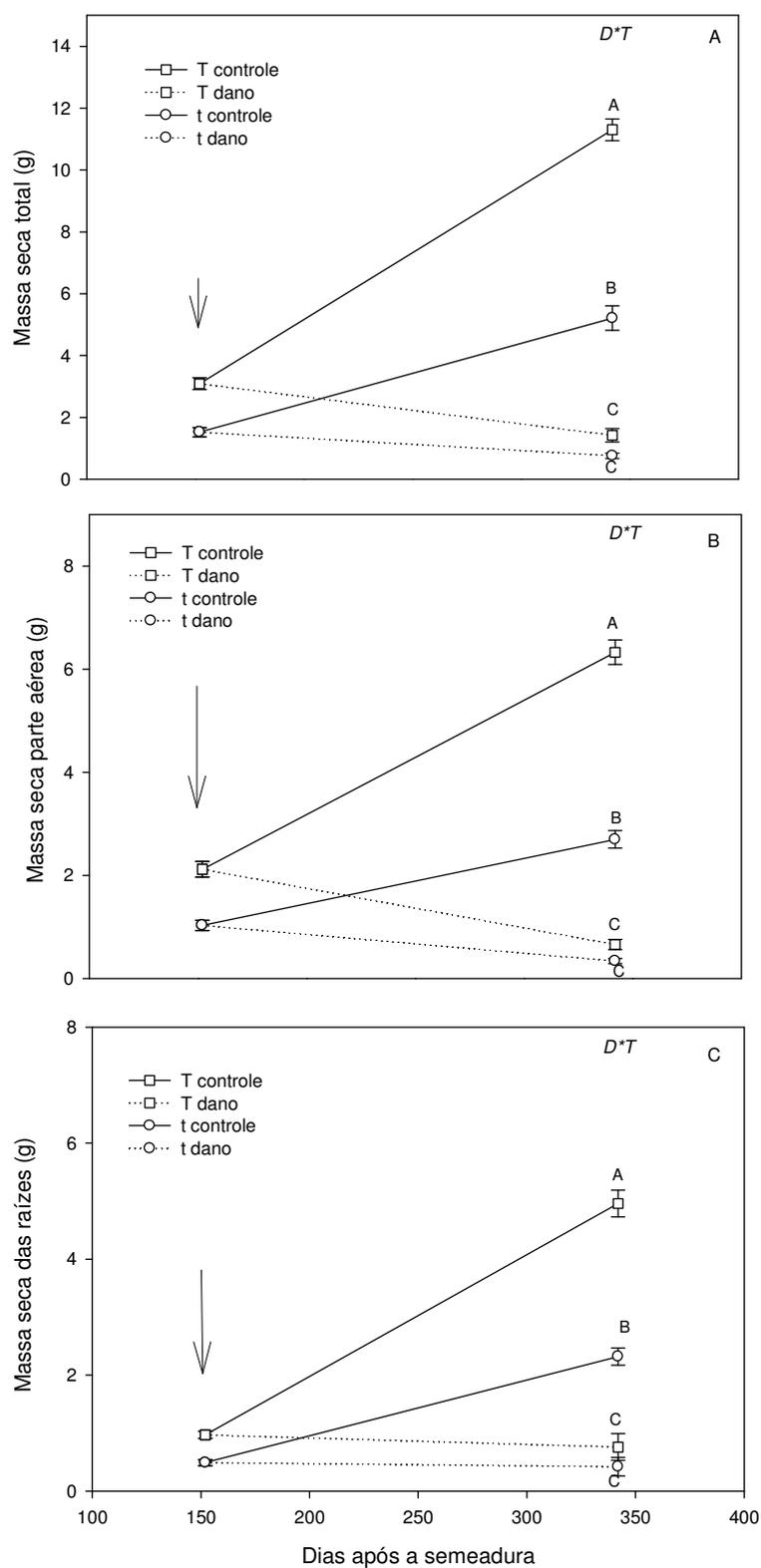


Figura 10. Plantas submetidas a altas irradiâncias aos 152 (período em que se efetuou o dano à parte aérea) e aos 342 dias após a semeadura. As barras verticais representam o erro padrão. A) Massa seca total. B) Massa seca da parte aérea (toco + rebrote em

plantas com dano). C) massa seca das raízes (raiz principal, raízes laterais e hipocótilo). As letras *D*, *T* e *D*T* indicam efeitos significativos do fator dano a parte aérea (*D*), do fator tamanho de sementes (*T*) e da interação entre ambos (*D * T*) na ANOVA fatorial. A separação das médias através do uso de letras maiúsculas diferentes só é indicada nos casos em que houve efeito significativo da interação (*D * T*).

Discussão

Efeitos do tamanho da semente e da disponibilidade de luz no desenvolvimento inicial da *Araucaria angustifolia*

Os resultados deste trabalho nos levam a aceitar apenas parcialmente a primeira hipótese colocada neste trabalho: sementes grandes de fato geram maior crescimento, mas, ao contrário do esperado, não parecem afetar a sobrevivência. Contrariando a nossa hipótese, a dependência do efeito do tamanho da semente sobre o crescimento (acúmulo total de massa) em relação à irradiância só se expressou no período mais tardio de crescimento das plantas e revelou maiores aumentos no sol e não na sombra.

A sobrevivência não foi consistentemente afetada pelo tamanho das sementes, o que se mostrou contrário às nossas expectativas e à maioria dos trabalhos que avaliaram a influência do tamanho das sementes na sobrevivência. Em *Artocarpus heterophyllus* (Moraceae; peso das sementes 4-14g), por exemplo, as plantas oriundas de sementes grandes tiveram maiores chances de sobrevivência em todos os níveis de luz testados (Khan 2004). Resultados semelhantes do tamanho das sementes foram obtidos em *Prunus jenkinsii*, apesar de este estudo ter sido realizado em condições de laboratório (Rosaceae, média do peso fresco das sementes 1,63g; Upadhaya *et al.* 2007). Entretanto, se analisarmos a curva de sobrevivência, verificamos que nos períodos finais as plantas originadas de sementes menores apresentavam menor sobrevivência na sombra do que as plantas provenientes de sementes maiores. Esta tendência se confirmou no segundo

experimento, onde um grupo de planta teve a parte aérea danificada. É possível que este efeito do tamanho da semente sobre a tolerância (sobrevivência) ao sombreamento só se manifeste tardiamente e que uma avaliação um pouco mais prolongada dê consistência a este resultado. Desta forma, a hipótese referente à sobrevivência precisa de investigações e análises mais detalhadas. Na própria espécie de estudo, *A. angustifolia*, o trabalho de Spoltz (1967), em viveiro, mostra que a mortalidade após os seis meses de cultivo foi maior nas plantas oriundas de sementes pequenas.

O crescimento vertical (altura) da planta, de maneira geral, foi mais sensível ao tamanho da semente do que ao ambiente luminoso. As plantas de sementes grandes atingiram maior altura do que as plantas de sementes pequenas, independentemente do ambiente luminoso. Spoltz (1967) já havia demonstrado este mesmo efeito do tamanho da semente sobre a altura de plantas de *A. angustifolia*, mas sua avaliação restringiu-se a este parâmetro de crescimento. O efeito promotor da luz restringiu-se ao período inicial de crescimento, e esta baixa resposta à luminosidade atesta a importância do alongamento vertical em plantas sombreadas. Franco e Dillenburg (2007) inclusive verificaram um incremento inicial em altura de plantas sombreadas quando comparadas a plantas no sol, efeito este que durou apenas enquanto havia reservas no pinhão. Em contraste com a altura, o comprimento total da parte aérea foi sensível aos dois fatores avaliados: tanto plantas com sementes maiores quanto plantas desenvolvidas em boas condições luminosas tiveram maior comprimento total. Cabe ressaltar que as plantas oriundas de sementes grandes, quando estabelecidas na sombra, compensaram a baixa disponibilidade de luz para a fotossíntese pelo uso das grandes quantidades de reservas de suas sementes, ficando este grupo de plantas, com o mesmo comprimento das plantas oriundas de sementes menores e estabelecidas em boas disponibilidades luminosas.

As interações entre os efeitos da luz e do tamanho da semente sobre o acúmulo total de massa pelas plantas variaram ao longo do desenvolvimento das mesmas. Enquanto estas ainda utilizavam as reservas do pinhão, tanto o maior tamanho de semente quanto a maior irradiância geraram maiores massas acumuladas, mas seus efeitos não foram interativos. Após este período inicial, o maior tamanho de semente só gerou mais massa em condições de maior irradiância. Estes resultados mostram que a vantagem conferida pela maior semente ao crescimento de plantas fortemente sombreadas não é grande o suficiente para ser mantido além do estágio de plântula e só se sustentaria se o maior tamanho alcançado por estas plantas fosse reforçado por uma maior disponibilidade luminosa, após esgotadas as reservas do pinhão. Assim, nossa segunda hipótese, de que a vantagem conferida pelas sementes grandes permanece mesmo após esgotadas as reservas do pinhão, só se aplica a plantas que tiverem crescendo sob adequada disponibilidade de luz. Estes resultados também reforçam o chamado efeito de reserva proposto por Westoby *et al.* (1996) e revisado por Leishman *et al.* (2000), que propõe que as sementes grandes só seriam vantajosas se houvesse alguma probabilidade das condições ambientais se tornarem mais favoráveis.

Segundo aqueles mesmo autores, um outro mecanismo pelo qual sementes grandes favoreceriam espécies que se estabelecem sob condições adversas seria aquele intermediado pelo maior tamanho da planta resultante, a qual, por ocupar um maior espaço, tanto abaixo quanto acima do solo, exploraria um maior volume de solo e competiria melhor por luz. À semelhança de outros estudos (Du and Huang 2008; Khan 2004; Yanlong *et al.* 2007; Ke and Werger 1999; Bonfil 1998; Castro *et al.* 2008), nossos resultados mostram que, dentro de uma mesma espécie, sementes maiores geraram plantas maiores, mas que estes efeitos só persistiram sob condições de maiores irradiâncias. Assim, qualquer vantagem conferida pelo maior tamanho atingido pelas

plantas oriundas de sementes grande se manifestariam onde as condições de luz não são tão limitantes. Considerando que as vantagens de um maior tamanho se expressam em ambientes com gradientes ambientais evidentes acima e abaixo do solo (Westoby *et al.*, 1996, revisado por Leishman *et al.*, 2000), podemos sugerir que plântulas e plantas jovens maiores de *A. angustifolia* poderão ter mais sucesso competitivo na vegetação campestre. Aqui, o sombreamento inicial pode ser intenso, mas a conquista de um maior tamanho devido a um maior pinhão aumentará as chances da planta conquistar posições verticais progressivamente mais favoráveis de irradiância, assim permitindo que, com o efeito do tamanho do pinhão, interaja o efeito da maior disponibilidade de luz, o que poderá resultar na emergência da planta acima do dossel campestre.

As plantas submetidas às condições sombreadas mostraram uma estabilização no acúmulo de massa total nas duas avaliações finais, enquanto que as plantas no sol cresceram continuamente, respondendo fortemente ao efeito da luminosidade. Kitajima (1996), através de curvas de crescimento funcional, demonstrou três fases para o grau de dependência das reservas da semente: a fase de completa dependência, a fase transicional e a fase de independência. Nesta última, a taxa de crescimento relativo da planta não depende mais das reservas estocadas nas sementes, e a plântula responderia aos fatores externos. Dessa forma, em *A. angustifolia*, o término da fase de plântula ou, em outras palavras, o período em que a planta não depende mais das reservas das sementes, se dá a partir dos 152 dias após a semeadura. A planta não mais faria uso das reservas das sementes, e, na falta destas, o crescimento na sombra não prossegue; no sol, entretanto, a planta iniciaria o seu crescimento autotrófico, respondendo ao ambiente luminoso favorável. Esta transição da dependência de recursos internos (semente) para recursos externos (no caso, luz) também fica evidente quando olhamos para o padrão de depleção da massa seca dos pinhões, onde a massa dos mesmos

também estabiliza a partir dos 152 dias após a sementeira, independentemente do ambiente luminoso em que a planta estava. Cabe ressaltar que, embora tenha havido um intervalo considerável sem avaliações entre cerca de 83 e 152 dias após a sementeira, os resultados mostrados por Löwe e Dillenburg (2011) apontam para uma estabilização de massa do pinhão não antes de 140 dias de cultivo.

As plantas originadas de sementes grandes também exibiram maior taxa de crescimento relativo do que as plantas provenientes de sementes pequenas, mas apenas durante o período inicial de dependência das reservas das sementes, correspondente ao período de acúmulo expressivo de reservas da semente no hipocótilo. Este efeito ocorreu independentemente da condição luminosa em que a planta estava crescendo. Esta maior taxa de crescimento deve estar relacionada a uma maior mobilização de reservas das sementes grandes. Embora isto não tenha sido medido, a curva de depleção de massa dos pinhões no período correspondente ao período de avaliação do crescimento relativo inicial (44 - 82 dias) indica uma maior depleção de massa em sementes grandes (~1,41g; ~30% da massa inicial da semente) do que em pequenas (~0,72g; ~30% da massa inicial da semente), tanto na luz quanto na sombra. As taxas de crescimento relativo no estágio final de degradação das reservas da semente (83-151 dias) só foram afetadas pela luz, apesar de, neste período, ainda haver uma substancial transferência de reservas da semente para a planta e das sementes grandes aparentemente metabolizarem mais rápido estas reservas. Após o período de uso das reservas da semente, estas taxas foram também favorecidas apenas pela maior disponibilidade de luz, efeito este intermediado ao menos em parte por maiores taxas fotossintéticas de plantas sob maior irradiância.

Em *Pinus sylvestris*, outra gimnosperma, a massa das sementes teve uma fraca relação com a taxa de crescimento relativo (Castro *et al.* 2008). Na floresta tropical do

sul da China, a espécie *Castanopsis chinensis* mostrou um comportamento diferenciado, onde a taxa de crescimento relativo foi negativamente relacionada com a massa de sementes (Du e Huang 2008). Os autores creditaram o declínio na taxa de crescimento relativo com o aumento da massa das sementes à diminuição na alocação massa a tecidos fotossintéticos (menor razão de massa foliar) em plantas oriundas de sementes maiores. No caso de *A. angustifolia*, as razões de massa e de área foliar e a razão raiz:parte aérea ao final do experimento não foram afetadas pelo tamanho das sementes, o que pelo menos em parte explica a falta de diferenças nas taxas de crescimento relativo das plantas nos períodos finais de avaliação. Interessantemente, a AFE aumentou com a diminuição no tamanho da semente, indicando uma provável compensação da menor disponibilidade inicial de carboidratos (e, conseqüentemente, do menor tamanho atingido pela planta) com uma maior alocação da massa foliar para a expansão da área fotossintetizante. Ao contrário do tamanho da semente, a baixa irradiância resultou em maiores alocações de massa aos tecidos fotossintéticos, ao gerar maiores razões de massa e de área foliar, menor razão raiz:parte aérea e maior AFE. Todas estas respostas têm reconhecido valor adaptativo sob condições de sombreamento (Givnish 1988; Lambers *et al.* 1998; Poorter 1999) e atestam a já reconhecida plasticidade da espécie em resposta a variações no ambiente de luz (Inoue 1980; Duarte e Dillenburg 2000; Franco e Dillenburg 2007).

A quantidade de reserva armazenada no hipocótilo das plantas se mostrou dependente do tamanho da semente: plantas detentoras de sementes maiores armazenaram maior quantidade de reservas nos seus hipocótilos, independentemente do ambiente luminoso, comprovando a terceira hipótese levantada neste estudo. Já a quantidade de massa após o período inicial de depleção também incluiu o efeito da luz, sendo que plantas sob maiores irradiâncias mantiveram uma maior massa em seus

hipocótilos do que as plantas sombreadas, seja devido a um menor uso ou a um maior acúmulo de fotossintatos das plantas com maior disponibilidade de luz, conforme já discutido no capítulo anterior. A avaliação final evidencia a provável realocação de fotossintatos a este órgão em plantas bem iluminadas, como já havia sido sugerido por Dillenburg *et al.* (2010), e o uso mais prolongado destas reservas nas plantas sob condições de sombra. Neste estágio, os efeitos do tamanho da semente sobre as reservas hipocotilares já não se manifestam em plantas sombreadas, à semelhança do observado para a massa total das plantas.

Dando sustento à quarta hipótese colocada neste trabalho, as plantas oriundas de sementes grandes tiveram um maior *pool* inicial de CNE do que as provenientes de sementes pequenas, sendo este *pool* inicial maior no hipocótilo do que na raiz principal e eixo caulinar. As concentrações iniciais de CNE variaram bastante entre os órgãos (maiores no hipocótilo e menores no caule) e entre os períodos (picos no período de máximo acúmulo de massa no hipocótilo), mas foram menos sensíveis aos fatores estudados. Na última avaliação, quando as plantas já se encontravam na fase autotrófica de existência, uma maior disponibilidade luminosa e um maior tamanho de semente tipicamente resultaram em maior concentração e acúmulo total de CNE nos diferentes órgãos. Exceto pelo caule, os efeitos da luz e tamanho de semente interagiram na resposta final, refletindo as interações destes fatores na determinação da massa final das plantas.

Os padrões de variação da raiz principal e do hipocótilo foram muito semelhantes e ao final do período de dependência da semente, ambos estabilizaram com concentrações muito parecidas. O *pool* de CNE, no entanto, diferiu muito em tamanho entre os órgãos, sendo muito maior no hipocótilo no período de acúmulo de massa no mesmo e muito maior na raiz principal após encerrada a dependência da semente. Esta

diferença final reflete o maior tamanho da raiz principal neste estágio de desenvolvimento.

Considerando o capítulo anterior, em que se evidenciou que aos cerca de 80 dias após a semeadura (no caso do respectivo trabalho no segundo desmonte) a razão de massa da parte aérea é ainda menor que a do hipocótilo, poderíamos supor, nesse sentido, que as reservas (CNE) translocadas durante este período inicial, representariam principalmente as reservas das sementes ao invés dos produtos da fotossíntese. Portanto, o presente estudo seria a primeira comprovação experimental do armazenamento considerável de carboidratos não-estruturais (oriundos das sementes) no eixo principal de *A. angustifolia*, durante os cerca de 80 dias após a semeadura, apesar de Dillenburg *et al.* (2010) já sugerirem este armazenamento de reservas devido ao aumento expressivo em massa do hipocótilo. Desse modo, poderíamos sugerir que a espécie possui uma estratégia conservadora na alocação de carbono, onde, no início do desenvolvimento (até os cerca de 80 dias após a semeadura), priorizaria o armazenamento de reservas ao invés do seu crescimento estrutural, investindo assim em sobrevivência. De fato, a comparação da concentração de CNE na raiz e hipocótilo de *A. angustifolia*, durante os primeiros 80 dias após a semeadura, com a concentração de CNE nas raízes de sete espécies arbóreas neotropicais estudadas por Myers e Kitajima (2007) evidenciaram maiores valores para a espécie aqui estudada, mesmo em comparação àquelas mais tolerantes à sombra. No presente estudo a maior concentração de CNE se deu no eixo subterrâneo, e, principalmente no hipocótilo, enquanto que no trabalho acima mencionado a maior concentração das reservas foi visível no caule.

Além de diferentes tolerâncias ao sombreamento, as espécies estudadas por Myers e Kitajima (2007) tinham distintos tamanhos de semente. Estes autores sustentam que sementes grandes, assim como grandes tamanhos de plântula, poderiam contribuir

indiretamente para a sobrevivência de longo prazo (cerca de um ano) na sombra, por intensificarem o tamanho dos *pools* de CNE nas raízes e caules. Ainda de acordo com estes autores, seria o *pool* de reservas no caule e raízes que estaria correlacionado com a tolerância à sombra, enquanto que a concentração das reservas não teria efeito na sobrevivência das plantas durante o primeiro ano de vida. Para *A. angustifolia* houve, aparentemente, efeito positivo do tamanho das sementes na sobrevivência das plantas cultivadas na sombra. Este efeito, no entanto, foi tardio (após cerca de 250 dias após a sementeira). A análise dos *pools* de CNE mostra que, de forma independente da irradiância, sementes maiores originaram plantas com maior *pool* de CNE no hipocótilo e raiz principal 151 após a sementeira. Na avaliação final (342 dias), este mesmo efeito do tamanho (independente da luz) expressou-se apenas no caule. É possível que o *pool* caulinar de CNE seja um fator determinante da sobrevivência de plantas na sombra. Mais adiante discutiremos os efeitos do tamanho da semente e da disponibilidade de luz sobre a sobrevivência após o dano à parte aérea, onde os CNE parecem estar envolvidos.

O efeito do tamanho da semente na substituição dos tecidos após a remoção da parte aérea em duas condições luminosas contrastantes

Plantas oriundas de sementes grandes não exibiram maior crescimento após dano à parte aérea do que plantas oriundas de sementes pequenas. A massa total, a massa da parte aérea e a massa subterrânea das plantas após o dano não foram afetadas pelo tamanho das sementes. Portanto, rejeitamos nossa hipótese 5.

O padrão de alocação de massa nas plantas que sobreviveram à simulação de herbivoria (no caso, apenas as plantas em condições luminosas favoráveis) mostra que a massa seca subterrânea (raiz principal, raízes laterais e hipocótilo) diminuiu

independentemente do tamanho das sementes que as plantas tinham. Esta diminuição da massa seca das raízes pode demonstrar a transferência de recursos para a substituição dos tecidos perdidos. Experimentos anteriores com a remoção da parte aérea de *A. angustifolia* já demonstraram o uso das reservas do hipocótilo para a substituição dos tecidos das plantas (Alabarce 2010). Em *Gustavia superba*, as plantas submetidas a altas irradiâncias e danificadas (pela remoção da parte aérea ou apenas das folhas) tiveram menor razão de massa radicular do que as plantas controle, demonstrando também, nesse caso, a transferência de reservas das raízes para a substituição dos tecidos (Barberis e Dalling 2008). Em *Quercus rugosa*, também foi observada a redução em biomassa da raiz, que poderia então ter sido utilizada para a produção da nova parte aérea (Bonfil 1998).

A grande soma de plantas mortas após a simulação da herbivoria, em condições de intenso sombreamento, reflete os escassos recursos destas plantas. Segundo Saverimuttu e Westoby (1996), a longevidade da planta sob sombra densa está relacionada à quantidade de reservas da semente que não foi comprometida com o crescimento inicial; em vista disso, as plantas oriundas de sementes grandes teriam maior longevidade no estágio cotiledonar do que no estágio foliar. Neste último, a degradação das reservas das sementes já estaria concluída, e a plântula iniciaria o crescimento exponencial. Segundo os autores, nesse momento, as reservas das sementes não teriam mais relação com a sobrevivência na sombra. No caso de *A. angustifolia*, as plantas foram submetidas ao dano após o completo uso das reservas das sementes e do próprio hipocótilo. Assim, a planta somente teria uma chance de sucesso após o dano se estivesse em condições luminosas favoráveis; caso contrário, a substituição dos tecidos ou não ocorreria ou seria insuficiente para suportar estas condições adversas por muito tempo, mesmo se as sementes que lhe originaram eram grandes. Em condições de

sombra densa, provavelmente abaixo do ponto de compensação luminoso, as plantas provavelmente não tiveram reservas suficientes nas raízes para a substituição dos tecidos perdidos. No presente experimento, mesmo nas condições mais favoráveis de irradiância, ocorreu mortalidade de plantas após o dano, e o maior tamanho das sementes de origem não favoreceu esta sobrevivência. Esta falta de efeito do tamanho das sementes nas plantas no sol provavelmente se deveu também ao período tardio em que o dano foi imposto. Em contraste com os nossos resultados, Barberis e Dalling (2008), trabalhando com a simulação de herbivoria em *G. superba* submetidas a condições luminosas contrastantes, não relataram a mortalidade de plantas em condições sombreadas após esta simulação, porém o tempo em que as plantas permaneceram sob efeito do dano para *G. superba* foi muito menor (seis semanas) do que em *A. angustifolia* (190 dias).

Após a degradação das reservas das sementes em *A. angustifolia*, a intensidade de rebrote e a sobrevivência após o dano devem estar mais relacionadas à quantidade de reservas que não haviam sido dirigidas ao crescimento estrutural da planta no momento do dano (152 dias após a semeadura). Neste momento, o *pool* de CNE em todos os órgãos era muito pequeno se comparado ao período anterior, mas foi favorecido pela maior irradiância e pelo maior tamanho de semente, tanto na raiz principal quanto no caule. Como o caule foi removido, sugere-se que o armazenamento subterrâneo de fotoassimilados foi o responsável pela maior sobrevivência e capacidade de fazer a substituição dos tecidos nas plantas bem iluminadas, quando comparadas às sob sombra. Provavelmente este é o fator-chave na tolerância ao dano da parte aérea nas plantas sem limitação de luz.

Referências

- Alabarce, F.S. (2010) Capacidade e intensidade de rebrote de plântulas de *Araucaria angustifolia* (Pinheiro Brasileiro). Tese de conclusão de curso, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 37p.
- Baraloto, C.; Forget, P. (2007) Seed size, seedling morphology, and response to deep shade and damage in neotropical rain forest tree. *American Journal of Botany* 94 (6): 901-911.
- Barberis, I.G.; Dalling, J.W. (2008) The effect of light, seed size and biomass removal on cotyledon reserve use and root mass allocation in *Gustavia superba* seedlings. *Journal of Tropical Ecology* 24: 607-617.
- Bonfil, C. (1998) The effects of seed size, cotyledon reserves, and herbivory on seedling survival and growth in *Quercus rugosa* and *Q. laurina* (Fagaceae). *American Journal of Botany* 82: 79-87.
- Boot, R. G. A. (1996) The significance of seedling size and growth rate of tropical rain forest tree seedlings for regeneration in canopy openings. *In Ecology of tropical forest tree seedling*. (Ed. M.D. Swaine) pp. 267-283.
- Castro, J.; Reich, P.B.; Sanchez-Miranda, A.; Guerrero, J.D. (2008) Evidence that the negative relationship between seed mass and relative growth rate is not physiological but linked to species identity: a within-family analysis of Scots pine. *Tree Physiology* 28: 1077-1082.
- Dillenburg, L.R.; Rosa, L. M. G.; Mósena, M. (2010) Hypocotyl of seedlings of the large-seeded species *Araucaria angustifolia*: an important underground sink of the seed reserves. *Trees* 24 (4): 705-711.

- Du, Y.; Huang, Z. (2008) Effects of seed mass and emergence time on seedling performance in *Castanopsis chinensis*. *Forest Ecology and Management* 255: 2495-2501.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
- Duarte, L.S.; Dillenburg, L.R. (2000) Ecophysiological responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seedlings to different irradiance levels. *Australian Journal of Botany* 48: 531-537.
- Duarte LS, Santos MMG, Hartz SM, Pillar VD (2006) Role of nurse plants in *Araucaria* Forest expansion over grassland in south Brazil. *Austral Ecology* 31: 520–528
- Franco, A.M.S.; Dillenburg, L.R. (2007) Ajustes morfológicos e fisiológicos em plantas de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em resposta ao sombreamento. *Hoehnea* 34: 135-144.
- Ferreira, A.G.; Handro, W. (1979) Aspects of seed germination in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Revista Brasileira de Botânica* 2: 7-13.
- Givnish, T.J. (1988) Adaptation to sun and shade plants: a whole plant perspective. *Australian Journal of Plant Physiology* 15: 63-92.
- Hewitt, N. (1998) Seed size and shade tolerance: a comparative analysis of North American temperate trees. *Oecologia* 114: 432-440.
- Inoue, M.T.; Torres, D.V. 1980. Comportamento do crescimento de mudas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze em dependência da intensidade luminosa. *Revista Floresta*, v.11, p.7-11.

- Job, G.; Vieira, E.M. (2008) Seed predation of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) in the Brazilian Araucaria Forest: influence of deposition site and comparative role of small and 'large' mammals. *Plant Ecology* 198: 185-196.
- Ke, G.; Werger, M.J.A. (1999) Different responses to shade of evergreen and deciduous oak seedlings and the effect of acorn size. *Acta Oecologica* 6:579-586.
- Khan, M.L. (2004) Effects of seed mass on seedling success in *Artocarpus heterophyllus* L., a tropical tree species of north-east India. *Acta Oecologica* 25: 103-110.
- Kitajima, K. (2002) Do shade-tolerant tropical tree seedlings depend longer on seed reserves? Functional growth analysis of three Bignoniaceae species. *Functional Ecology*, 433-444.
- Kitajima, K. (1996) Ecophysiology of tropical tree seedlings. In "Tropical forest plant ecophysiology". (Eds. Mulkey, S.S.; Chazdon, R.L.; Smith, A.P.). pp. 559-596.
- Lambers, H.; Chapin III, F.S.; Pons, T.L. (1998) Plant Physiological Ecology. New York: Springer-Verlag, 540p.
- Leishman, M.R.; Wright, I.J.; Moles, A.T.; Westoby, M. (2000) The evolutionary ecology of seed size. In *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. (Ed. M. Fenner) pp. 31-57. (University of Southampton: Southampton, UK).
- Löwe, T.R.; Dillenburg, L. R. (2011) Changes in light and nutrient availabilities do not alter the duration of use of seed reserves in *Araucaria angustifolia* seedlings. *Australian Journal of Botany* 59:32-37.
- Mamo, N.; Mihretu, M.; Fekadu, M.; Tigabu, M.; Teketay, D. (2006) Variation in seed and germination characteristics among *Juniperus procera* populations in Ethiopia. *Forest Ecology and Management* 225: 320-327.

- Mantovani, A.; Morellato, L.P.C.; Reis, M.S. (2004) Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. *Revista Brasileira de Botânica* 27: 787-796.
- Mccready, R.M; Guggolz, A.; Silveira, V.; Owens, H.S. (1950) Determination of starch and amylase in vegetables: application to peas. *Analytical Chemistry* 22: 1156-1158.
- Myers, J.A.; Kitajima, K. (2007) Carbohydrate storage enhances seedling shade and stress tolerance in a neotropical forest. *Journal of Ecology* 95: 383-395.
- Osunkoya, O. O.; Ash, J. E.; Hopkins, M.S. Graham, A.W. (1994) Influence of seed size and seedling ecological attributes on shade-tolerance of rain-forest tree species in northern Queensland. *Journal of Ecology* 82: 149-163.
- Parker, W.C.; Noland, T.L.; Morneault, A.E. (2006) The effects of seed mass on germination, seedling emergence, and early seedling growth of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *New Forests* 32:33-49.
- Poorter, L. (1999) Growth responses to 15 rain-forest tree species to a light gradient: the relative importance of morphological and physiological traits. *Functional Ecology* 13: 396-410.
- Poorter, L.; Rose S. A. (2005) Light-dependent changes in the relationship between seed mass and seedling traits: a meta-analysis for rain forest tree species. *Oecologia*, 142: 378-387.
- Saverimuttu, T.; Westoby, M. (1996) Seedling longevity under deep shade in relation to seed size. *Journal of Ecology* 84: 681-689.
- Spoltz, R.M. (1967) Variações em torno do crescimento de mudas de *Araucaria angustifolia* em viveiro. Anais do II Simpósio Florestal de Minas Gerais. Viçosa, Brasil.

- Tompsett, P.B. (1984) Desiccation studies in relation to storage of *Araucaria* seed. *The Annals of Applied Biology* 105: 581-586.
- Upadhaya, K.; Pandey, H.N.; Law, P. S. (2007). The effect of seed mass on germination, seedling survival and growth in *Prunus jenkinsii* Hook. F. & Thoms. *Turk J Bot* 31:31-36.
- Yanlong, H.; Mantang, W.; Shujun, W.; Yanhui, Z.; Tao, M.; Guozhen, D. (2007) Seed size effect on seedling growth under different light conditions in the clonal herb *Ligularia virgaurea* in Qinghai-Tibet Plateau. *Acta Ecologica Sinica* 27 (8): 3091-3108.
- Westoby, M.; Leishman, M.R.; Lord, J. (1996). Comparative ecology of seed size and dispersal. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, London, Series B 351, 1309-1318.

Considerações Finais

O tamanho das sementes está relacionado à tolerância à sombra em espécies arbóreas vegetais (Poorter e Rose 2005). Espécies tolerantes à sombra teriam sementes grandes, cotilédones de armazenamento e lento crescimento, e esta síndrome estaria associada com um longo período de uso das reservas das sementes (Kitajima 2002). A espécie de estudo, *Araucaria angustifolia*, se enquadra como espécie tolerante à sombra (Inoue *et al.* 1979; Duarte e Dillenburg 2000; Franco e Dillenburg 2007) e também é detentora de grandes sementes, sendo o pinhão uma das maiores sementes entre as coníferas (Eckenwalder 2009). Esta semente seria importante como fonte alimentícia para os animais associados à Floresta Ombrófila Mista. No ambiente florestal ocorrem as maiores chances de predação das sementes (Job e Vieira 2008; Brum *et al.* 2010), principalmente por pequenos mamíferos e mecanismos de tolerar a sombra e o dano (tanto à semente quanto à plântula) se fazem necessários.

Nesse sentido, os resultados deste trabalho mostram que, o tempo de uso das reservas das sementes não é afetado por diferentes disponibilidades luminosas e de nutrientes fornecidos as plântulas; entretanto, o tempo durante o qual este uso repercute em crescimento é maior em condições de baixa disponibilidade de luz. No sub-bosque florestal, esta prorrogação no tempo de uso das reservas da semente para o crescimento poderá, juntamente com outros mecanismos de tolerância ao sombreamento, aumentar a longevidade de plantas jovens, na espera por condições de luz mais propícias, como a abertura de uma clareira, para o pleno desenvolvimento.

O acúmulo de reservas no hipocótilo de plantas de *A. angustifolia* também não é influenciado por distintos ambientes de luz e nutrientes em que as plantas se estabelecem. Desta forma a transferência das reservas das sementes ao seu principal

dreno inicial (Dillenburg *et al.* 2010) é contínua e insensível ao ambiente luminoso e nutricional, da mesma forma que o tempo de uso das reservas das sementes. Entretanto, a depleção das reservas hipocotilares é influenciada por estes mesmos fatores, sendo num primeiro momento maior na maior disponibilidade de nutrientes e ao final do experimento na menor disponibilidade luminosa. Sugere-se que as reservas hipocotilares também são utilizadas por um maior período de tempo nas plantas estabelecidas sob condições de sombra.

O maior tamanho das sementes em *A. angustifolia* produz plantas maiores e mais pesadas. Em plantas que crescem no sol, esta vantagem de crescimento persiste e se amplia mesmo após finalizado o estágio de plântula. Sob sombreamento intenso, no entanto, esta vantagem desaparece após este período inicial de vida da planta. Quando plantas sombreadas têm suas partes aéreas severamente danificadas após já terem utilizados tanto as reservas de suas sementes quanto as inicialmente depositadas nos hipocótilos, uma grande mortalidade ocorre, refletindo a falta de reservas de carboidratos para a manutenção e reconstrução de seus tecidos. Quando estas plantas danificadas estão crescendo no sol, a mortalidade é muito menor do que na sombra e o reacúmulo de massa após o dano não é afetado pelo tamanho das sementes que lhes deram origem.

O estágio de plântula é uma das fases mais críticas durante a história de vida das plantas (Hanley *et al.* 2004), e a sobrevivência neste estágio é essencial para o estabelecimento das mesmas. Nesse sentido, todos os padrões aqui observados em *A. angustifolia* sugerem que a espécie expressa o chamado “efeito de reserva” das plantas, descrito por Westoby *et al.* (1996). Este efeito requer que em plantas de sementes grandes, como as de *A. angustifolia*, porções de reservas estocadas nas sementes não sejam comprometidas com o crescimento, podendo ser utilizadas para sustentar a

respiração sob deficiência de carbono (Westoby *et al.* 1996). Dessa forma, durante um período inicial (enquanto as reservas ainda não são totalmente transferidas das sementes à plântula), as sementes têm esta função de “efeito de reserva”. Conforme a transferência das reservas das sementes é concluída e estas são armazenadas no seu principal dreno - o hipocótilo (Dillenburg *et al.* 2010), este assume esta mesma função. Se a planta estiver se desenvolvendo em condições de sombra, este efeito de reserva será prolongado (tanto o da semente quanto o do hipocótilo); entretanto, encontrando as condições ideais de luz para desenvolvimento, a planta iniciará o crescimento autotrófico.

Referências

- Brum, F.T.; Duarte, L.S.; Hartz, S.M. (2010) Seed removal patterns by vertebrate in different successional stages of *Araucaria* forest advancing over southern Brazilian grasslands. *Community Ecology* 11:35-40.
- Dillenburg, L.R.; Rosa, L. M. G.; Mósen, M. (2010) Hypocotyl of seedlings of the large-seeded species *Araucaria angustifolia*: an important underground sink of the seed reserves. *Trees* 24 (4): 705-711.
- Duarte, L.S.; Dillenburg, L.R. (2000) Ecophysiological responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seedlings to different irradiance levels. *Australian Journal of Botany* 48: 531-537.
- Eckenwalder JE (2009) ‘Conifers of the world: the complete reference.’ (Timber Press: Portland, OR).

- Franco, A.M.S.; Dillenburg, L.R. (2007) Ajustes morfológicos e fisiológicos em plantas de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em resposta ao sombreamento. *Hoehnea* 34: 135-144.
- Hanley ME, Fenner M, Whibley H, Darvill B (2004) Early plant growth: identifying the end point of the seedling phase. *New Phytologist* 163, 61–66.
- Inoue, M.T.; Galvão, F.; Torres, D.V. 1979. Estudo ecofisiológico sobre *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze: fotossíntese em dependência à luz no estágio juvenil. *Revista Floresta*, v.10, p.5-9.
- Iob, G.; Vieira, E.M. (2008) Seed predation of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) in the Brazilian Araucaria Forest: influence of deposition site and comparative role of small and ‘large’ mammals. *Plant Ecology* 198: 185-196.
- Kitajima, K. 2002. Do shade-tolerant tropical tree seedlings depend longer on seed reserves? Functional growth analysis of three Bignoniaceae species. *Functional Ecology*, 433-444.
- Poorter, L.; Rose S. A. 2005. Light-dependent changes in the relationship between seed mass and seedling traits: a meta-analysis for rain forest tree species. *Oecologia*, 142: 378-387.
- Westoby, M.; Leishman, M; Lord. J. (1996) Comparative ecology of seed size and dispersal. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 351: 1309-1318.