

ALESSANDRA MARA GOGOSZ

GERMINAÇÃO E ESTRUTURA DAS PLÂNTULAS DE *Campomanesia xanthocarpa* O. BERG. (MYRTACEAE) CRESCENDO EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO E SOLO BIORREMEDIADO.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, Área de concentração Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cleusa Bona

Co-orientadores: Dr.^o Paulo César Botosso
Prof.^o Dr.^o Gedir de Oliveira Santos

CURITIBA

2008

A meus pais Marcos e Maria da Graça, por tudo o que alcancei e por quem eu sou.

Ao meu grande amor Nelson, pelo tempo em que passamos juntos na dedicação deste trabalho.

A Deus pela minha vida.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Cleusa Bona, pela orientação, oportunidade, apoio, confiança e paciência.

Ao professor Dr. Gedir de Oliveira Santos, pelas correções e ajuda na redação desse trabalho.

Ao Dr. Paulo Botosso pelo apoio desde a graduação e pelas oportunidades.

Ao biólogo Nilson pelo auxílio no Laboratório de Botânica Estrutural.

Ao professor Dr. Antônio Carlos Nogueira por ceder muitas vezes o Laboratório de Sementes do departamento de Engenharia Florestal e, principalmente pelo apoio.

Ao meu amor Nelson que teve grande participação nesse trabalho, pelo incentivo, pela paciência, pelo auxílio na pesquisa, pelo carinho e principalmente pela amizade e amor.

À minha família, em especial aos meus pais por toda a minha vida, pelo apoio, carinho e por sempre acreditarem em mim. A tia Márcia por todos os anos de incentivo na minha vida e pelo carinho. A Jussara pelo carinho e apoio.

A CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa

Ao Departamento de pós-graduação em Botânica e ao Centro de Microscopia Eletrônica pelo auxílio nessa pesquisa.

À Petrobrás pelo apoio financeiro.

Aos amigos do mestrado pela companhia.

A Deus, pela vida e por tudo....

“Aqueles que tomam por mestre o outro que não seja a natureza, mestra de mestres, se esforçam em vão.”

Leonardo Da Vinci

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
II. REFERÊNCIAS.....	6
CAPITULO 1 – MORFOANATOMIA DA PLANTULA DE <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. BERG. (MYRTACEAE).....	7
RESUMO.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
3.1 Morfologia e desenvolvimento da plântula.....	13
3.2 Anatomia da plântula.....	15
4. REFERÊNCIAS.....	28
CAPITULO 2 – GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. BERG. (MYRTACEAE), EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO E SOLO BIORREMEDIADO.....	31
RESUMO.....	32
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 Coleta e montagem do experimento.....	37
2.2 Análise da germinação.....	37
2.3 Análise do crescimento e da biomassa.....	38
2.4 Análise química e física do solo.....	39
2.5 Estatística.....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.1 Germinação.....	41
3.2 Biomassa e crescimento.....	47
4. CONCLUSÃO.....	58
5. REFERÊNCIAS.....	59

CAPITULO 3 – MORFOANATOMIA DE <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. BERG. (MYRTACEAE) CRESCENDO EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO E SOLO BIORREMEDIADO.....	64
RESUMO.....	65
1. INTRODUÇÃO.....	66
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1 Coleta e montagem do experimento.....	69
2.2 Estudo morfoanatômico.....	69
2.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	71
2.4 Análise química e física do solo.....	72
2.5 Estatística.....	72
3. RESULTADOS.....	73
3.1 Anatomia.....	73
3.1.1 Raiz.....	73
3.1.2 Colo.....	79
3.1.3 Hipocótilo.....	81
3.1.4 Paracotilédone.....	84
3.2 Testes microquímicos.....	89
4. DISCUSSÃO.....	91
5. CONCLUSÃO.....	95
6. REFERENCIAS.....	96
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1 - Ilustração do ramo com folhas e frutos de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae).....5

Capítulo 1

Figura 1 - Estágios de desenvolvimento da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). A – início do desenvolvimento; B – emissão da raiz primária e do hipocótilo em plântulas com três a quatro dias; C – emergência dos paracotilédones seis a sete dias após a protrusão da raiz primária; D – plântula com 30 dias, com paracotilédones totalmente expandidos e início do desenvolvimento dos eofilos; E – plântula com cerca de 60 dias, no início da fase de tirodendro.....20

Figura 2 - Variações no aspecto morfológico dos paracotilédones e eofilos maduros de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). (pc: paracotilédone; ef: eofilo).....21

Figura 3 - Estrutura anatômica da raiz de plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). A – secção longitudinal do ápice, em plântula com sete dias; B – secção transversal em plântula com 30 dias; C - secção longitudinal na zona pilífera em plântula com sete dias; D – secção transversal na zona pilífera em plântula com 30 dias.....22

Figura 4 - Secção transversal da região mediana do hipocótilo de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). A . esquema da plântula com 30 dias; B. plântula com sete dias; C. pormenor anatômico do cilindro vascular; D. plântula com 30 dias; E. pormenor anatômico da região periférica da medula evidenciando a presença de floema interno.....23

Figura 5 - Secção transversal da região mediana do hipocótilo de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), evidenciando a formação do floema interno (seta) e o meristema que dará origem a este (seta).....24

Figura 6 - Secção transversal do hipocótilo de plântula com sete dias, de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), na região do nó. A - esquema da região acima da inserção dos para-cotilédones; B - pormenor anatômico da Figura A; C - região do nó cotiledonar; D - disposição dos pólos de xilema primário no traço foliar; E - esquema do hipocótilo abaixo do nó; F - pormenor anatômico da Figura E.....25

Figura 7 - Estrutura anatômica do paracotilédone (A - E) e do eofilo (F) maduros de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). A. secção transversal da região da nervura central do paracotilédone; B. mesofilo com glândula secretora; C. glândula em secção paradérmica; D. secção transversal do limbo com estômato e idioblasto contendo cristal prismático; E: secção paradérmica da face abaxial do paracotilédone; F: secção transversal da região da nervura central do eofilo.....26

Figura 8 – Ontogênese da glândula esquisolisígena de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). A, B - fase inicial do desenvolvimento em dois planos transversais ortogonais. C, D - fases subseqüentes com início da separação das células centrais em D - (esquisogenia). E - plano paradérmico da região central da glândula. F, G – fases finais do desenvolvimento (lisigenia), com morte das células periféricas.....27

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Área de coleta do solo onde ocorreu o acidente com petróleo e montagem do experimento (A-F). A, B solo contaminado com petróleo; C, D solo biorremediado; E, F solo não contaminado.....40

Figura 2 - A - porcentagem final de germinação e B - índice de velocidade de germinação (IVG) de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. (ns): não significativo, considerando ($\alpha = 0,05$).....41

Figuras 3 - A - porcentagem de germinação e B – índice de sincronia da germinação de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), cada curva e coluna representam a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. “ns” : diferenças não significativa entre as médias, considerando ($\alpha = 0,05$). (C) - solo contaminado por petróleo, (BR) - solo biorremediado, (NC) - solo não contaminado.....42

Figura 4 - Frequência diária de germinação de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada curva representa a média de cinco repetições.....43

Figura 5 - Valores diários de temperatura (°C) máxima, média e mínima em casa de vegetação.....46

Figura 6 - Biomassa das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 (A, C e E) e 60 (B, D e F) dias, em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. (ns): não significativo, ($\alpha = 0,05$).....53

Figura 7 - Biomassa das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 (A) e 60 (B e C) dias, em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. (ns): não significativo, considerando ($\alpha = 0,05$).....54

Figura 8 - Comprimento das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 (A, C e E) e 60 (B, D e F) dias, em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. (ns): não significativo, ($\alpha = 0,05$).....55

Figura 9 – Área foliar das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 (A) e 60 (B e C) dias, em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. (ns): não significativo, considerando ($\alpha = 0,05$).....56

Figura 10 – Morfologia das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) crescendo em solo contaminado com petróleo. A, B, C - lesões em “V” nos paracotilédones e eofilos (seta); D, E, F - necrose no ápice da raiz principal e formação de raízes secundárias; G, enrugamento dos paracotilédones e eofilos; H - estrutura compactada do solo contaminado por petróleo e mortalidade de algumas plântulas (seta); I - camada impregnada de óleo e partículas de solo nos envoltórios da semente (seta).....57

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Esquema da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) mostrando as regiões que foram seccionadas. A – região mediana do paracotilédone; B – região mediana do hipocótilo; C – região do colo; D – região a um centímetro do ápice; E – região do ápice da raiz.....70

Figura 2 – Parâmetros anatômicos da raiz a um centímetro do ápice das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 dias, em solo contaminado por

petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. ns: não são significativamente diferentes, considerando ($\alpha = 0,05$).....75

Figura 3 - Secções transversais da raiz a um centímetro do ápice de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) cultivadas em solo contaminado com petróleo (A, B), solo biorremediado (C, D) e solo não contaminado (E, F). A, C, E – região evidenciando a ed: endoderme; ct: córtex; fl: floema; mx: metaxilema; px: protoxilema, pc: periciclo. B, D, F – região evidenciando a ep: epiderme; ex: exoderme e ct: córtex.....76

Figura 4 - Secções longitudinais do ápice da raiz de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) em solo contaminado por petróleo. A - setas indicando a bifurcação do ápice e acúmulo de mucilagem. B - sinuosidade no ápice e acúmulo de mucilagem (seta). C - presença de mucilagem (seta) e células da coifa com parede mais espessa. D, E – presença de mucilagem e parede celular mais espessa (seta); F - setas evidenciando parede celular mais espessa; G – formação de raiz secundária.....77

Figura 5 - Secções longitudinais do ápice da raiz de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). A – estrutura geral do ápice em solo biorremediado. B - estrutura geral do ápice em solo não contaminado. A, C, E - solo biorremediado. B, D, F – solo não contaminado. C, E – meristema apical evidenciando ep: epiderme; ex: exoderme; ed: endoderme; ct: córtex; pc: prócambio; cf: coifa; pm: prómeristema. D, F – meristema apical evidenciando o mf: meristema fundamental; cv: cilindro vascular e ed: endoderme.....78

Figura 6 - Valores das médias para região do colo das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 dias, em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. ns: não são significativamente diferentes, considerando ($\alpha = 0,05$).....79

Figura 7: Secções transversais da região do colo de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) cultivadas em solo contaminado com petróleo (A, B), solo biorremediado (C, D) e solo não contaminado (E, F). A, C, E – região evidenciando a ep: epiderme; cb: câmbio; ct: córtex; fl: floema; mx: metaxilema; px: protoxilema. B, D, F – região evidenciando fi: floema interno; cs: célula secretora e md: medula.....80

- Figura 8 - Valores das médias para região do hipocótilo das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 dias, em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. ns: não são significativamente diferentes, considerando ($\alpha = 0,05$).....82
- Figura 9 - Secções transversais da região mediana do hipocótilo de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) cultivadas em solo contaminado com petróleo (A, B), solo biorremediado (C, D) e solo não contaminado (E, F). A, C, E – região evidenciando a ep: epiderme; ct: córtex; gl: glândula; cs: célula secretora. B, D, F região evidenciando ct: córtex; cb: câmbio; xs: xilema secundário; fl: floema; fi: floema interno; cs: célula secretora e md: medula.....83
- Figura 10 - Valores das médias para região dos paracotilédones das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 dias, em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. ns: não são significativamente diferentes considerando ($\alpha = 0,05$).....85
- Figura 11 - Secções transversais da região mediana do paracotilédone de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) cultivadas em solo contaminado com petróleo (A, B), solo biorremediado (C, D) e solo não contaminado (E, F). A, C, E – região da nervura central evidenciando a ep: epiderme; cl: colênquima; xl: xilema; gl: glândula e cf: composto fenólico. B, D, F – região do mesofilo evidenciando a epd: epiderme da face adaxial; epb: epiderme da face abaxial; pp: parênquima paliçádico; pl: parênquima lacunoso; id: idioblasto; es: estômato.....86
- Figura 12 - Superfície adaxial dos paracotilédones de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) cultivadas em solo contaminado com petróleo (A, B), solo biorremediado (C, D) e solo não contaminado (E, F). A, F - parede celular e tricoma tector. B, C, E – sinuosidades na parede celular (seta). D – parede celular evidenciando as estrias epicuticulares (seta)...87
- Figura 13 - Superfície abaxial dos paracotilédones de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) cultivadas em solo contaminado com petróleo (A, B), solo biorremediado (C, D) e solo não contaminado (E, F). A, C – região da nervura central evidenciando os tricomas. B, D, E, F – região evidenciando as células da epiderme. es: tr: tricoma tector; es: estômato; gl: glândula.....88

Figura 14 - Testes microquímicos na região do hipocótilo da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) em solo não contaminado. A e B - epiderme e tricoma tector com lipídio (seta); C e D – parênquima cortical com amido (seta); E e F – epiderme e parênquima cortical com compostos fenólicos (seta).....90

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 2**

Tabela 1 – Análise química do solo contaminado (C), biorremediado (BR) e não contaminado (NC).....	48
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Análise química do solo contaminado (C), biorremediado (BR) e não contaminado (NC).....	48
--	----

RESUMO

Em 2000, ocorreu um vazamento de petróleo na área da Refinaria Getúlio Vargas (REPAR/PETROBRAS), em Araucária – PR, contaminando o solo em áreas de Floresta Mista existentes no local. Cerca de cinco anos após a contaminação e aplicação de processos de biorremediação, pretende-se, identificar os efeitos do solo contaminado por petróleo e do solo biorremediado na germinação, no crescimento e na morfoanatomia das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa*. Esta espécie é arbórea, heliófita que ocorre no local do acidente. O experimento foi montado com solo proveniente da REPAR, seguindo um delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos: solo contaminado (C), solo biorremediado (BR), solo não contaminado (NC); e cinco repetições com 50 sementes cada. A porcentagem e a velocidade de germinação (IVG), a produção de biomassa e o comprimento das plântulas foram avaliados. As plântulas foram coletadas com 30 e 60 dias de idade, sendo as amostras fixadas, incluídas em historresina, seccionadas em micrótomo, e montadas de forma permanente. Não houve diferença significativa na porcentagem e na velocidade da germinação. Em geral, as plântulas em solo biorremediado tiveram maior crescimento e biomassa em comparação com o solo não contaminado e com o contaminado. Estes resultados podem estar indicando a redução dos efeitos da contaminação pelo processo de biorremediação. A plântula é epígea, fanerocotiledonar, com para-cotilédones e eofilos simples, opostos. O para-cotilédone e o eofilo apresentam características morfológicas e anatômicas semelhantes. O hipocótilo é o principal órgão de reserva. Observou-se a presença de glândulas e células secretoras com conteúdos, em praticamente todas as partes da plântula, exceto na raiz. A contaminação afetou a morfologia e a anatomia das plântulas, principalmente da raiz.

Palavras-chave: Contaminação; morfologia; anatomia; *Campomanesia xanthocarpa*.

ABSTRACT

In 2000, there was an oil spill in the Getúlio Vargas refinery (REPAR/PETROBRAS) area, Araucária - PR, Brazil, contaminating the soil in areas of Mixed Forest, existing at the site. About five years after the contamination and implementing processes of bioremediation, it is intended to identify the effects of soil contaminated by petroleum, and soil biorremediated, in germination, growth and morfoanatomy of *Campomanesia xanthocarpa* seedlings. This is a tree species heliophyla that occurs at the site of the accident. The experiment was mounted with soil from REPAR, following a completely randomized design, with three treatments: contaminated soil (C), bioremediated soil (BR) and uncontaminated soil (NC), and five replicates with 50 seeds each. The percentage and speed of germination (IVG), the production of biomass and length of the seedlings were evaluated. Seedlings were collected with 30 and 60 days old, and the samples fixed, included in historesin, sectioned in microtome, and mounted on a permanent slide. There was no significant difference in percentage and speed of germination. In general, the seedlings in soil bioremediated had higher biomass growth compared with contaminated and not contaminated soil. These results may be indicating the reduction of the effects of the contamination by the process of bioremediation. The seedling is epigeal, phanerocotylar, with paracotyledons and eophylls simple, opposites. The paracotyledons and eophyll have similar anatomical and morphological characteristics. The hypocotyl is the main body of reserves. There was the presence of glands and secretory cells with content, in virtually all parts of the seedling, except at the root. The contamination affected the morphology and anatomy of the seedlings, especially the root.

Key-words: Contamination; morphology; anatomy; *Campomanesia xanthocarpa*.

I INTRODUÇÃO GERAL

O petróleo é uma mistura complexa de componentes orgânicos, sendo a maior parte composta por hidrocarbonetos. Esse é produto da biomassa final de longos períodos geológicos, por complexas reações que ocorrem sob condições de alta pressão e temperatura, em formações sedimentares. Os componentes do petróleo podem ocorrer de forma gasosa, que é chamado de gás natural, de forma líquida, chamada de óleo cru e sólido ou semi-sólido que é chamado de asfáltico (FREEDMAN, 1993).

Os hidrocarbonetos são quantitativamente os mais importantes constituintes do petróleo, eles podem ser classificados em três grandes grupos: hidrocarbonetos alifáticos, acíclicos ou aromáticos. O efeito tóxico dos hidrocarbonetos pode ser influenciado por uma série de fatores, tais como: a quantidade de óleo derramado; o tipo de óleo e os componentes tóxicos; a frequência e o tempo de exposição; mudanças no clima e a quantidade de oxigênio (BAKER, 1970; FREEDMAN, 1993).

A poluição por petróleo pode ser causada por qualquer derramamento de óleo cru ou produto refinado. Entretanto, os casos mais graves de poluição envolvem o derramamento de petróleo ou fluídos de metais pesados, provindos de tanques ou perfurações em plataformas no oceano, por barcos ou navios (FREEDMAN, 1993).

Os impactos causados por acidentes com petróleo e seus derivados podem ser evidenciados logo após um derramamento, tendo como consequência imediata à morte da fauna, da vegetação e contaminação das águas. Porém, ao longo do tempo, os efeitos desses acidentes ainda podem permanecer no ambiente, prejudicando os ecossistemas (FREEDMAN, 1993).

Diversos fatores ambientais podem influenciar na reprodução e crescimento das plantas; indiretamente podem afetar os processos fisiológicos (especialmente relacionados aos carboidratos e reguladores vegetais) e diretamente, induzir à injúria. Entre esses, os mais importantes são: a intensidade luminosa, o suplemento de água, a temperatura, a fertilidade do solo e a poluição (KOZLOWSKI & PALLARDY, 1997).

A extensão em que as funções vitais são afetadas pelos poluentes e se há danos visíveis, depende de muitas variáveis, tanto bióticas como abióticas. As variáveis mais importantes a serem considerados são as espécies, a forma de crescimento, a idade, a fase da atividade da planta, o vigor geral do vegetal, as

condições climáticas e edáficas, as propriedades químicas, a concentração, o momento e a duração do poluente (LARCHER, 2000). Além disso, a contaminação por petróleo altera as propriedades físicas e químicas do solo, tornando-o hidrofóbico, o que pode resultar na redução na disponibilidade de água e nutrientes para as plantas (BAKER, 1970; LI *et al.*, 1997).

Para uma melhor compreensão dessas relações, é importante considerar tanto o ambiente em que as plantas estão sujeitas, quanto a sua estrutura como um todo. Dentro deste contexto, conhecer a dinâmica das espécies em seu habitat é o primeiro passo para compreender suas alterações em relação aos fatores de estresse.

Como organismos sedentários, as plantas estão sempre expostas ao estresse das emissões locais, e em maior intensidade do que os humanos ou os animais. Por essa razão, elas podem ser utilizadas como bioindicadores em relação a uma variedade de substâncias tóxicas. Bioindicadores são organismos, ou uma comunidade de organismos sensíveis à poluição, que respondem por meio de alterações dos seus processos vitais (indicadores por meio de respostas), ou pela acumulação do poluente (indicadores por meio da acumulação) (LARCHER, 2000).

A biorremediação é uma tecnologia que vem ganhando importância na comunidade científica, uma vez que, o aumento da poluição está destruindo os ecossistemas naturais. O uso de microorganismos no solo para degradar os contaminantes, como hidrocarbonetos, é uma alternativa que pode minimizar os prejuízos ambientais.

Uma planta que cresce em condições ideais tem um contato adequado entre a estrutura da raiz e a matriz do solo, o que permite o suprimento de oxigênio e água. No entanto, se as raízes crescem em um ambiente poluído por petróleo, as partículas do solo são cobertas com uma camada hidrofóbica que reduz a disponibilidade de água e aumenta a demanda por oxigênio dos microorganismos no solo. Isto causa o estresse anóxico e hídrico e, adicionalmente, a natureza hidrofóbica do poluente também causa um estresse químico (LARCHER, 2000).

KINAKO (1981) examinou os efeitos da poluição por óleo em diversas espécies de plantas e sobre a produtividade de um ecossistema. O poluente reduziu drasticamente a estrutura e complexidade da comunidade e também deixou um efeito adverso significativo na produtividade da vegetação. A poluição também pode contribuir indiretamente em outros aspectos da deterioração do habitat como, por

exemplo, a erosão. Isto pode ocorrer quando a recuperação da vegetação após um derramamento de petróleo for lenta. A superfície do solo sem vegetação pode ser exposta aos vários agentes climáticos, antes do estabelecimento da cobertura de plantas protetoras.

PROFFIT *et al.* (1995) relataram o efeito do óleo em plântulas de mangue em diferentes condições ambientais e observaram que houve redução no crescimento tanto do caule, como na produção e tamanho das folhas. ALKIO *et al.* (2005) observaram que o hidrocarboneto policíclico aromático (fenantreno) causou sintomas de estresse, como redução do crescimento, deformidade e redução dos tricomas, clorose, atraso na florescência, aparecimento de manchas brancas, atraso no desenvolvimento e lesões necróticas.

Em julho de 2000, ocorreu um grave acidente ambiental na área da Refinaria Getúlio Vargas (REPAR), pertencente à Petrobrás, localizada em Araucária – PR, onde foram derramados quatro milhões de litros de petróleo. O acidente afetou consideravelmente as formações vegetacionais existentes no local, contaminando também o solo, a fauna e os rios Barigui e Iguaçu. Parte desta área está sendo submetida a um processo de biorremediação, visando baixar os valores de TPH (Hidrocarbonetos Totais do Petróleo) a um nível não tóxico.

Campomanesia xanthocarpa O. Berg. (guabirobeira) é espécie arbórea, com ocorrência desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. De acordo com REITZ (1977) trata-se de uma espécie heliófita, seletiva higrófito, até mesófito, sendo bastante freqüente na Floresta Ombrófila Mista, especialmente nos solos úmidos da floresta fluvial, nos capões, e em áreas mais abertas da floresta secundária. É uma árvore de médio porte, de copa densa e arredondada, casca pardo-acinzentada. As folhas são opostas, simples, ovalado-oblongas, ápice acuminado-agudo, base obtusa, longos pecíolos, venação bem evidente, com veias laterais conectadas próximo da margem da folha, por uma série de arcos fortemente curvados. As flores são melíferas, de cor branca e os frutos são do tipo baga, globoso, de coloração amarelada. *C. xanthocarpa* pode ser utilizada como espécie ornamental e é indicada para plantio em áreas degradadas (Figura 1).

C. xanthocarpa está presente na formação vegetacional (Floresta Ombrófila Mista) onde ocorreu o acidente. Apresenta grande importância, pois, além de ser espécie freqüente na região da REPAR, seus frutos são bastante apreciados pela

fauna. Em função disso, há necessidade de compreender melhor a potencialidade germinativa, crescimento e desenvolvimento da espécie na área afetada pelo petróleo. Além disso, trabalhos com *C. xanthocarpa* (BONA & SANTOS, 2003; MAYER, 2004) registram que a espécie possui potencial para revegetação de áreas contaminadas com resíduos oleosos.

Este trabalho tem por objetivo estudar a influência do solo contaminado por petróleo e do solo biorremediado, sobre a germinação de sementes, crescimento, desenvolvimento e morfoanatomia de plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae).

Objetivos específicos:

- Caracterizar morfológicamente e anatomicamente as plântulas;
- Analisar o comportamento germinativo das sementes em três tratamentos: solo contaminado por petróleo, solo biorremediado e solo não contaminado;
- Avaliar a morfologia e o crescimento das plântulas nos três tratamentos, considerando medidas de área foliar, comprimento e biomassa das plântulas;
- Analisar e descrever as possíveis diferenças qualitativas e quantitativas na estrutura anatômica das plântulas entre os três tratamentos.

O presente trabalho foi dividido em três capítulos para facilitar futuras publicações. O primeiro capítulo consta da descrição morfológica e anatômica das plântulas de *C. xanthocarpa*. Pois, para compreender as variáveis que exercem influência sob as plântulas, relacionadas com a contaminação, faz-se necessário entender a estrutura dessas como um todo. No segundo capítulo, pretende-se compreender o crescimento e a morfologia das plântulas dessa espécie, em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado. O terceiro capítulo, por sua vez, tem o objetivo de analisar as possíveis diferenças qualitativas e quantitativas na anatomia das plântulas, crescendo em solo contaminado e biorremediado.



Figura 1 - Ilustração do ramo com folhas e frutos de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae).

Fonte: O autor (2008).

II REFERÊNCIAS

ALKIO, M.; TABUCHI, T. M.; WANG, X. & COLÓN-CARMONA, A. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 421, p. 2983-2994, November 2005.

BAKER, J. M. The effects of oils on plants. **Environmental Pollution**, v.1, p. 27-44, 1970.

BONA, C; SANTOS, O.G. **Adaptações morfo-fisiológicas de espécies vegetais crescendo em solo contaminado com petróleo**. Curitiba: FUNPAR-UFPR, 2003. Relatório técnico.

FREEDMAN, B. **Environmental Ecology: the ecological effects of pollution, disturbance, and other stress**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1993, 606 p.

KINAKO, P. D. S. Short-term effects of oil pollution on species numbers and productivity of a simple terrestrial ecosystem. **Environmental Pollution**, v. 26, p. 87-91, 1981.

KOZLOWSKI, T. T. & PALLARDY S. G. **Growth Control in Wood Plants**. San Diego: Academic Press, 1997. 640 p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. 531p.

LI, X.; FENG, Y.; SAWATSKY, N. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. **Plant soil**, Rotterdam, v.192, n.2, p. 219-226, 1997.

MAYER, J. L. S. **Impacto do solo contaminado com petróleo no crescimento e desenvolvimento de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae)**. 82 f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PROFFIT, C. E.; DEVLIN, D. J. & LINDSEY, M. Effects of oil on mangrove seedlings grown under different environmental conditions. **Marine Pollution Bulletin**, v. 30, n.12, p. 788 - 793, 1995.

REITZ, P. R. Mirtáceas In: **Flora Ilustrada Catarinense**. (C. D. Legrand & R. M. Klein, Eds). Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues, 1977.

CAPÍTULO 1

MORFOANATOMIA DA PLÂNTULA DE *Campomanesia xanthocarpa* O. BERG. (MYRTACEAE)

RESUMO

Campomanesia xanthocarpa O. Berg. (guabirobeira) é espécie arbórea, heliófita, com ocorrência desde o Estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. Visando descrever a morfologia e anatomia da plântula desta espécie, sementes foram coletadas e plantadas, utilizando-se terra preta e vermiculita como substrato. Plântulas foram coletadas para análise da morfologia desde a protrusão da radícula até a fase em que são omitidos os primeiros pares de eofilos. Para a análise anatômica coletaram-se plântulas com sete e 30 dias, sendo as amostras fixadas em glutaraldeído (1%) + formaldeído (4%), incluídas em historesina, seccionadas em micrótomo, e montadas de forma permanente. Foram descritas e ilustradas as fases de desenvolvimento da plântula e as características relevantes dos diversos órgãos. A plântula é epígea, fanerocotiledonar, com paracotilédones e eofilos simples, opostos. Nas plântulas com sete dias, observa-se o início da formação do câmbio vascular, sendo que as de 30 dias já se encontram em crescimento secundário. O paracotilédone e o eofilo apresentam características morfológicas e anatômicas semelhantes. O hipocótilo é o principal órgão de reserva, contendo grãos de amido, especialmente nas plântulas com sete dias. Observou-se a presença de glândulas e células secretoras com diversos tipos de conteúdos em praticamente todos os órgãos, exceto na raiz. A epiderme do paracotilédone, eofilos e hipocótilo apresenta tricomas tectores unicelulares. Idioblastos com cristais prismáticos são comuns no mesofilo do paracotilédone e eofilo. Diversas características observadas podem ter valor taxonômico e para o entendimento da auto-ecologia da espécie.

Palavras-chave: Plântula; morfologia; anatomia; guabiroba.

1 INTRODUÇÃO

Campomanesia xanthocarpa O. Berg. (guabirobeira) é espécie arbórea que ocorre desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. Trata-se de uma espécie heliófita, seletiva higrófito até mesófito, sendo bastante freqüente na Floresta Ombrófila Mista, especialmente nos solos úmidos das formações aluviais, nos capões, e em áreas mais abertas das florestas secundárias (REITZ, 1977). Os frutos desta espécie, tais como de outras do mesmo gênero, são consumidos por várias espécies de pássaros e mamíferos, sendo também usados na produção de doces caseiros, sorvetes, aguardente, licores e refrescos (VALLILO *et al.*, 2004). Além disso, *C. xanthocarpa* é indicada para plantios em áreas degradadas e pode ser utilizada como espécie ornamental (SOUZA & LORENZI, 2005).

Assim como ocorre com grande parte da flora brasileira, pouco se conhece sobre os aspectos morfológicos e anatômicos das plantas de *C. xanthocarpa* no início do seu desenvolvimento. Tanto o comportamento germinativo da semente, quanto o desenvolvimento inicial da planta, são estágios críticos para o estabelecimento das espécies vegetais e, portanto, pesquisas sobre estes aspectos são muito relevantes para o conhecimento da espécie como um todo.

Nas plantas em geral, o início da germinação ocorre com a embebição da semente, produzindo um aumento de volume e o rompimento de seus envoltórios. A radícula cresce dando origem à raiz primária, que rapidamente penetra no solo e se ramifica, passando a exercer a função de absorção. Simultaneamente, produz-se um crescimento que eleva a plúmula, colocando-a em condições de iluminação adequadas para seu desenvolvimento (BELTRATI & PAOLI, 2003). A fase compreendida entre a germinação consumada da semente até a formação da primeira folha ou eofilo caracteriza o estágio de plântula. Após esta fase, entre o final do desenvolvimento do primeiro eofilo na plântula até o momento em que aparecem os primeiros nomofilos, caracteriza-se o estágio de tirodendro (SOUZA, 2003).

Os trabalhos de morfologia de plântulas têm merecido atenção há algum tempo, tanto com o objetivo de ampliar os conhecimentos morfoanatômicos, quanto para o reconhecimento e identificação de plântulas, dentro de um enfoque ecológico (OLIVEIRA, 1993). Diversos autores relatam que as características das plântulas freqüentemente estão relacionadas com as condições ambientais de ocorrência das espécies (VOGEL, 1980; WRIGHT *et al.*, 2000; IBARRA-MANRÍQUEZ *et al.*, 2001).

Portanto, uma análise detalhada desta fase possibilita um entendimento da auto-ecologia e do desenvolvimento inicial das espécies nos ambiente de ocorrência natural.

Alguns trabalhos no Brasil têm contribuído para os estudos de taxonomia e ecologia a partir da análise de plântulas de espécies nativas. KUNIYOSHI (1983) analisou o desenvolvimento das plântulas de várias espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Mista, além de trazer informações sobre frutos e sementes. OLIVEIRA & PEREIRA (1987) descreveram o desenvolvimento inicial de algumas espécies de Euphorbiaceae. RESSEL *et al.* (2004), por sua vez, abordaram os aspectos morfofuncionais das plântulas de diversos táxons de uma estação ecológica, em Minas Gerais.

Para algumas famílias botânicas comuns no Brasil, tal como ocorre com Myrtaceae, os trabalhos de morfologia de plântulas são muito escassos. Além disso, a maioria dos trabalhos tem se limitado às características morfológicas, sem abordar a estrutura dos diversos órgãos das plântulas. A análise anatômica certamente permite uma investigação ainda mais aprofundada das espécies, tal como realizada por SOUZA & OLIVEIRA (2004), em plântulas de *Tabebuia avellaneda* Lar. Ex Griseb e *T. chrysotricha* (Mart. Ex Dc.) Standl.

O presente trabalho teve como objetivos analisar e descrever a morfologia e a estrutura anatômica da plântula de *Campomanesia xanthocarpa*, considerando seu desenvolvimento e as características que possam ter importância para a taxonomia e auto-ecologia da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos maduros foram coletados de seis árvores, localizadas no município de Colombo - PR, região da Floresta Ombrófila Mista, em dezembro de 2005. Para a obtenção das sementes foi realizada a despolpa dos frutos em água corrente, com o auxílio de uma peneira. Posteriormente, as sementes foram deixadas por algumas horas sobre jornal, em local sombreado e ventilado, para a secagem.

Foram plantadas 250 sementes, em bandejas plásticas com dez centímetros de altura, contendo terra preta e vermiculita como substrato. As sementes ficaram sob nebulização controlada (a cada 30 minutos), em casa de vegetação, no Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná.

Para análise da morfologia foram coletadas as plântulas desde a protrusão da raiz até o desenvolvimento dos primeiros pares de eofilos (até 60 dias de idade). A morfologia das plântulas foi ilustrada com auxílio de microscópio estereoscópico. As descrições foram realizadas de acordo com as terminologias de VOGEL (1980) e SOUZA (2003).

Para análise anatômica da raiz primária, foram realizadas secções do ápice (longitudinal) e da região a um centímetro acima do ápice (transversal), de plântulas com 30 dias de idade. O colo e a região mediana do hipocótilo foram amostrados em plântulas com sete e 30 dias. Na região do nó paracotiledonar foram feitos cortes seriados, em plântulas com sete dias. Para a análise dos paracotilédones, foram amostradas plântulas com 30 dias e, para os eofilos, com 60 dias, de forma a obter estes órgãos já expandidos. Para todas estas análises, foram amostradas cinco plântulas, tomadas aleatoriamente.

Posteriormente, as amostras foram fixadas em glutaraldeído (1%) + formaldeído (4%) (MCDOWELL & TRUMP, 1976), incluídas em historesina, seccionadas em micrótomo de rotação, distendidas em lâminas e submetidas à coloração com azul de toluidina (O` BRIEN *et al.*, 1965).

As lâminas foram analisadas e os tecidos ilustrados com auxílio de câmara clara acoplada ao microscópio fotônico, no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica da UFPR. As caracterizações anatômicas foram descritas de acordo com as terminologias de VOGEL (1980) e SOUZA (2003).

Foram realizados cortes de material fresco da região um centímetro acima do ápice da raiz, região do colo, região mediana do hipocótilo e região mediana dos

paracotilédones e eofilos. Estes foram submetidos a testes microquímicos com lugol (BERLYN & MIKSCHE, 1976) para detectar amido; sudam III (SASS, 1951) para detectar substâncias graxas e cloreto férrico 10% (JOHANSEN, 1940) para detectar compostos fenólicos. As lâminas foram montadas de forma semipermanente e analisadas em microscópio fotônico no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica da UFPR.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Morfologia e desenvolvimento da plântula

A plântula de *C. xanthocarpa* tem desenvolvimento epígeo, fanerocotiledonar, com paracotilédones foliáceos fotossintetizantes (Figura 1). Estes são definidos por VOGEL (1980) como paracotilédones, pois, em diversas espécies devem ser homólogos aos eofilos, e não diretamente aos cotilédones verdadeiros (haustoriais ou de reserva), que, em tais casos, foram abortados no processo evolutivo. Na espécie estudada isto parece bem evidente quando se considera a grande semelhança morfoanatômica entre o paracotilédone e o eofilo.

O desenvolvimento da plântula de *C. xanthocarpa* inicia-se com a protrusão da raiz primária, a partir do rompimento da parede do diásporo, na região da micrópila (Figura 1 A). Logo nos primeiros dias (três a quatro), é possível observar a emissão de raízes secundárias na região do colo (Figura 1 B e C). Em seguida, ocorre a emergência do hipocótilo (Figura 1 C), inicialmente curvo, glabro, com aspecto robusto, e cor amarelada. Nesta fase também são expostos os paracotilédones, que inicialmente são bem reduzidos. Em poucos dias (dois a três), o hipocótilo torna-se ereto, livrando-se totalmente da parede do diásporo e adquire cor verde.

Segundo DUCKE (1969), em diversos membros de Myrtales, o hipocótilo tem aspecto robusto, sendo esta à região de reserva, em detrimento dos cotilédones, formando o tipo de embrião chamado “macropodial”. De acordo com LANDRUM (1986), a presença de hipocótilo robusto é uma característica típica de embriões dos gêneros de Myrtaceae enquadrados por este autor no “complexo Campomanesia”, em que os cotilédones têm tamanho reduzido.

Após a expansão dos paracotilédones (Figura 1 D), o hipocótilo adquire aspecto lenhoso, coloração castanho-escura, e apresenta estrias longitudinais claras. O colo é bastante distinto, sendo caracterizado por uma pequena constrição na base do hipocótilo. Nesta fase, ocorre o desenvolvimento do primeiro par de eofilos, com filotaxia oposta cruzada, finalizando o estágio de plântula (Figura 1 D).

O paracotilédone e o eofilo maduros têm aspecto muito semelhante entre si quanto à cor, textura, venação e forma do limbo. Ambos são curto-peciolados, glabros, com margem inteira e venação bem evidente, com veias laterais conectadas

próximo da margem da folha, por uma série de arcos fortemente curvados, sendo este o padrão mais comum entre as Myrtaceae, segundo LANDRUM (1986). O paracotilédone tem forma ovada com ápice agudo e base freqüentemente cordiforme, enquanto que o eofilo é elíptico, com ápice agudo a arredondado e base obtusa segundo a classificação de HICKEY (1979), porém observam-se variações neste padrão (Figura 2). Variações morfológicas no limbo foliar são bastante comuns na maioria das espécies, uma vez que as folhas sofrem influência de diversos fatores ambientais (ESAU, 1974), e até mesmo de aspectos relacionados à fase do desenvolvimento e ao estado nutricional dos vegetais (CUTTER, 1987).

Os eofilos (Figura 1 D, E) são semelhantes morfológicamente aos metafílos, indicando que a fase de tirodendro, compreendida entre a plântula e o aparecimento do primeiro metafilo (SOUZA, 2003) é muito curta ou pode até ser desconsiderada nesta espécie.

Algumas características morfológicas das plântulas de *C. xanthocarpa*, tais como o desenvolvimento epígeo, fanerocotiledonar, e a presença de paracotilédones, são muito comuns em espécies heliófitas. Diversos autores ressaltam a função dos para-cotilédones como órgãos fotossintetizantes, que possibilitam um rápido estabelecimento da plântula em ambientes com alta incidência de luz (VOGEL, 1980; RESSEL *et al.*, 2004; WRIGHT *et al.*, 2000). A combinação destes caracteres, segundo IBARRA-MANRÍQUEZ *et al.* (2001), é muito comum entre as espécies que dependem da abertura de clareiras para seu estabelecimento. Tais características coincidem, portanto, com a condição ecológica em que a espécie ocorre com maior freqüência.

3.2 Anatomia da plântula

Raiz - No ápice da raiz primária, em secção longitudinal, identificam-se a coifa parenquimática, formada pelo caliptrogênio, e o tecido pró-meristemático, constituído por células diminutas (Figura 3 A). Logo abaixo, distinguem-se os meristemas protoderme, com pêlos absorventes em formação (Figura 3 C), o meristema fundamental cortical e o procâmbio, ou meristema do cilindro central (Figura 3 C).

Em secção transversal da raiz primária de plântulas com 30 dias, nota-se que essa possui epiderme unisseriada, com células de paredes relativamente espessas. O córtex é formado por exoderme uniestratificada, de paredes celulares pouco espessas, parênquima de paredes delgadas e endoderme contendo compostos fenólicos e estrias de Caspary. O cilindro central varia de pentarco a hexarco, com metaxilema central e cordões floemáticos bem delimitados, localizados entre os pólos de protoxilema. Nesta fase já há cambio e pouco xilema secundário, (Figura 3 B e D).

Hipocótilo - O hipocótilo apresenta córtex parenquimático, com células secretoras subepidérmicas e endoderme com amiloplastídios (bainha amilífera). Em secção transversal da região mediana do hipocótilo, em plântulas com sete dias, nota-se que este órgão apresenta estrutura de transição entre raiz e caule. Isto é evidente pela disposição tangencial dos elementos traqueais do xilema primário, na periferia da medula parenquimática (Figuras 4 A, B, C, E). A condição exarca da raiz passa à endarca, tipicamente caulinar, apenas próximo ao nó paracotiledonar. De acordo VOGEL (1980), esta zona de transição, característica de plântulas, pode ser mais longa ou mais curta, e até mesmo ocupar todo o hipocótilo. Quando esta zona é restrita a uma pequena área é usualmente encontrada na parte superior do hipocótilo.

Em plântulas com 30 dias, diferencia-se uma camada subepidérmica de colênquima no córtex do hipocótilo. Ocorre também a instalação do câmbio e o início da formação dos tecidos vasculares secundários. Nesta fase é possível observar que o cilindro vascular é anfiflóico (Figura 4 A, D), tipo de arranjo em que o floema ocorre tanto externamente quanto internamente ao xilema, segundo CUTTER (1987). Esta é uma característica de ocorrência comum em Myrtaceae. (FAHN, 1982).

Em plântulas com sete dias, no entanto, não se nota a presença de floema interno no hipocótilo, exceto em sua porção basal, próxima ao colo, indicando que sua formação se dá tardiamente em relação ao floema “externo”. De acordo com FAHN (1982), o floema interno pode diferenciar-se tanto do procâmbio, quanto de células de parênquima parcialmente diferenciadas. Este último caso é o que provavelmente ocorre em *C. xanthocarpa*, uma vez que se observou que o floema interno forma-se a partir da divisão de células meristemáticas na periferia da medula, numa fase que coincide, aproximadamente, com o início do crescimento secundário (Figura 4 D, E e 5).

Foi observada a presença de grãos de amido nas células parenquimáticas do córtex e da medula do hipocótilo, em maior quantidade nas plântulas com sete dias, quando comparadas às plântulas com 30 dias, nas quais o amido está concentrado na camada mais interna do córtex. Essa constatação, associada ao aspecto robusto do hipocótilo, sugere sua função como órgão de reserva alimentar da plântula. De acordo com VOGEL (1980) & BELTRATI & PAOLI (2003), ocorrem diversos tipos de plântulas em que o hipocótilo apresenta estas características, assumindo a função de sustentar o desenvolvimento inicial da plântula. Nestes casos os cotilédones normalmente são muito reduzidos ou ausentes, não se desenvolvendo após a germinação.

Nó paracotiledonar - A região do nó caracteriza-se pela presença de um traço foliar unilacunar para cada um dos para-cotilédones, e dois traços caulinares (Figura 6 A - F). Na axila do para-cotilédone ocorre um par de estípulas (Figura 6 A, B). Estas morrem logo no início do desenvolvimento da plântula, antes mesmo da emissão dos eofilos, adquirindo coloração castanho-escura.

Paracotilédones e eofilos - Assim como ocorre com os aspectos morfológicos, o paracotilédone e efilo maduros de *C. xanthocarpa* apresentam características estruturais bastante semelhantes (Figura 7 A - F). Ambos têm epiderme unisseriada, com estômatos anomocíticos na face abaxial (Figura 7 E); mesofilo heterogêneo dorsiventral, composto de uma camada de parênquima paliçádico e duas a quatro de lacunoso; nervura central com colênquima em posição subepidérmica e feixe vascular concêntrico, envolto por uma bainha de esclerênquima.

Num sentido clássico amplo, os cotilédones podem ser de três tipos: de reserva; haustorial; e fotossintetizante (foliáceo). Porém, segundo VOGEL (1980), em diversas espécies, este último tipo deve ser homólogo às folhas dos ramos inferiores (eofilos), e não aos cotilédones propriamente ditos (haustoriais ou de reserva), que, em tais casos, foram abortados. O autor sugere que para estas espécies seja usado o termo paracotilédone. Considerando estas informações, diversas evidências levam a crer que, no caso de *Campomanesia xanthocarpa*, os cotilédones propriamente ditos podem ter sido perdidos durante o processo evolutivo, tendo os paracotilédones assumido sua posição. Dentre as evidências estão:

- A grande semelhança entre para-cotilédone e eofilo, tanto do ponto de vista morfológico (forma, cor, textura, venação), quanto anatômico (epiderme mesofilo, tipo de feixe vascular), sugere que os dois órgãos são homólogos, tal como nos casos citados por VOGEL (1980);

- O aspecto morfológico do hipocótilo e a presença de amido neste órgão sugerem que ele assume a função de sustentar o desenvolvimento inicial da plântula, tornando desnecessária a presença de cotilédones de reserva ou haustoriais;

- De acordo com LANDRUM (1986), as estruturas embrionárias bem desenvolvidas do “complexo *Campomanesia*” - que inclui alguns gêneros da subtribo Myrtiinae – seriam adaptações ao aumento da quantidade de reserva no embrião. O autor descreve, para este complexo, a presença de hipocótilo robusto, normalmente muito maior que os cotilédones (que são às vezes indistintos).

- Nas espécies com este tipo de hipocótilo, cotilédones vestigiais (escamiformes) podem estar presentes no embrião, porém estes não se desenvolvem nas plântulas (VOGEL, 1980; BELTRATI & PAOLI, 2003), ao contrário do que ocorre com os paracotilédones em *C. xanthocarpa*, que se desenvolvem plenamente após a germinação.

Estruturas secretoras – *C. xanthocarpa* apresenta glândulas secretoras, abundantes em praticamente todos os órgãos, com exceção da raiz (Figura 8). Estas têm conteúdo lipídico, conforme verificado através do teste com Sudam III. As células secretoras nos tecidos vegetais podem ser resultados da dissolução de células (lisígenas), ou de sua separação (esquizógena). Nos espaços lisígenos, células parcialmente desintegradas aparecem ao longo da periferia do espaço

(ESAU, 1974). Alguns autores classificam a glândula de óleo das Myrtaceae como tendo origem lisígena, outros, porém, classificam-nas como esquizógenas (FAHN, 1982). Segundo ESAU (1974), lisigenia e esquizogenia podem ser combinadas na formação de espaços secretores.

A formação destas estruturas em *C. xanthocarpa* parece ocorrer como neste último caso, a partir da combinação de esquizogenia, em um primeiro momento, e lisigenia, na fase final do seu desenvolvimento, tratando-se, portanto de glândula esquizo-lisígena, conforme representado na (Figura 8 A-G), na qual estão representadas a fase de separação das células centrais (Figura 8 D, E) e a presença de células rompidas na região periférica da cavidade (Figura 8 F), em glândula plenamente formada (Figura 8 G).

Constatou-se também a presença de células secretoras, na epiderme, no córtex e na medula do hipocótilo, bem como no mesofilo e nervura do paracotilédone e eofilo, sendo mais abundantes nas primeiras camadas do córtex do hipocótilo, especialmente nas plântulas com sete dias. O conteúdo destas células ocorre de diferentes formas e, segundo o resultado do teste com sulfato ferroso, trata-se de compostos fenólicos.

De acordo com ESAU (1974), o conteúdo de células secretoras é freqüentemente constituído de uma combinação complexa de diversas substâncias. Segundo BELTRATI & PAOLI (2003), a presença de compostos fenólicos em órgãos totalmente diferenciados é relacionada com os mecanismos de interação entre plantas e animais, agindo como dissuasivo alimentar e reduzindo a herbívora. Além disso, no caso em que as plantas estão sob estresse hídrico, os compostos fenólicos acumulados nos vacúolos garantem a manutenção do arcabouço celular e integridade dos tecidos.

Idioblastos com cristais prismáticos e drusas ocorrem na nervura, e no mesofilo do para-cotilédone e do eofilo de *C. xanthocarpa*. Além disso, a epiderme apresenta tricomas tectores unicelulares no para-cotilédone, eofilo e hipocótilo. Nestes tricomas ocorre reação positiva com Sudam III, especialmente em sua base, indicando a presença de compostos lipídicos. A partir deste mesmo teste, pode-se constatar ainda a ocorrência de uma cutícula relativamente delgada sobre a epiderme dos paracotilédones e eofilos.

A ocorrência dos tricomas tectores no epicótilo, nos para-cotilédones e nos eofilos, provavelmente deve ter implicações na ecologia da espécie. Diversos

trabalhos têm relatado a função dos tricomas na defesa da planta contra herbivoria (PALEARI & SANTOS, 1998; THEOBALD *et al.*, 1979; CUTTER, 1987), além de sua interferência no processo de fotossíntese devido a alterações na luz absorvida, regulação da temperatura foliar e redução da evapo-transpiração (SMITH *et al.*, 1997). A presença de tricomas tem também importância em estudos de sistemática comparativa (THEOBALD *et al.* 1979), podendo ser utilizada como diagnóstico, de acordo com o tipo e a morfologia.

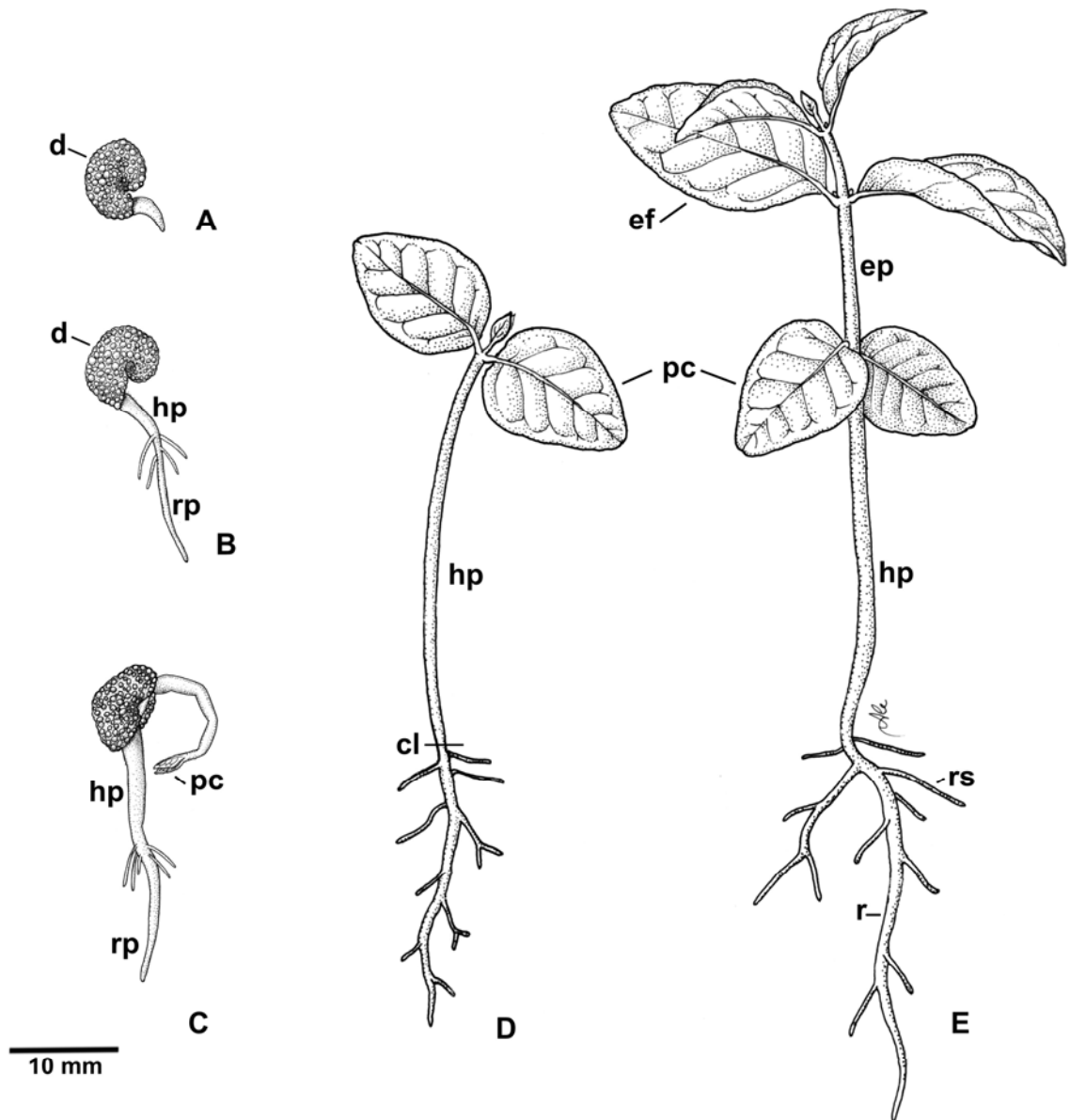


Figura 1 - Estágios de desenvolvimento da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). A – início do desenvolvimento; B – emissão da raiz primária e do hipocótilo em plântulas com três a quatro dias; C – emergência dos paracotilédones seis a sete dias após a protrusão da raiz primária; D – plântula com 30 dias, com paracotilédones totalmente expandidos e início do desenvolvimento dos eofilos; E – plântula com cerca de 60 dias, no início da fase de tirodendro. (cl: colo; d: diásporo; ef: eofilo; ep: epicótilo; hp: hipocótilo; pc: paracotilédone; r: raiz principal; rp: raiz primária; rs: raiz secundária).

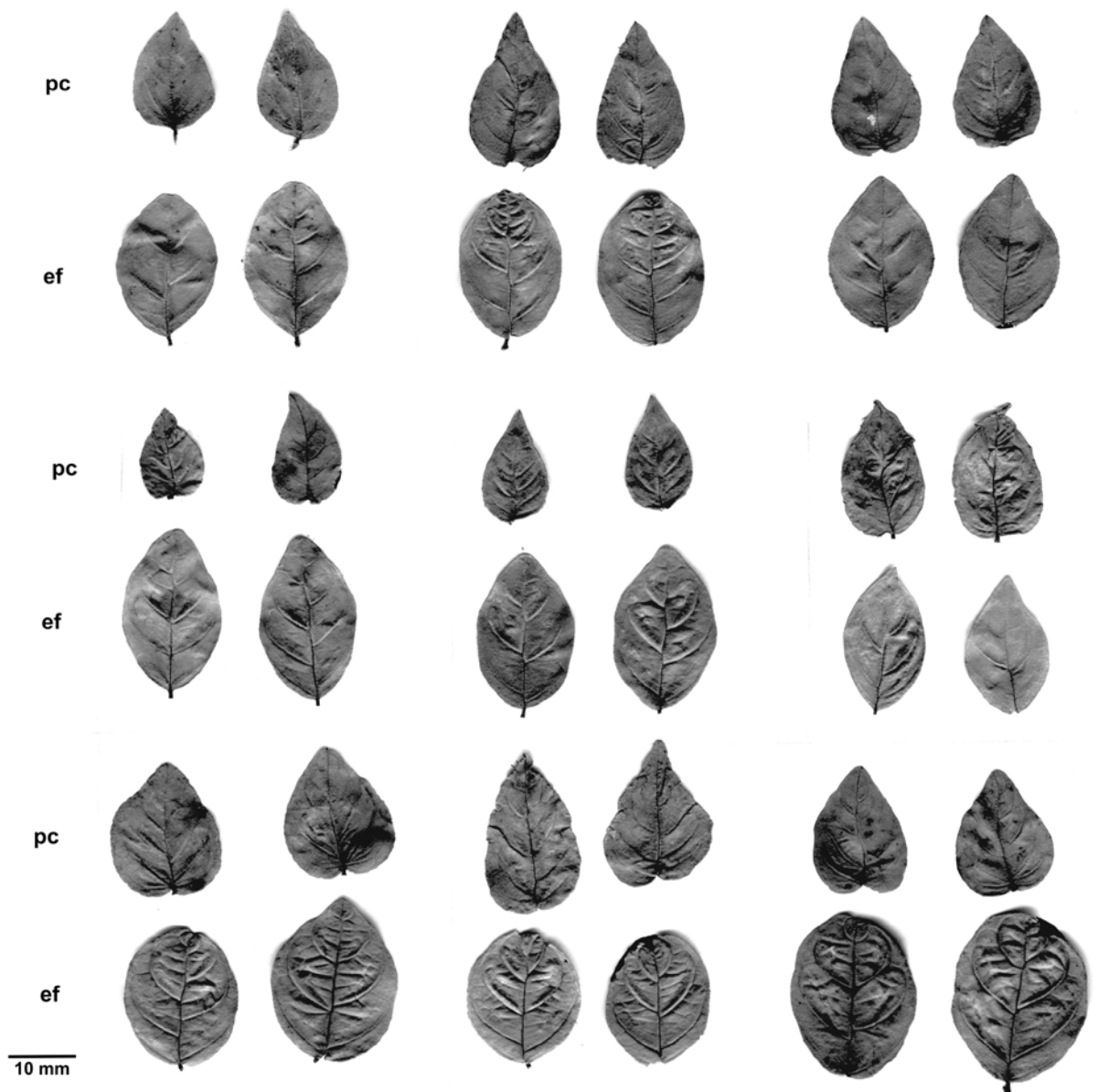


Figura 2 - Variações no aspecto morfológico dos paracotilédones e eofilos maduros de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), (pc: paracotilédone; ef: eophilo).

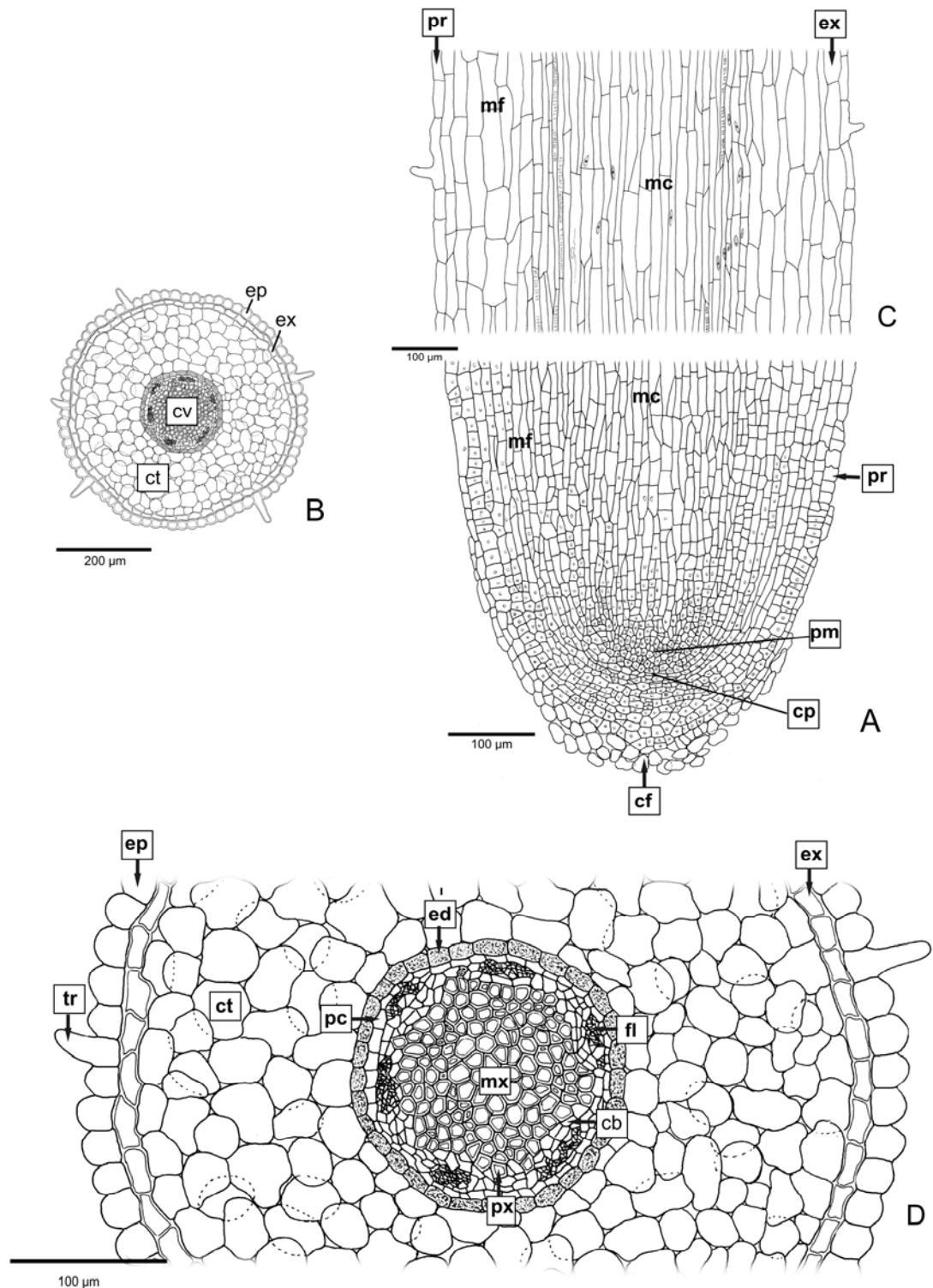


Figura 3 - Estrutura anatômica da raiz de plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). A – secção longitudinal do ápice, em plântula com sete dias; B – secção transversal em plântula com 30 dias; C - secção longitudinal na zona pilífera em plântula com sete dias; D – secção transversal na zona pilífera em plântula com 30 dias. (cb: câmbio; cf: coifa; cp: caliprogênio; ct: córtex; cv: cilindro vascular; ed: endoderme; ep: epiderme; ex: exoderme; fl: floema; mc: meristema do cilindro central; mf: meristema fundamental; mx: metaxilema; pc: periciclo; pm: pró-meristema; pr: protoderme; px: protoxilema; tr: tricoma).

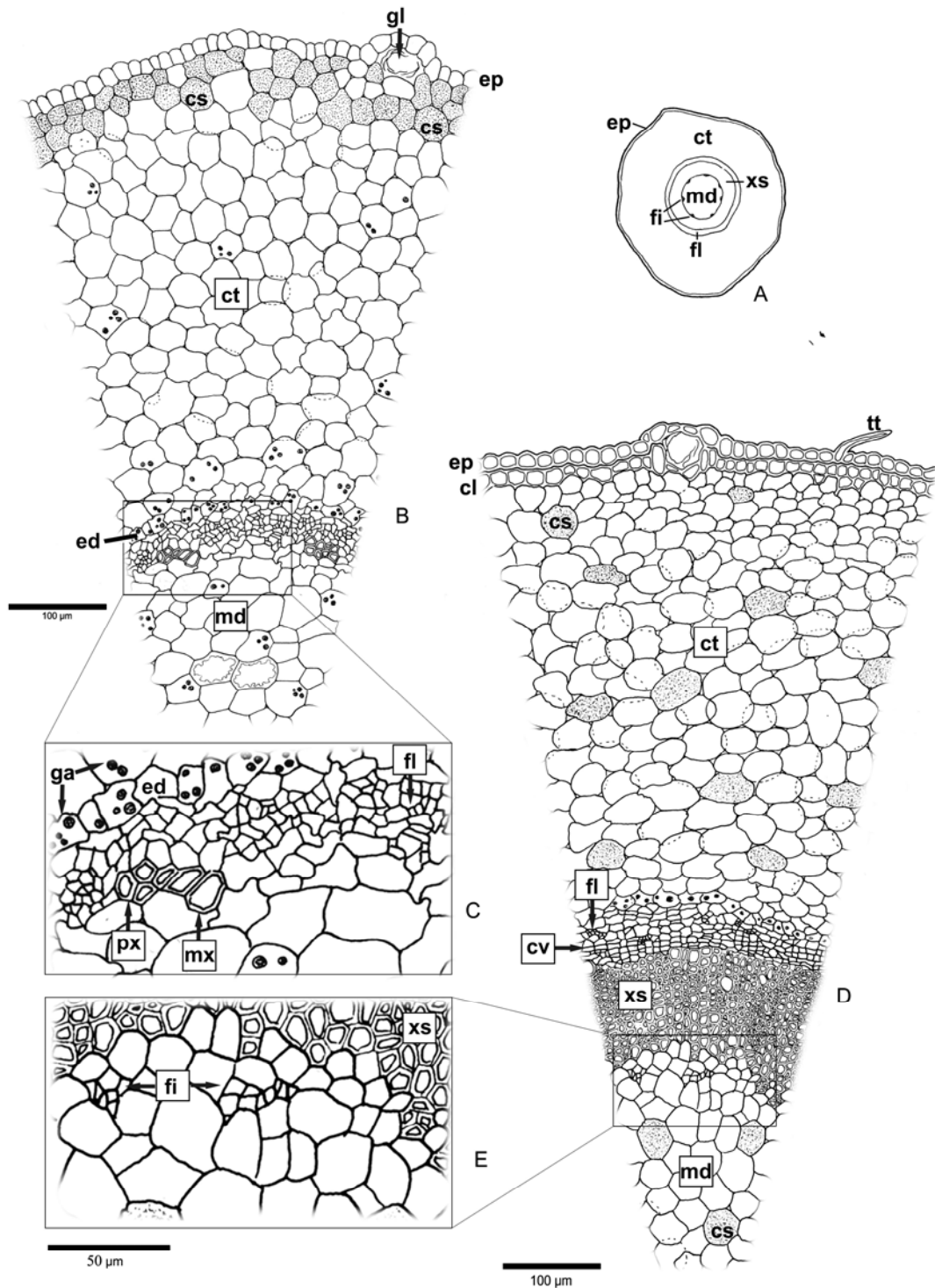


Figura 4 - Secção transversal da região mediana do hypocótilo de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). A - esquema da plântula com 30 dias; B - anatomia do hypocótilo de plântula com sete dias; C - pormenor anatômico do cilindro vascular; D - anatomia do hypocótilo de plântula com 30 dias; E - pormenor anatômico da região periférica da medula evidenciando a presença de floema interno. (cv: câmbio vascular; cl: colênquima; cs: célula secretora; ct: córtex; ed: endoderme (bainha amilífera); ep: epiderme; fi: floema; fi: floema interno; ga: grãos de amido; gl: glândula; md: medula; mx: metaxilema; px: protoxilema; tt: tricoma tector; xs: xilema secundário).

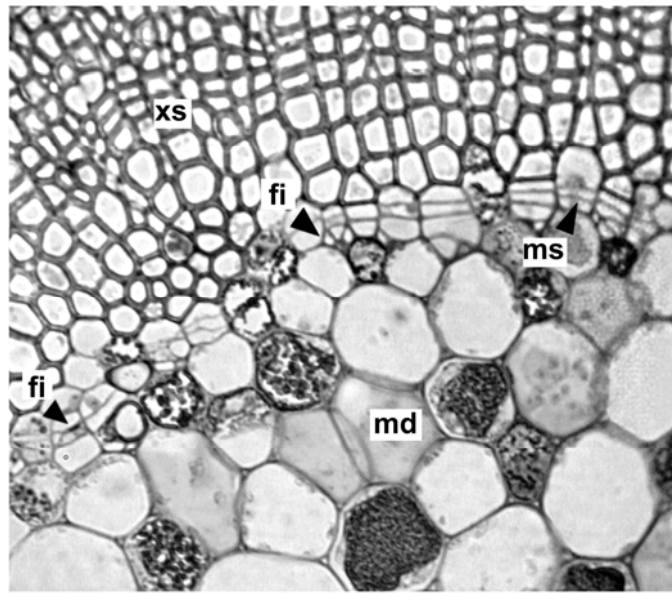


Figura 5 - Secção transversal da região mediana do hipocótilo de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), evidenciando a formação do floema interno (seta) e o meristema que dará origem a este (seta). fi: floema interno, md: medula; ms: meristema.

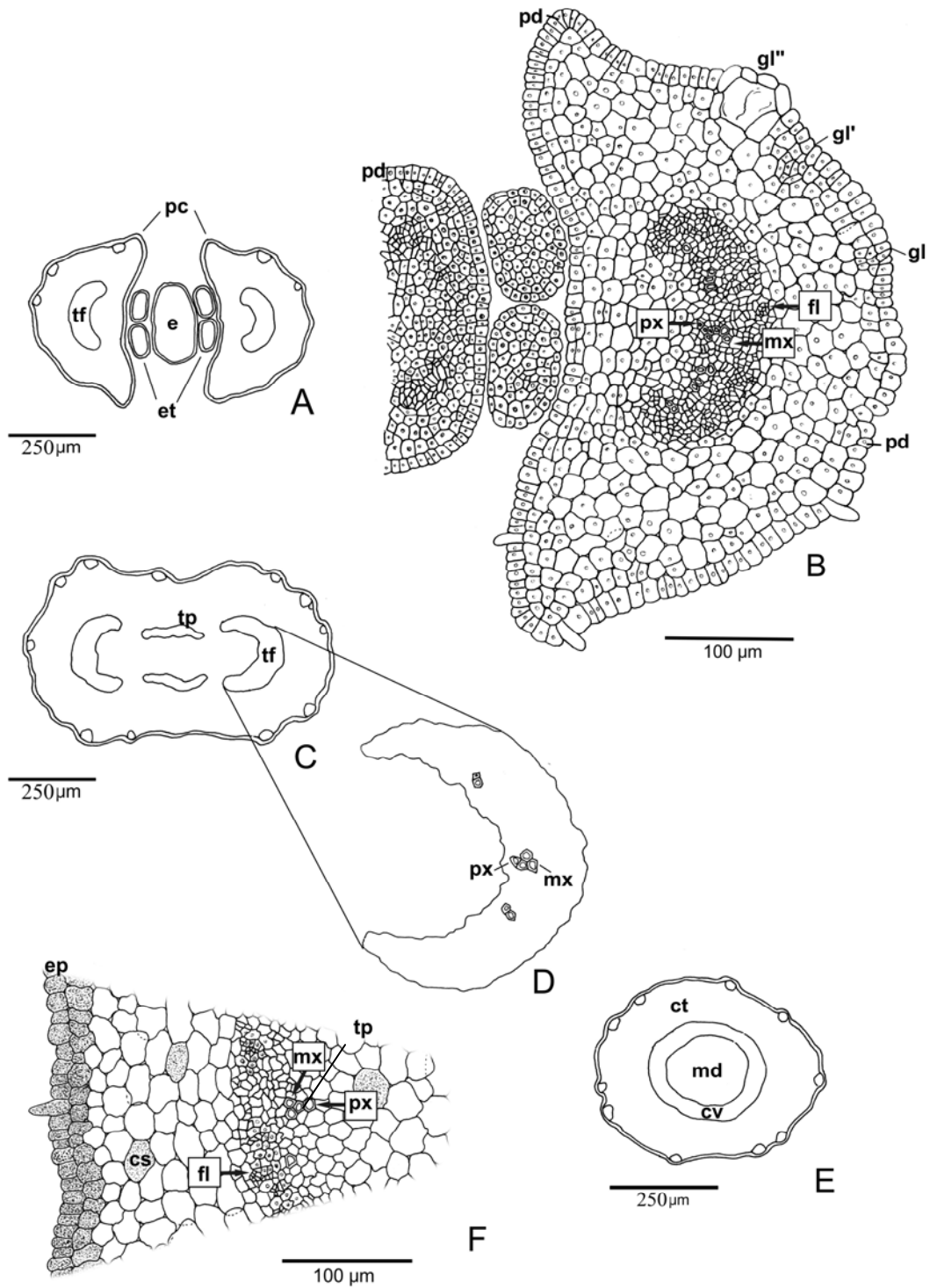


Figura 6 - Secção transversal do hipocótilo de plântula com sete dias, de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), na região do nó. A - esquema da região acima da inserção dos para-cotilédones; B - pormenor anatômico da Figura A; C - região do nó cotiledonar; D - disposição dos pólos de xilema primário no traço foliar; E - esquema do hipocótilo abaixo do nó; F - pormenor anatômico da Figura E. (cs: célula secretora; ct: região do córtex; cv: cilindro vascular; et: estípula; e: epicótilo; ep: epiderme; fl: floema; gl, gl', gl'': ontogênia da glândula secretora; md: região da medula; mx: metaxilema; pc: pecíolo do paracotilédone; pd: protoderme; tp: traço epicotiledonar; tf: traço foliar).

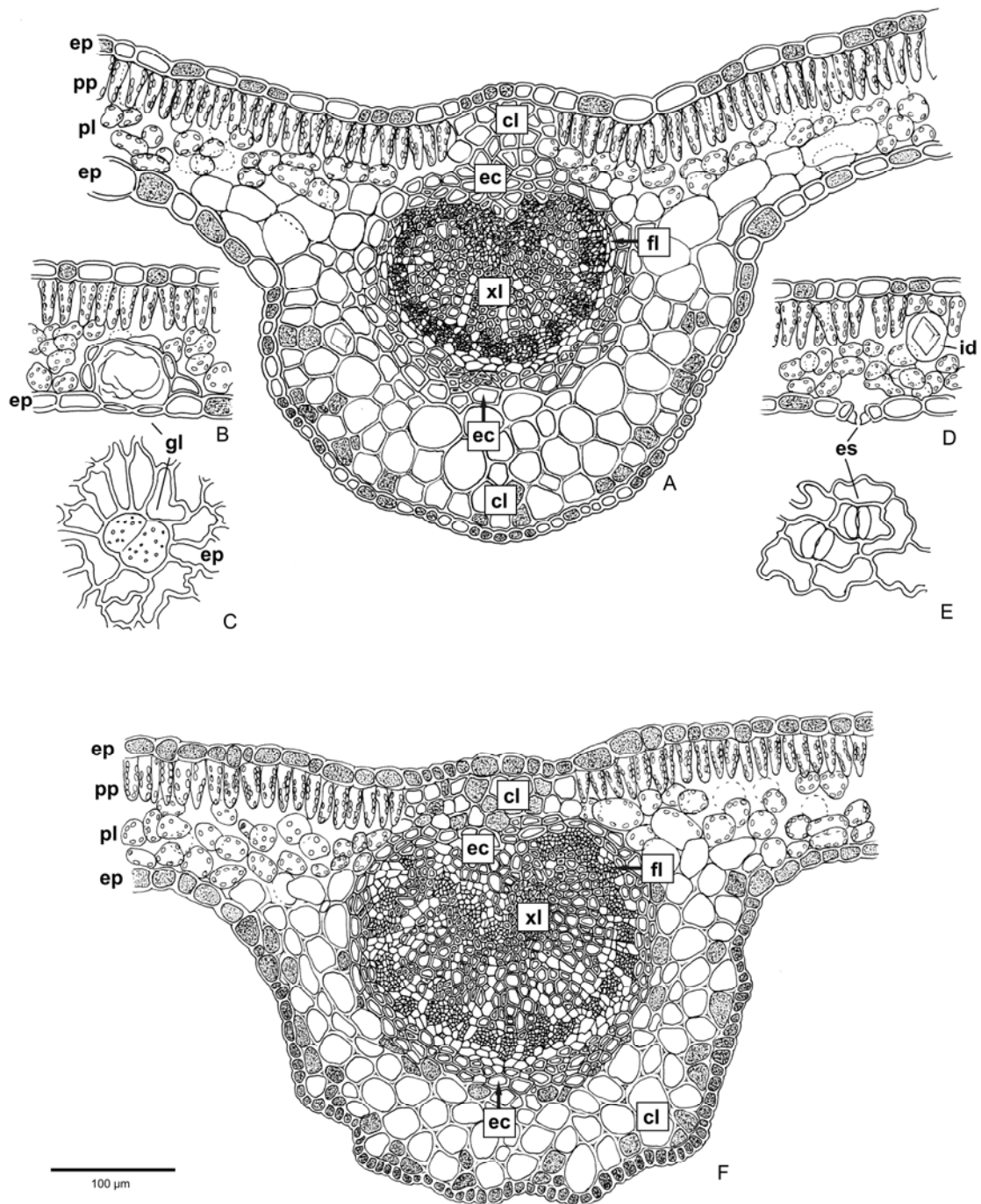


Figura 7 - Estrutura anatômica do paracotilédone (A - E) e do eofilo (F) maduros de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). A. secção transversal da região da nervura central do paracotilédone; B - mesofilo com glândula secretora; C - glândula em secção paradérmica; D - secção transversal do limbo com estômato e idioblasto contendo cristal prismático; E - secção paradérmica da face abaxial do paracotilédone; F - secção transversal da região da nervura central do eofilo. (cl: colênquima; ec: esclerênquima; ep: epiderme; es: estômato; fl: floema; gl: glândula secretora; id: idioblasto; pl: parênquima lacunoso; pp: parênquima paliçádico; xl: xilema).

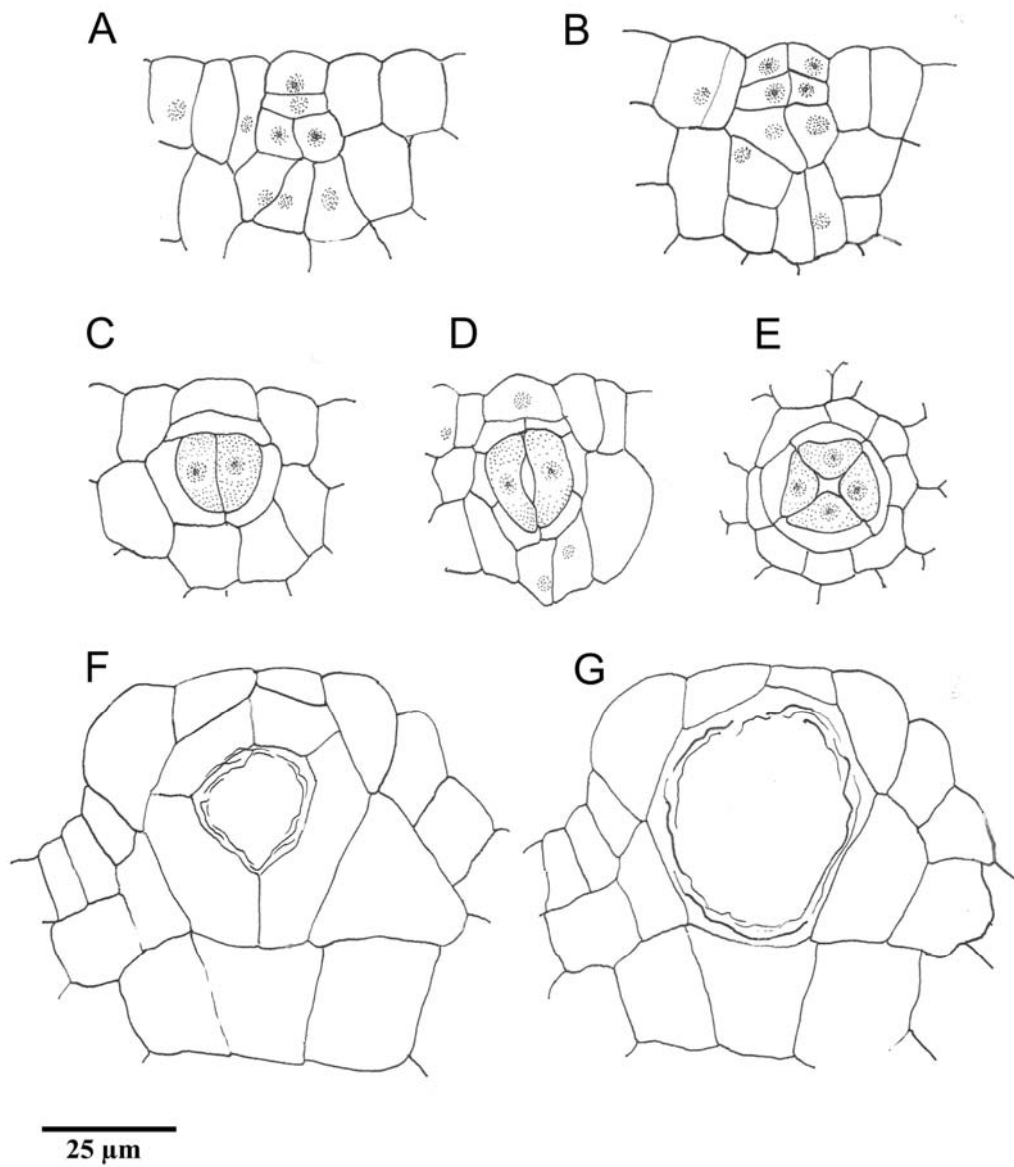


Figura 8 – Ontogênese da glândula esquisolisígena de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). A, B - fase inicial do desenvolvimento em dois planos transversais ortogonais. C, D, E - fases subseqüentes com início da separação das células centrais (esquisogenia). F, G - fases finais do desenvolvimento (lisigenia), com morte das células periféricas.

4 REFERÊNCIAS

BAILEY, I. W. Nodal anatomy in retrospective. **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 37, p. 269-287, 1956.

BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999, 443p.

BELTRATI, C. M.; PAOLI, A. A. S. Sementes. In: da GLORIA, B. A.; GUERREIRO, C. S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003, 399-424p.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: The Iowa State Press, 1976, 326 p.

CUTTER, E. G. **Anatomia Vegetal. Parte II, Órgãos, Experimento Interpretações**. 2.ed. São Paulo: Roca, 1987. 336p.

DUCKE, J. A. On tropical tree seedlings: seeds, seedlings, systems and systematic. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 55, p.125-61, 1969.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Ed. Edgard Blücher e EDUSP, 1974, 293p.

FAHN, A. **Plant anatomy**. 3nd.ed. New York : Pergamon. 1982. 544p.

IBARRA-MANRÍQUEZ, G.; RAMOS, M. M.; OYAMA, K. Seedling functional types in a lowland rain forest in Mexico. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 1801- 812, 2001.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.

KUNIYOSHI, S. K. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta de araucária**. 233 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1983.

LANDRUM, L. R. *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma* (Myrtaceae). **Flora Neotropica**, Monographs 45. New York Botanical Garden, New York, p.116-160, 1986.

HICKEY, L. J. A revised classification of the architecture of dicotyledonous leaves, p. 25-39. In: METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject**. Oxford: Clarendon Press, 1979.

MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 100, p. 405-414, 1976.

O' BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OLIVEIRA, E. C. de. Morfologia de Plântulas, p. 175-214. In: AGUIAR, L. B. de; PINÃ - RODRIGUES, F. C..M.; FIGLILOA, M. B. **Sementes Florestais Tropicais**, Brasília: ABRATES, 1993, 350 p.

OLIVEIRA, E. de C.; PEREIRA, T. S. Euphorbiaceae: morfologia da germinação de algumas espécies. **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília-DF v. 9, n.1, p. 31-51, 1987.

PALEARI, L. M.; SANTOS, F. A. M. dos. Papel do indumento piloso na proteção contra a herbivoria em *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Revista Brasileira de Biologia**, Botucatu, v. 58, n. 1, p.151-157, 1998.

REITZ, P. R. Mirtáceas In: **Flora Ilustrada Catarinense**. (C. D. Legrand & R. M. Klein, Eds). Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues, 1977.

RESSEL, K.; GUILHERME, F. A. G.; SCHIAVINI, I.; OLIVEIRA, P. E. Ecologia morfofuncional de plântulas de espécies arbóreas da Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 311-323, 2004.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**, 2nd ed. Ames: The Iowa State College Press, p. 228, 1951.

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

SOUZA, L. A. de; OLIVEIRA, J. H. G. Morfologia e anatomia das plântulas de *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb e *T. chrysotricha* (Mart. ex Dc.) Standl. (Bignoniaceae). **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 217-226, 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias da Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2005.

SMITH, W. K.; VOGELMANN, T. C.; DELUCIA E. H.; Bell, D. T.; Shepherd, K. A. Leaf Form and Photosynthesis. **BioScience**, v. 47, n. 11, p. 785-793, 1997.

THEOBALD, W. L.; KRAHULIK, J. L.; ROLLINS, R. C. Trichome description and classification, p. 40-53. In: METCALFE, C. R.; CHALK L. **Anatomy of the dicotyledons: sistematic anatomy of leaf and stem, with a brief store of the subject**. Claredon Press: Oxford, v.1, 1979.

VALLILO, M. I.; de AGUIAR, O. T.; FIUMARELLI, J.; MARTINS JUNIOR, H. A.; SASSINE, A.; BUSTILLOS, O. V. Identificação de terpenos no óleo dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessèdes) O. Berg. Landrum-Myrtaceae. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, (supl.), p.1-749, 2004.

VOGEL, E. F. **Seedlings of dicotyledons: structure, development, types: descriptions of 150 woody Malesian taxa**. Wageningen: Centre for Publishing and Documentation, 1980, 445p.

WRIGHT, I. J.; CLIFFORD, H. T.; KIDSON, R.; REED, M. L.; RICE, B. L.; WESTOBY, M. A survey of seed and seedling characters in 1744 Australian dicotyledon species: cross-species trait correlations and correlated trait-shifts within evolutionary lineages. **Biological Journal of the Linnean Society**. v. 69, p. 521-547, 2000.

CAPÍTULO 2

GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE *Campomanesia xanthocarpa* O. BERG. (MYRTACEAE), EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO E SOLO BIORREMEDIADO.

RESUMO

Em 2000 ocorreu um vazamento de petróleo na área da Refinaria Getúlio Vargas (REPAR/PETROBRAS), em Araucária - PR, contaminando o solo de remanescentes da Floresta Ombrófila Mista existente no local. A maior parte da área afetada vem sendo biorremediada com microorganismos. Após cerca de cinco anos da contaminação e utilização do processo de biorremediação, pretende-se com este trabalho, identificar os efeitos do solo contaminado por petróleo e do solo biorremediado na germinação, no crescimento e na morfologia da plântula de *Campomanesia xanthocarpa*. O. Berg. (Myrtaceae). O experimento foi montado com solo proveniente da REPAR, seguindo um delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos: solo contaminado (C), solo biorremediado (BR), solo não contaminado (NC); e cinco repetições com 50 sementes cada. Foram avaliados a porcentagem e índice de velocidade de germinação (IVG), produção de biomassa e comprimento das plântulas, com 30 e 60 dias. Não houve diferença significativa na porcentagem de germinação e no índice de velocidade de germinação. A produção de biomassa total (30 - 60 dias) foi maior no tratamento BR, em relação aos demais tratamentos. Observou-se o mesmo comportamento para biomassa da parte aérea das plântulas com 60 dias, porém, para as plântulas com 30 dias, não houve diferenças estatísticas. As médias para a biomassa da raiz foram menores em (C) do que em (BR). O comprimento da parte aérea e o comprimento total da plântula no tratamento C e NC foram menores, quando comparado ao BR, com 30 e 60 dias. Para o comprimento da raiz, em ambas as coletas, não houve diferenças significativas. Apesar da porcentagem e da velocidade de germinação não diferirem estatisticamente, observa-se que, a maioria das variáveis analisadas no tratamento C foram menores em relação aos outros tratamentos. Além disso, foi possível constatar alterações na morfologia das plântulas do solo contaminado, tais como: lesões em "V" e enrugamento nos paracotilédones e eofilos; necrose da raiz principal e camada impregnada de óleo mais partículas de solo nos envoltórios da semente. Os maiores valores no tratamento BR podem ser explicados devido à redução dos efeitos da contaminação pelo processo de biorremediação.

Palavras-chave: Gabiroba; plântula; contaminação; biorremediação.

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de acidentes com derramamento de petróleo tem sido motivo de preocupação na comunidade científica. Pois, além de ser uma das principais causas de poluição ambiental, causando contaminação nos rios, afetando a fauna e a flora; os acidentes com o transporte de petróleo são freqüentes, principalmente nas últimas décadas.

A extensão em que as funções vitais das plantas são afetadas pelos poluentes e se há danos visíveis, depende da influência tanto do ambiente, quanto das características da própria espécie. Entre esses, os mais importantes a serem considerados são: as condições climáticas e edáficas; as propriedades químicas e físicas do solo; a concentração; o momento e a duração do contaminante no ambiente; as espécies; a forma de crescimento; a idade e a atividade da planta; bem como, o vigor geral do vegetal (LARCHER, 2000).

Entre todos os problemas provocados pelo fenômeno de poluição ambiental, a contaminação das águas e a conseqüente escassez de recursos hídricos de boa qualidade, talvez sejam um dos mais importantes. Dentro deste contexto, a contaminação por petróleo e derivados tem causado bastante preocupação, seja pela freqüência dos eventos, ou pelo elevado potencial dos poluentes (TIBURTIUS & ZAMORA, 2004).

O petróleo é um composto natural, com uma mistura de componentes orgânicos, principalmente de hidrocarbonetos; sulfúricos; nitrogênio e oxigênio. Esse é produzido da biomassa final de um longo período de tempo geológico, por complexas reações ocorrendo sob condições de alta pressão e temperatura, em formações sedimentares. Os componentes do petróleo podem ocorrer de forma gasosa ou volátil, líquida denominada de óleo cru e sólida ou semi-sólida de natureza asfáltica (BAKER, 1970; FREEDMAN, 1993).

Os impactos causados por acidentes com petróleo e seus derivados podem ser evidenciados logo após um derramamento, tendo como conseqüência imediata à morte da fauna, da vegetação e a contaminação das águas. Porém, ao longo do tempo, os efeitos desses acidentes ainda podem permanecer no ambiente, prejudicando os ecossistemas.

Diversos autores estudaram os efeitos da contaminação do solo por petróleo e seus derivados no crescimento das plantas (GILL *et al.*, 1992; PROFFIT, *et al.*,

1995; ADAM & DUNCAN, 1999, 2002; MERKL, *et al.*, 2004; ALKIO *et al.*, 2005; MAYER *et al.*, 2005; ACHUBA, 2006; AGBOGIDI *et al.*, 2006; BARDELI-DA-SILVA, 2006; PENÃ-CASTRO *et al.*, 2006).

GILL *et al.* (1992) pesquisaram o efeito do óleo cru no crescimento de *Chromolaena odorata* (L.) K. & R. Os autores constataram para as plantas submetidas ao contaminante, redução significativa no crescimento, necrose nas folhas e baixa germinação das sementes. PROFFIT *et al.* (1995) observaram menor tamanho e coloração avermelhada das folhas, e redução no crescimento do caule, em plantas de mangue, submetidas ao efeito do óleo. ADAM & DUNCAN (1999) estudaram o efeito do óleo diesel no crescimento de várias espécies de gramíneas e observaram redução na biomassa das raízes das plantas, sob efeito do contaminante. Estes mesmos autores em 2002, pesquisaram o efeito do óleo sob a germinação de 25 espécies de gramíneas, leguminosas e plantas de espécies comerciais e constataram atraso na germinação das sementes. MERKL *et al.* (2004) pesquisaram o efeito do óleo cru em *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) e *Cyperus aggregatus* (Willd) Endl. e observaram raízes mais grossas, porém, com menor comprimento. ALKIO *et al.* (2005) investigaram o estresse causado por hidrocarbonetos em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynb. cv. Columbia. A espécie apresentou redução no crescimento da raiz e do caule, deformidade nos tricomas, redução no número de pêlos radiciais, clorose nas folhas, aparecimento de manchas e lesões necróticas. MAYER *et al.* (2005) estudaram o efeito da contaminação por petróleo no crescimento e desenvolvimento de mudas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). Os indivíduos crescendo em solo contaminado tiveram retardo no crescimento durante o início do experimento, quando comparadas com as do solo não contaminado. Também foi constatada folhagem amarelada, ramificações superficiais da raiz e maior biomassa das raízes para as mudas do solo contaminado. ACHUBA (2006) constatou redução significativa no crescimento das plantas de *Vigna unguiculata* (L.) em diferentes concentrações de óleo cru (0,25%, 1,0% e 2,0%), por outro lado, não houve diferenças significativas quando essas estavam sobre concentração de 0,5%. AGBOGIDI *et al.* (2006) detectaram redução significativa na germinação das plantas de *Dennettia tripetala* (Bak.) F. em solo contaminado com óleo cru, quando comparado com solo não contaminado. BARDELI-DA-SILVA (2006) investigou o efeito do solo contaminado com óleo diesel no crescimento de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs. Ocorreu

atraso no crescimento, tanto da parte aérea, quanto da raiz, menor biomassa e redução da área foliar com o aumento da concentração de óleo diesel. PENÃ-CASTRO *et al.* (2006) pesquisaram as alterações no crescimento de *Cynodon dactylon* L. submetidas à contaminação por petróleo. As plantas tiveram clorose, menor número de folhas e interrupção na ramificação das raízes.

CHUPAKHINA & MASLENNIKOV (2004) relataram que a poluição por petróleo alterou as condições hídricas e propriedades físicas do solo, reduzindo drasticamente o conteúdo e a movimentação do nitrogênio e fósforo. Além disso, o poluente é fitotóxico, causando a destruição dos pigmentos fotossintéticos das plantas (MALALHAH *et al.*, 1996).

KINAKO (1981) examinou os efeitos da poluição por óleo em várias espécies de plantas e sobre a produtividade de um ecossistema. O poluente reduziu drasticamente a estrutura e complexidade da comunidade e também, deixou um efeito adverso significativo na produtividade da vegetação. A poluição também pode contribuir indiretamente para outros aspectos da deterioração do habitat, como por exemplo, a erosão. Segundo este mesmo autor, isto pode ocorrer quando a recuperação da vegetação após um derramamento de petróleo for lenta. A superfície do solo sem vegetação pode ser exposta aos vários agentes climáticos, antes do estabelecimento da cobertura de plantas protetoras.

Para que ocorra a germinação das sementes, é necessário que a água esteja disponível no solo, o oxigênio deve estar presente, a temperatura deve estar adequada, em alguns casos é necessária luz e as substâncias nocivas e inibidoras devem estar ausentes (BEWLEY & BLACK, 1985). Neste sentido, quando ocorre a contaminação do solo, o ambiente onde as sementes estão presentes pode ser alterado, prejudicando a germinação e o desenvolvimento das plântulas.

Em julho de 2000, ocorreu um grave acidente ambiental na área da Refinaria Getúlio Vargas (REPAR), pertencente à Petrobrás, localizada em Araucária – PR, onde foram derramados quatro milhões de litros de petróleo. Nesta área ocorrem formações vegetacionais secundárias típicas da Floresta Ombrófila Mista, nas suas formações Montana e Aluvial, além de várzeas com vegetação hidrófila, especialmente herbácea (RODERJAN, *et al.*, 2002). O acidente afetou consideravelmente as formações vegetacionais existentes no local, contaminando também o solo, a fauna e os rios Barigui e Iguaçu. Parte desta área está sendo submetida a um processo de biorremediação visando reduzir os teores de TPH

(Hidrocarbonetos Totais do Petróleo) no solo a um nível não tóxico. Neste sentido, pesquisas vêm sendo realizadas, a fim de compreender a influência da contaminação por petróleo e do processo de biorremediação na flora deste local (BONA & SANTOS, 2003; MARANHO, 2004; FARIAS, 2005; BARDELLI-DA-SILVA, 2006; REZENDE, 2006).

Dentre as espécies arbóreas presentes nesta área está *Campomanesia xanthocarpa* (guabirobeira). Esta ocorre desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. De acordo com REITZ (1977), trata-se de uma espécie heliófita, seletiva higrófila até mesófila, sendo bastante freqüente na Floresta Ombrófila Mista, especialmente nos solos úmidos da floresta fluvial, nos capões e em áreas mais abertas da floresta secundária. *C. xanthocarpa* apresenta grande importância, pois, além de ser espécie freqüente na região da REPAR, seus frutos são bastante apreciados pela fauna. Em função disso, há necessidade de uma melhor compreensão acerca da potencialidade germinativa e do crescimento da espécie na área afetada pelo petróleo. Além disso, trabalhos com *C. xanthocarpa* (MAYER, 2004), (SOUZA, 1999), registram que a espécie possui potencial para revegetação de áreas contaminadas com resíduos oleosos. Este trabalho tem por objetivo estudar a influência do solo contaminado por petróleo e do solo biorremediado, sobre a germinação das sementes, crescimento inicial e morfologia de *C. xanthocarpa*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e montagem do experimento

Os frutos maduros foram coletados de árvores localizadas no município de Colombo-PR., em dezembro de 2005. Para a obtenção das sementes foi realizada a despolpa dos frutos em água corrente, com o auxílio de uma peneira. Para a montagem do experimento foram coletados em dezembro de 2005, solo contaminado, solo biorremediado e solo não contaminado, a uma profundidade de 20 cm em área da REPAR/Petrobrás, Araucária - PR, onde ocorreu o derramamento de petróleo em 2000.

Foram montados três tratamentos: solo contaminado por petróleo (C); solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC), com cinco repetições cada e 50 sementes por repetição, totalizando 750 sementes (Figura1). A semeadura foi realizada em dezembro de 2005. Os tratamentos permaneceram em casa de vegetação no Departamento de Botânica da UFPR, com nebulização com intervalos de 20 a 30 minutos, sendo registradas as temperaturas máximas e mínimas diariamente.

2.2 Análise da germinação

Após a semeadura, realizou-se o acompanhamento diário da germinação. Durante este período foram obtidos dados para o cálculo da porcentagem de germinação (%) e do índice de velocidade de germinação (IVG), calculado pela fórmula sugerida por MAGUIRE (1962):

$$\text{IVG} = \text{G1/N1} + \text{G2/N2} + \dots + \text{Gn/Nn}$$

G1, G2 e Gn = número de plântulas computadas na primeira, segunda e enésima contagem;

N1, N2 e N3 = número de dias após o plantio das sementes.

Calculou-se a frequência relativa de germinação, de maneira a estudar o comportamento das sementes em processo de germinação ao longo do tempo, através da fórmula de LABOURIAU & AGUDO (1987):

$$f_i = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

em que: n_i : número de sementes germinadas no dia i ;

k : último dia de observação.

Para verificar a variação da germinação das sementes ao longo do tempo, utilizou-se o índice de sincronização, estabelecido por LABOURIAU & AGUDO (1987):

$$E = \sum_{i=1}^k f_i \log_2 f_i$$

em que: f_i : frequência relativa de germinação;

\log_2 : logaritmo de base 2;

k : último dia de observação.

2.3 Análise do crescimento e da biomassa

Para o estudo do crescimento foram coletadas aleatoriamente dez plântulas por bandeja, totalizando 50 plântulas por tratamento com 30 e 60 dias de idade. Essas foram prensadas e desidratadas em estufa. Posteriormente, foi avaliado o comprimento total da plântula, comprimento da raiz principal e da parte aérea (hipocótilo e epicótilo); a biomassa total da plântula, biomassa da raiz, da parte aérea e dos paracotilédones; área cotiledonar e dos eofilos (somados em pares). A área foliar foi estimada em imagens digitalizadas em scanner de mesa acoplado ao

computador, com o auxílio do programa Sigma-Scan Pro Versão 5.0. Tanto a biomassa dos eofilos como a área foliar das plântulas com 30 dias de idade, não foram mensuradas, pois, nessa fase as plântulas do tratamento contaminado ainda não haviam desenvolvido os eofilos.

2.4 Análise química e física do solo

No início do experimento foram coletadas amostras de solo de cada repetição dos três tratamentos para análise química e física, realizada pelo laboratório de Análises Agronômicas do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná. A análise de TPHs (total de hidrocarbonetos do petróleo) foi feita pelo LACTEC (Tabela 1).

2.5 Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, utilizando-se do programa MSTAT-C®. Os dados foram analisados seguindo-se um delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e cinco repetições cada. Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett para verificar a homogeneidade das variâncias. Posteriormente, realizou-se a análise de variância (ANOVA) para detectar as diferenças estatísticas entre as médias testadas. Nos casos em que o resultado da ANOVA foi significativo, aplicou-se o teste Tukey de comparação de médias. Foi utilizado um nível de probabilidade de 0,05. Para confecção dos gráficos utilizou-se o programa Excel 2003 para Windows XP (Microsoft Corporation).

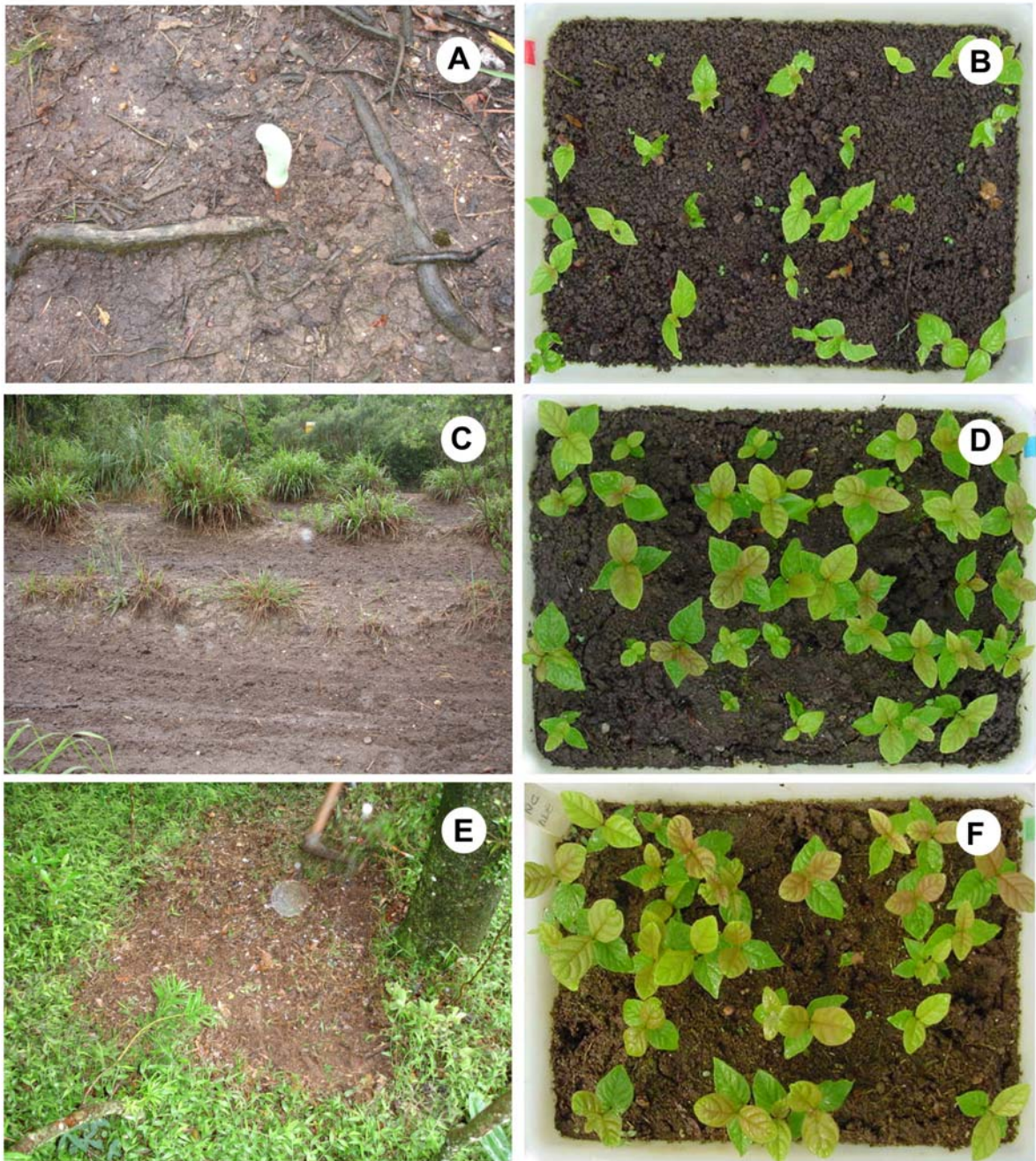


Figura 1 – Área de coleta do solo onde ocorreu o acidente com petróleo e montagem do experimento (A – F). A, B solo contaminado com petróleo; C, D solo biorremediado; E, F solo não contaminado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Germinação

A emergência das plântulas iniciou-se no 11º dia após a instalação do experimento, nos três tratamentos (contaminado, biorremediado e não contaminado). O teste de germinação foi encerrado 35 dias após a semeadura. Ocorreu uma alta porcentagem de germinação de sementes de *C. xanthocarpa* para os três tratamentos, sendo de 92% em solo contaminado por petróleo, 92% em solo biorremediado e 86% em solo não contaminado. Não houve diferença significativa para esta variável entre os três tratamentos (Figura 2 A). Para o índice de velocidade de germinação, também não houve diferença significativa entre as médias (Figura 2 B).

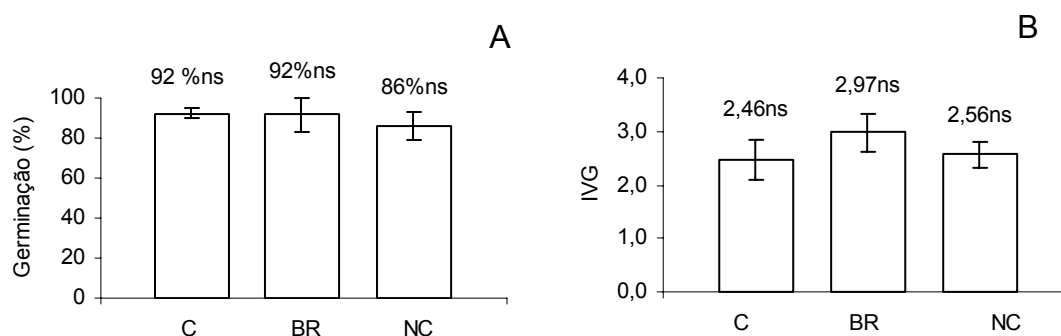


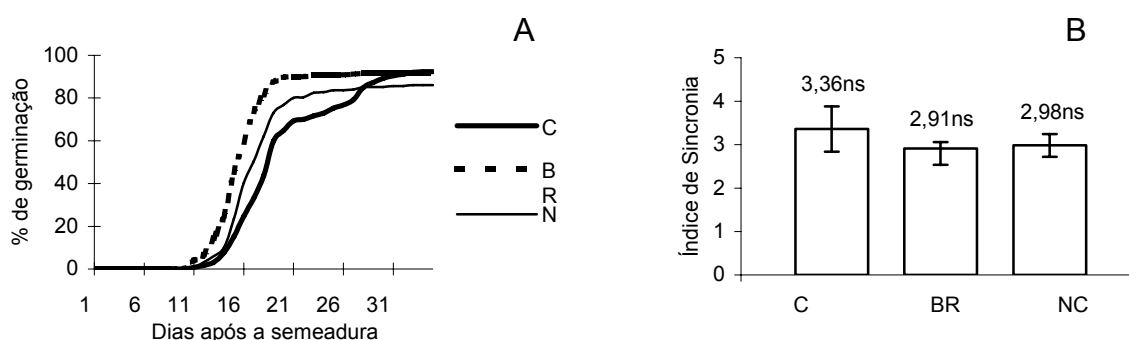
Figura 2 - A - porcentagem final de germinação e B - índice de velocidade de germinação (IVG) de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. (ns): não significativo, considerando ($\alpha = 0,05$).

Para entender melhor a germinação das sementes, o pesquisador deve considerar não apenas a porcentagem final, mas também as curvas de germinação, que representam o comportamento germinativo ao longo do tempo (SANTANA & RANAL, 2004). Segundo ¹NICHOLS & HEYCKER (1968 *apud* SANTANA & RANAL, 2004) é necessário examinar as curvas de germinação em detalhe, uma vez que

¹ NICHOLS, M.A. & HEYDECKER, W. Two approaches to the study of germination data. *Proceedings of the International Seed Testing Association*, n. 33, p. 531 – 540, 1968.

duas ou mais amostras de sementes podem ter precisamente a mesma porcentagem final de germinação, e, no entanto, terem curvas de germinação distintas. Tais diferenças trazem importantes implicações na interpretação dos resultados.

Apesar de *C. xanthocarpa* não apresentar diferenças estatísticas entre os tratamentos para as variáveis já descritas, a partir das curvas de germinação pode-se observar diferenças no comportamento da espécie entre os três tratamentos. As curvas dos tratamentos biorremediado e não contaminado seguem praticamente paralelas, ocorrendo apenas um pequeno atraso da última em relação à primeira (Figura 3 A). Por sua vez, a curva do tratamento contaminado, além de atrasada em relação às demais, apresenta uma forma mais irregular. Além disso, embora o índice de sincronia não tenha diferido estatisticamente, é no solo contaminado que esta variável apresenta maior coeficiente de variação ($C=15,5$; $BR=5,0$; $NC=8,6$), evidenciando maior heterogeneidade entre as repetições, o que pode indicar uma pequena influência da contaminação no comportamento germinativo. O índice de sincronia representa o grau de homogeneidade da germinação ao longo do tempo, sendo os maiores valores representativos de um comportamento mais irregular da germinação (Figura 3 B).



Figuras 3 - A - porcentagem de germinação e B - índice de sincronia da germinação de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), cada curva e coluna representam a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. "ns": diferenças não significativa entre as médias, considerando ($\alpha = 0,05$). (C) - solo contaminado por petróleo, (BR) - solo biorremediado, (NC) - solo não contaminado.

De acordo com SANTANA & RANAL (2004), o comportamento da germinação pode ser caracterizado na distribuição de freqüências. Quando a germinação

aumenta ao longo do tempo até atingir o máximo e depois declina, a curva apresenta apenas um valor modal. Por outro lado, a germinação pode aumentar, atingindo o máximo valor de frequência, declinar e, em seguida voltar a crescer. Neste caso, se caracteriza uma curva com mais de um valor modal.

Considerando as frequências relativas de germinação de *C. xanthocarpa*, observa-se que o primeiro pico de germinação ocorreu no tratamento biorremediado, no 15º dia, seguido pelo tratamento não contaminado, no 16º dia. Para o solo contaminado, houve um atraso no pico de germinação em relação aos demais tratamentos, ocorrendo no 19º dia. Após atingir esse ponto, ocorreu uma estabilização da curva de germinação nos solos biorremediado e não contaminado. Por sua vez, no solo contaminado nota-se um segundo pico de germinação no 28º dia (Figura 4), demonstrando a maior irregularidade da germinação neste tratamento.

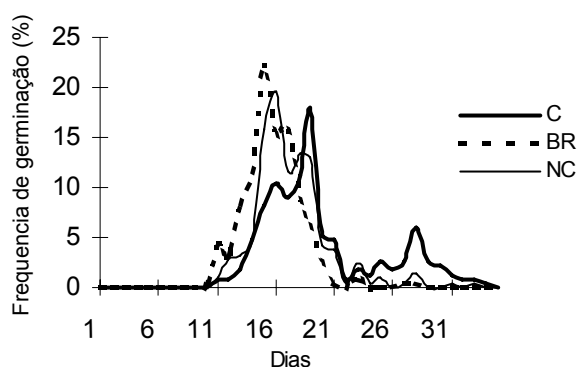


Figura 4 - Frequência diária de germinação de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada curva representa a média de cinco repetições.

A germinação das sementes pode ser inibida pelo efeito tóxico do petróleo ou por condições desfavoráveis do solo (MERKL *et al.*, 2004). Em função disso, diversos autores estudaram os efeitos da contaminação do solo na germinação das sementes, (ADAM & DUNCAN, 1999, 2002; BANKS & SHULTZ, 2005; AGBOGIDI, *et al.*, 2006, OGBONNA *et al.*, 2007), entretanto, são poucos os trabalhos que tratam de espécies arbóreas.

ADAM & DUNCAN (1999) investigaram o efeito do óleo diesel na germinação e crescimento de diversas plantas, entre elas gramíneas, leguminosas e espécies agrícolas. Em níveis relativamente baixos de óleo diesel ocorreu um atraso na germinação das sementes e redução da velocidade de germinação. ADAM &

DUNCAN (2002) também registraram a inibição da germinação em função de impedimento físico de transferência da água e oxigênio em sementes de diversas espécies de gramíneas, leguminosas e de produção comercial, que foram submetidas à contaminação por óleo diesel.

BANKS & SHULTZ (2005) estudaram diferentes espécies de plantas, submetidas à poluição por óleo (*Lactuca sativa* L., *Panicum miliaceum* L., *Raphanus* L., *Trifolium pratense* L. e *Triticum aestivum* L.). A maioria das plantas testadas mostrou geralmente, decréscimo no número de sementes germinadas com o aumento da contaminação por óleo, exceto *L. sativa*, que foi tolerante a contaminação por petróleo.

Segundo AGBOGIDI *et al.* (2006), a redução na porcentagem de germinação das sementes de *Dennettia tripetala* com o aumento da concentração de óleo cru, pode ser atribuído à redução da tensão do oxigênio no solo contaminado. O estresse pelo oxigênio que ocorre nas sementes pode afetar o sistema respiratório do embrião e sua viabilidade. Para algumas sementes de *C. xanthocarpa* foi observado a morte do embrião em tratamento com solo contaminado por petróleo. Isso provavelmente, ocorre devido à penetração de óleo no interior da semente ou escassez de água e oxigênio essenciais ao desenvolvimento do embrião (BAKER, 1970; CHAINEAU *et al.*, 1997).

KRAMER & KOZLOWSKI (1960) afirmam que, tanto o excesso de água reduz ou inibe a germinação, mediante a redução de abastecimento em oxigênio, como a escassez de água no solo. A impermeabilização do tegumento das sementes, pela presença de contaminante como o óleo, pode também ser um fator que interfere na absorção de água pela semente.

Uma planta que cresce em condições ideais tem um contato adequado entre a estrutura da raiz e a matriz do solo, que permite a absorção de oxigênio e de água. No entanto, se as raízes crescem em um ambiente poluído por petróleo, as partículas do solo são cobertas com uma camada hidrofóbica, que reduz a disponibilidade de água e aumenta a demanda por oxigênio dos microorganismos no solo. Isto causa o estresse anóxico e hídrico e, adicionalmente, a natureza hidrofóbica do poluente, também causa um estresse químico (PEÑA-CASTRO *et al.*, 2006). Portanto, a presença de hidrocarbonetos orgânicos em grande quantidade no solo pode impedir a absorção de água e nutrientes pelas plantas (BAKER, 1970; UDO & FAYEMI, 1975; REIS, 1996).

No caso de *C. xanthocarpa*, apesar de ocorrerem algumas variações no comportamento germinativo, evidentes nas curvas de germinação, estas são de pequena magnitude, uma vez que não houve diferença estatística para as principais variáveis analisadas. Isto sugere que, embora a contaminação possa estar afetando a germinação, esta influência não é significativa. A alta capacidade germinativa e o alto vigor das sementes possibilitam que a espécie “escape” dos efeitos negativos do contaminante. Além disso, nessa fase, a planta depende mais das reservas presentes no embrião do que do meio externo.

A alta capacidade germinativa das sementes de *C. xanthocarpa* foi também relatada por SANTOS *et al.* (2004), que investigou a germinação de sementes de Myrtaceae com presença e ausência de luz. Estes autores constataram que *C. xanthocarpa* foi indiferente a isso, apresentando alta porcentagem de germinação em ambos os casos. SANTOS *et al.* (2004) também constataram a velocidade média de germinação, de diversas espécies de Myrtaceae: *Campomanesia guazumifolia* (Camb.) Berg., *C. xanthocarpa*, *Eugenia rostrifolia* Legr., *Myrcianthes pungens* (Berg.) Legr., e *Psidium cattleianum* Sabine. Dentre estas espécies, *C. xanthocarpa* foi a que teve maior velocidade média de germinação. No presente estudo, essa espécie também apresentou alto índice de velocidade de germinação (Figura 2 B). De acordo com MAGUIRE (1962), a velocidade de germinação das sementes, apresenta-se como uma ferramenta para se avaliar o vigor das sementes; quanto maior for o valor numérico da expressão, maior será o vigor da amostra de sementes analisadas. Com base nos resultados já descritos tais como, a alta porcentagem e velocidade de germinação, pode-se afirmar que a espécie estudada tem alto vigor e potencial germinativo. Esse fato, provavelmente, justifica a alta porcentagem de germinação em todos os tratamentos testados.

A temperatura tem importante influência sobre a germinação, tanto quando se considera a germinação total, como a velocidade de germinação. A temperatura interfere na germinação, a partir da sua influência sobre a velocidade de absorção de água e por afetar as reações bioquímicas (CARVALHO & NAKAGAWA, 1983). A germinação da maioria das sementes das árvores pode dar-se ao longo de um intervalo de temperaturas bastante grande, embora a germinação mais rápida das sementes se de normalmente a temperaturas razoavelmente elevadas, (KRAMER & KOZLOWSKI, 1960; CARVALHO & NAKAGAWA, 1983). Segundo SANTOS *et al.*

(2004), *C. xanthocarpa* apresentou melhor porcentagem de germinação em temperaturas entre 15° e 30° C. Os dados de temperatura diária (em casa de vegetação) relatada no presente estudo tiveram um mínimo de 17°C, média de 28 °C e a máxima foi de 39°C (Figura 5). Esses valores de temperatura média coincidem com os resultados de observado por SANTOS *et al.* (2004).

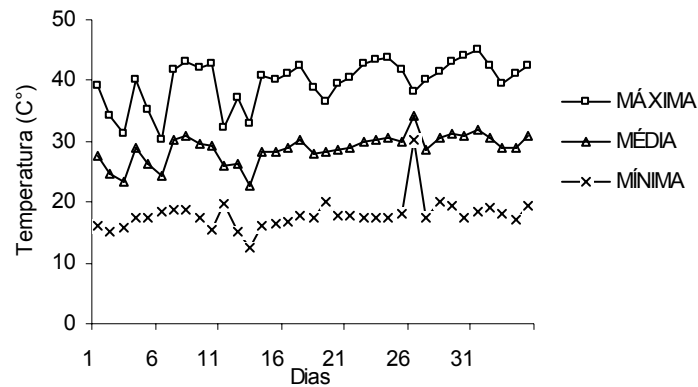


Figura 5 - Valores diários de temperatura (°C) máxima, média e mínima em casa de vegetação.

3.2 Biomassa e crescimento

Considerando-se os resultados de biomassa, nota-se que a contaminação não afetou a maioria das variáveis (Figura 6 A - F e 7 A), com exceção da biomassa dos paracotilédones e eofilos nas plântulas com 60 dias (Figura 7 B e C). Em comparação ao tratamento biorremediado e ao não contaminado, no solo contaminado por petróleo houve aumento da biomassa dos paracotilédones e redução na biomassa dos eofilos.

As alterações no crescimento e produção de biomassa das plantas em solo contaminado têm sido relatadas por alguns pesquisadores (UDO & FAYEMI, 1975; MALALLAH *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997; CHUPAKHINA & MASLENNIKOV, 2004; MAYER, 2004; ALKIO *et al.*, 2005; MERKL *et al.*, 2005; AGBOGIDI *et al.*, 2006; PENÃ-CASTRO *et al.*, 2006; REZENDE, 2006; SANTOS, 2006).

MERK *et al.* (2005) observaram que *Brachiaria brizantha* e *Cyperus aggregatus* apresentaram menor comprimento da raiz e expressivo incremento no diâmetro da raiz em solo contaminado, quando comparado com solo controle. CHUPAKHINA & MASLENNIKOV (2004) estudaram plantas com cerca de 25 dias de idade em solo contaminado com hidrocarbonetos, os resultados mostram que todas as espécies que germinaram em solo contaminado tiveram diminuição da biomassa e atraso no desenvolvimento dos eofilos. Observa-se que para *C. xanthocarpa*, também houve menor biomassa dos eofilos com 60 dias de idade (Figura 7 C) e atraso na emissão dos eofilos em solo contaminado.

Nota-se que há uma tendência dos maiores valores de biomassa ocorrerem no tratamento biorremediado. Para a biomassa da raiz e biomassa total de plântulas com 60 dias, o solo biorremediado apresentou médias maiores do que os demais tratamentos (Figura 6 B e F). Enquanto que, a biomassa da parte aérea, das plântulas com 60 dias, foi maior no tratamento biorremediado apenas quando comparado ao contaminado, não diferindo estatisticamente do tratamento não contaminado (Figura 6 D). Essa mesma tendência é válida para a biomassa da raiz das plântulas com 30 dias (Figura 6 A).

Tanto a biomassa da parte aérea, quanto à biomassa total e dos paracotilédones em plântulas com 30 dias, não diferiu estatisticamente entre os tratamentos (Figuras 6 C, 7 A). Este fato sugere que os efeitos da contaminação,

assim como os da biorremediação tornaram-se mais evidentes, após 60 dias, fase em que as plântulas certamente já não contam mais com as reservas do embrião.

Os maiores valores de biomassa encontrados no solo biorremediado podem estar relacionados com alterações tanto nas características físicas, quanto químicas do solo. Este foi revolvido, propiciando maior aeração e conseqüentemente, condições mais favoráveis ao desenvolvimento das plântulas. Além disso, a adição de nutrientes no solo, normalmente usados no processo de biorremediação, pode também estar favorecendo o crescimento das plântulas. Considerando os dados da Tabela 1, nota-se que o valor da saturação por bases (V) é maior no solo biorremediado (89%), quando comparado ao tratamento não contaminado (4%) e ao contaminado (21%). O mesmo ocorre com a capacidade de trocas de cátions (T). Considerando as alterações na biomassa de paracotilédones e eofilos nas plântulas com 60 dias em solo contaminado, nota-se que a biorremediação parece ter minimizado os efeitos do contaminante, uma vez que os valores neste tratamento equiparam-se aos do solo não contaminado.

Tabela 1 – Análise química e física do solo contaminado (C), biorremediado (BR) e não contaminado (NC).

	C	BR	NC
Areia (%)	25	20	26
Silte (%)	25	35	21
Argila (%)	50	45	53
pH CaCl ₂	4,2	5,8	3,7
Al ⁺³ (cmolc/dm ⁻³)	4,1	0	6
Al ⁺³ + H ⁺ (cmolc/dm ⁻³)	14,10	2,40	17,60
CaMg (cmolc/dm ⁻³)	1,3	9,3	2,0
T	17,84	21,21	18,30
V (%)	21	89	4
pH SMTP	4,60	7,00	4,30
C (g dm ⁻³)	26,9	19,6	23,8
N (g Kg)	2,2	1,7	2,4
P (cmolc dm ⁻³)	1,60	1,20	3,50
K ⁺ (cmolc dm ⁻³)	0,24	0,21	0,10
Ca ⁺² (cmolc dm ⁻³)	2,0	16,8	0,4
TPH (mg/Kg)	5809	2713	243

Basicamente, a mesma tendência geral constatada na biomassa pode ser observada no comprimento das plântulas. Ou seja, os maiores valores normalmente ocorrem no tratamento biorremediado quando comparado aos demais, tanto para o comprimento da raiz como para o comprimento total das plântulas com 30 e 60 dias (Figura 8 A, B, E e F). Por sua vez, o comprimento da parte aérea não diferiu entre os três tratamentos (Figura 8 C e D). Os mesmos fatores que afetaram a biomassa podem ter influenciado no comprimento das plântulas, uma vez que, tanto a aeração do solo, quanto a maior disponibilidade de nutrientes, provavelmente, favoreceu o crescimento em comprimento.

A área foliar dos paracotilédones das plântulas com 30 e 60 dias, não apresentou nenhuma diferença estatística entre os tratamentos (Figura 9 A e B). Já a área dos eofilos (60 dias) no solo contaminado foi maior do que no solo não contaminado, porém, não diferiu do solo biorremediado (Figura 9 C).

OGBONNA *et al.* (2007), estudaram o efeito da biorremediação e da contaminação do solo com óleo cru no crescimento de *Abelmoshus esculetus* e concluíram que quando são adicionados microorganismos e fertilizantes ao solo contaminado, as plantas apresentaram maior número de folhas, maior biomassa, maior porcentagem de germinação e alta porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos presentes no solo, quando comparados com os tratamentos que não sofreram biorremediação. No caso do presente trabalho, também foi possível notar que o valor total de hidrocarbonetos no solo biorremediado foi reduzido, quando comparado com o contaminado (Tabela 1). Além disso, como já discutido anteriormente, a biorremediação minimizou o efeito do contaminante sobre a biomassa dos paracotilédones e eofilos.

Apesar de não terem sido observadas muitas alterações em termos de crescimento (biomassa, comprimento e área foliar) no solo contaminado, foram constatadas alterações morfológicas em diversas plântulas neste tratamento. Nota-se a ocorrência de lesões em “V” nos paracotilédones e eofilos (Figura 10 A, B, C), necrose, morte da raiz principal e formação de novas raízes (Figura 10 D, E, F), assim como, enrugamento dos paracotilédones e eofilos (Figura 10 G), e, até mesmo morte do embrião e de algumas plântulas (Figura 10 H). Também foi constatado que algumas plântulas no solo contaminado tiveram um impedimento ou atraso na expansão dos paracotilédones, quando comparados com as plântulas dos demais tratamentos. Este fato se deve, provavelmente, a impregnação de uma

camada de óleo mais partículas de solo ao redor dos tecidos que envolvem a semente, causando, inclusive, a morte em alguns casos (Figura 10 I).

MAYER (2004), também observou a ausência de raiz principal, maior ramificações de raízes secundárias e redução da raiz principal em *C. xanthocarpa* crescendo em solo contaminado com petróleo. Segundo o autor, as mudas de *C. xanthocarpa* cultivadas em solo contaminado, nos primeiros meses do experimento, tiveram retardo no crescimento, quando comparado com o tratamento não contaminado. Entretanto, no final do experimento, o crescimento foi igualado a ponto de não apresentar diferenças estatísticas.

PENÃ-CASTRO *et al.* (2006) estudando a toxicidade do petróleo em plantas de *Cynodon dactylon*, observaram, em todas as concentrações de óleo testadas, clorose e redução no número de folhas e no crescimento da raiz. ALKIO *et al.* (2005) observaram lesões necróticas nas plantas de *Arabidopsis thaliana*, quando submetidas à contaminação por fenatreno, além da redução do crescimento radicial e do número de folhas.

SANTOS (2006) realizou experimento com três espécies arbóreas crescendo em solo contaminado com petróleo: *Podocarpus lambertii* Klotz., *Allophylus edulis* (A. St. Hil. & al.) Radlk. e *Mimosa scabrella* Bentham. Tanto *P. lambertii* quanto *M. scabrella* foram afetadas pelo solo contaminado, com redução no crescimento e produção de biomassa. *A. edulis* mostrou ser tolerante ao contaminante, não sofrendo alterações nos parâmetros analisados. MALALLAH *et al.* (1996) também constataram menor biomassa em *Vicia faba* crescendo em solo contaminado com óleo cru, quando comparado com o controle.

REZENDE (2006) estudou o crescimento e desenvolvimento de plântulas de *Schinus terebinthifolius* Raddi submetidas à exposição ao óleo diesel em tempos diferentes após a contaminação, cerca de 0, 30, 90 e 180 dias. O óleo diesel causou grande redução na biomassa seca e biomassa fresca, no comprimento das plantas, na área foliar dos eofilos em todos os tratamentos do solo contaminado, sendo mais drástico no tratamento de 30 dias.

AGBOGIDI *et al.* (2006) relataram a redução na porcentagem de germinação de sementes, redução no crescimento e no número de folhas de *Dennettia tripetala*, com o aumento da concentração de óleo cru. Segundo os autores, estas respostas podem ser atribuídas às alterações na estrutura do solo, criando uma condição de estresse hídrico. Este fato também foi constatado por LI *et al.* (1997), que relataram

uma redução significativa no crescimento de gramíneas, em função da contaminação do solo com hidrocarbonetos, cujo solo apresentava baixo conteúdo de água.

A contaminação por hidrocarbonetos no solo com frequência pode ter diversos efeitos, tais como o impedimento na absorção e na manutenção da água no solo. O óleo pode exercer a função de uma barreira física, impedindo tanto a penetração da água, como a evaporação dos gases para a atmosfera. As plantas submetidas à contaminação por óleo podem exibir estresse por déficit hídrico e hipoxia (LI, 1997). Segundo LARCHER (2000), sob condições de falta de oxigênio no solo o crescimento da raiz das plantas é interrompido, morrem os ápices do sistema radicial e raízes adventícias se desenvolvem. PEZESHKI & DELAUNE (2001), também afirmam que um dos principais efeitos físicos da contaminação por petróleo é a película de óleo que cobre as raízes e altera a passagem de água e nutrientes para as plantas.

As respostas morfológicas das plântulas de *C. xanthocarpa* ao contaminante como, necrose no ápice radicial, formação de raízes próximas da superfície, enrolamento dos paracotilédones e eofilos e lesões em “V” no ápice das folhas, sugerem que o contaminante afetou a estrutura das plântulas, podendo ter ocorrido em função das alterações físicas no solo e/ou química. Embora, o contaminante possa ter afetado a estrutura do solo e conseqüentemente, a morfologia das plântulas, deve-se considerar que esse pode ter influenciado de diversas maneiras, tais como: na absorção de água; de oxigênio e principalmente de nutrientes pelas plântulas. Estes fatos abrangem uma ampla variedade de situações que devem ser avaliadas de forma minuciosa. Para isto, é necessário desenvolver mais estudos sobre os efeitos do contaminante no solo e na fisiologia das plantas.

A privação de oxigênio pode aumentar o conteúdo de etileno na planta, já que este é produzido em maior quantidade quando submetido a condições de estresse. As plantas que liberam o etileno em excesso, podem apresentar sintomas como a abscisão foliar, senescência e necrose nas plantas (TAIZ & ZEIGER, 2004). Este fato pode estar relacionado com a presença de lesões necróticas nas plântulas de *C. xanthocarpa*. Por outro lado, as plântulas desta espécie não apresentaram alterações morfológicas e anatômicas relacionadas com a falta de oxigênio, como por exemplo, a formação de lenticelas. Outro fato que pode ter contribuído na morte e necrose das raízes, é a absorção dos nutrientes. Como ocorreram alterações na

estrutura do solo, devido à contaminação, provavelmente, essas devem ter influenciado na absorção ou na disponibilidade dos nutrientes.

As alterações morfológicas observadas nas plântulas de *C. xanthocarpa* no solo contaminado irão provavelmente, afetar o seu crescimento. Portanto, o fato de não terem sido notadas grandes alterações no crescimento, não indicam necessariamente a ausência de influência do contaminante.

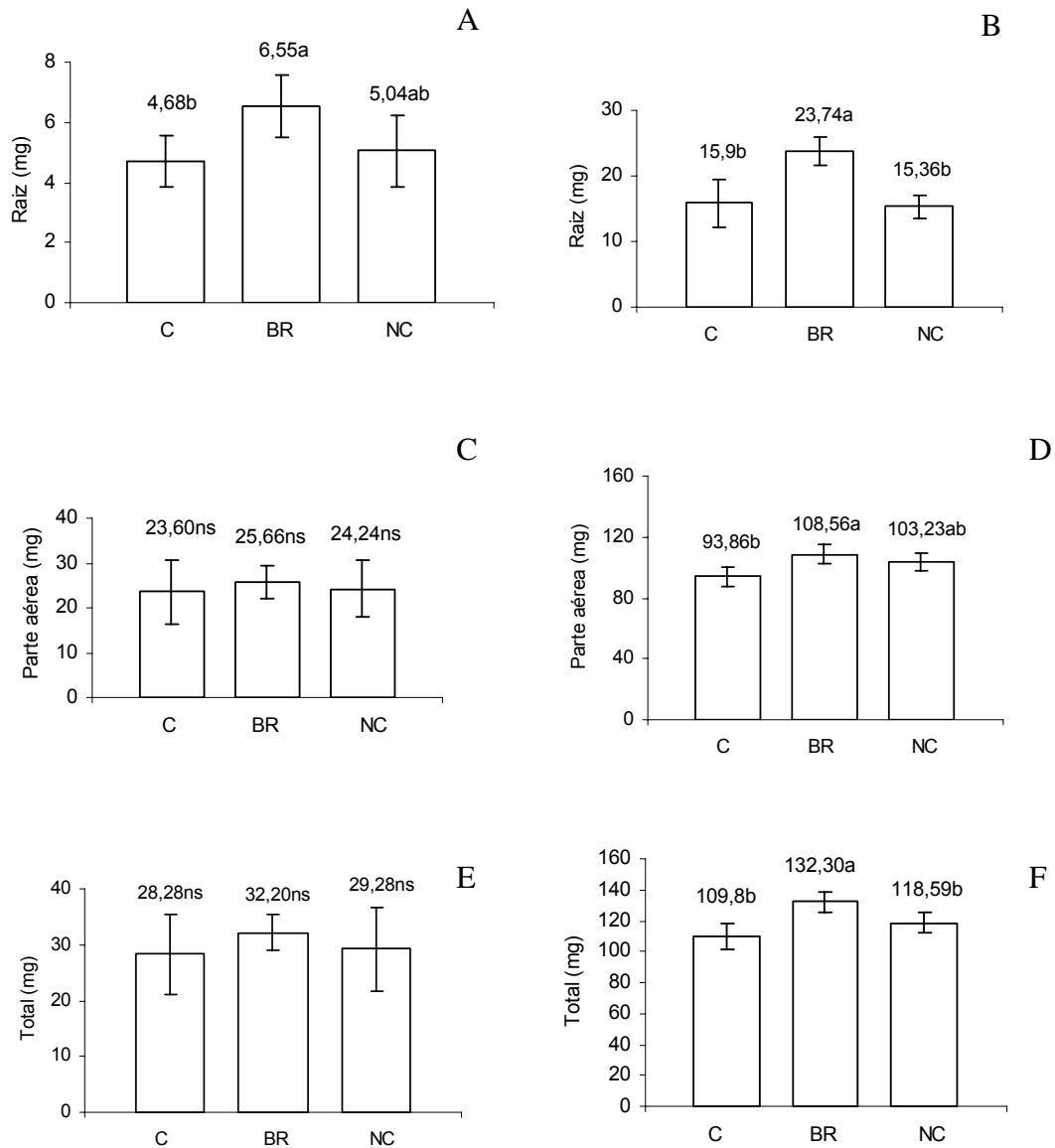


Figura 6 - Biomassa das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 (A, C e E) e 60 (B, D e F) dias, em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. (ns): não significativo, considerando ($\alpha = 0,05$).

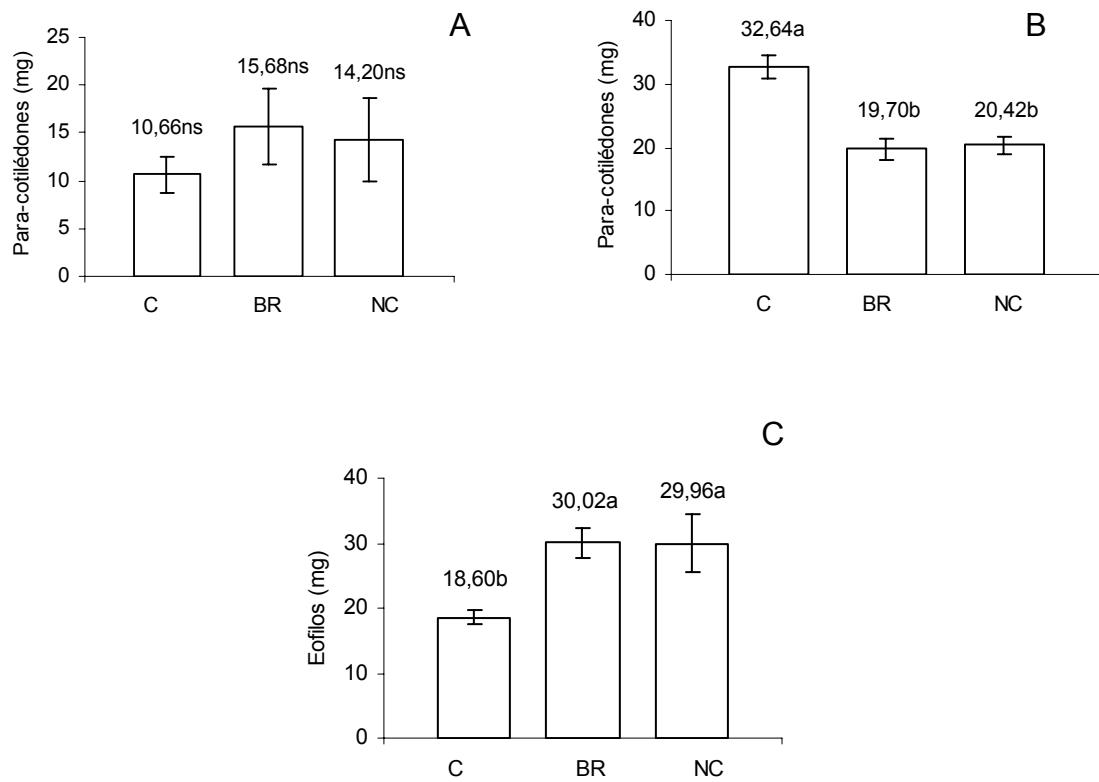


Figura 7 - Biomassa das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 (A) e 60 (B e C) dias, em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. (ns): não significativo, considerando ($\alpha = 0,05$).

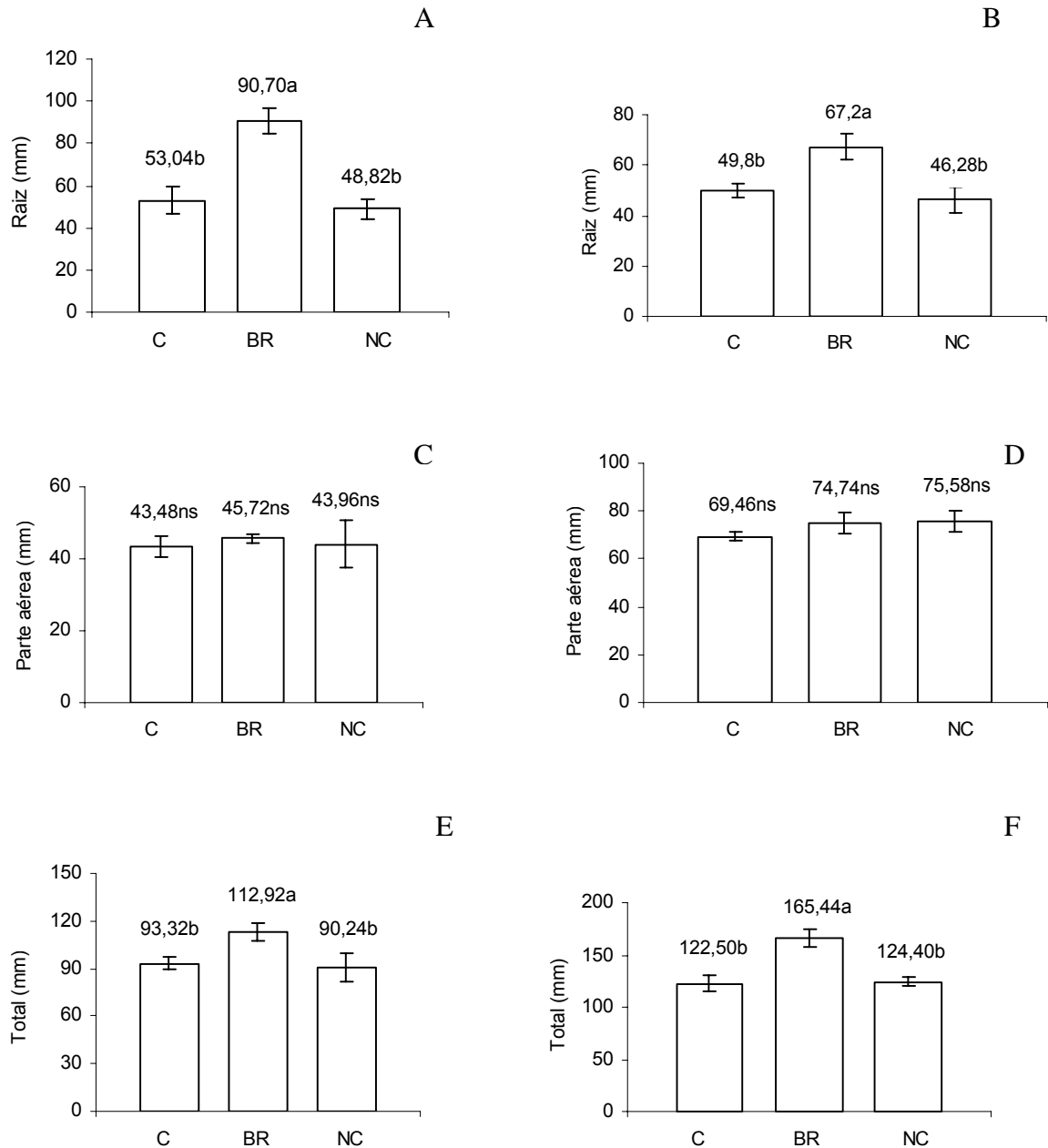


Figura 8 - Comprimento das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 (A, C e E) e 60 (B, D e F) dias, em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. (ns): não significativo, considerando ($\alpha = 0,05$).

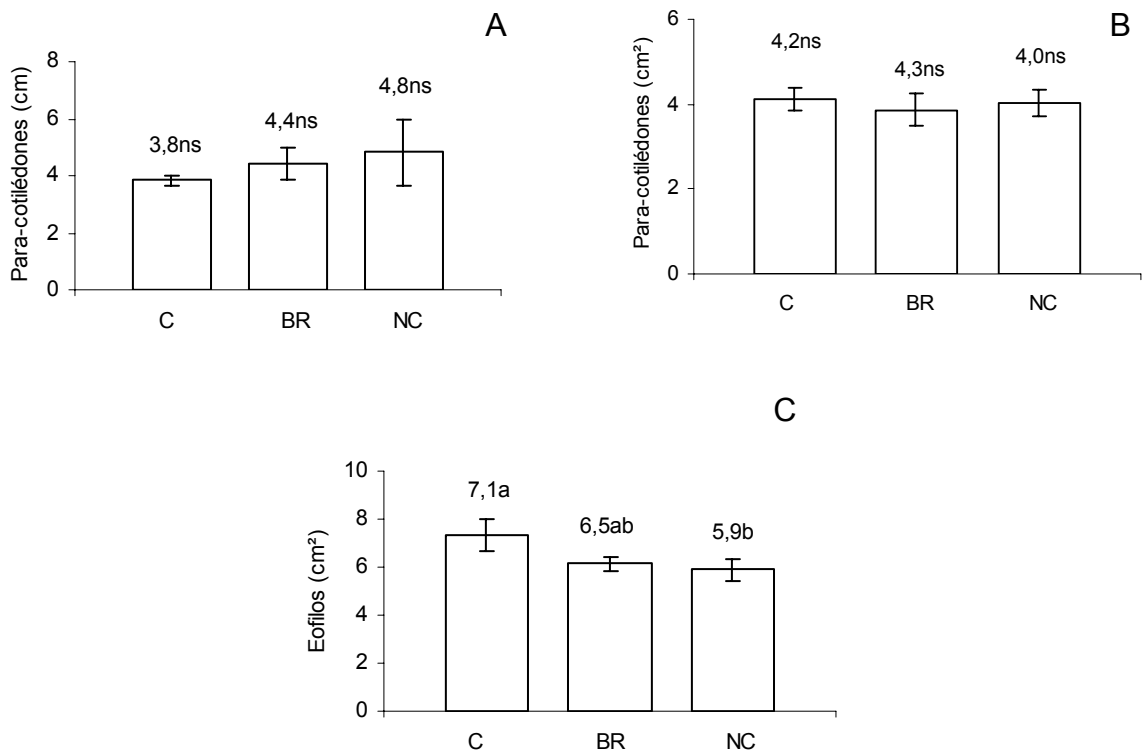


Figura 9 – Área foliar das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 (A) e 60 (B e C) dias, em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. (ns): não significativo, considerando ($\alpha = 0,05$).

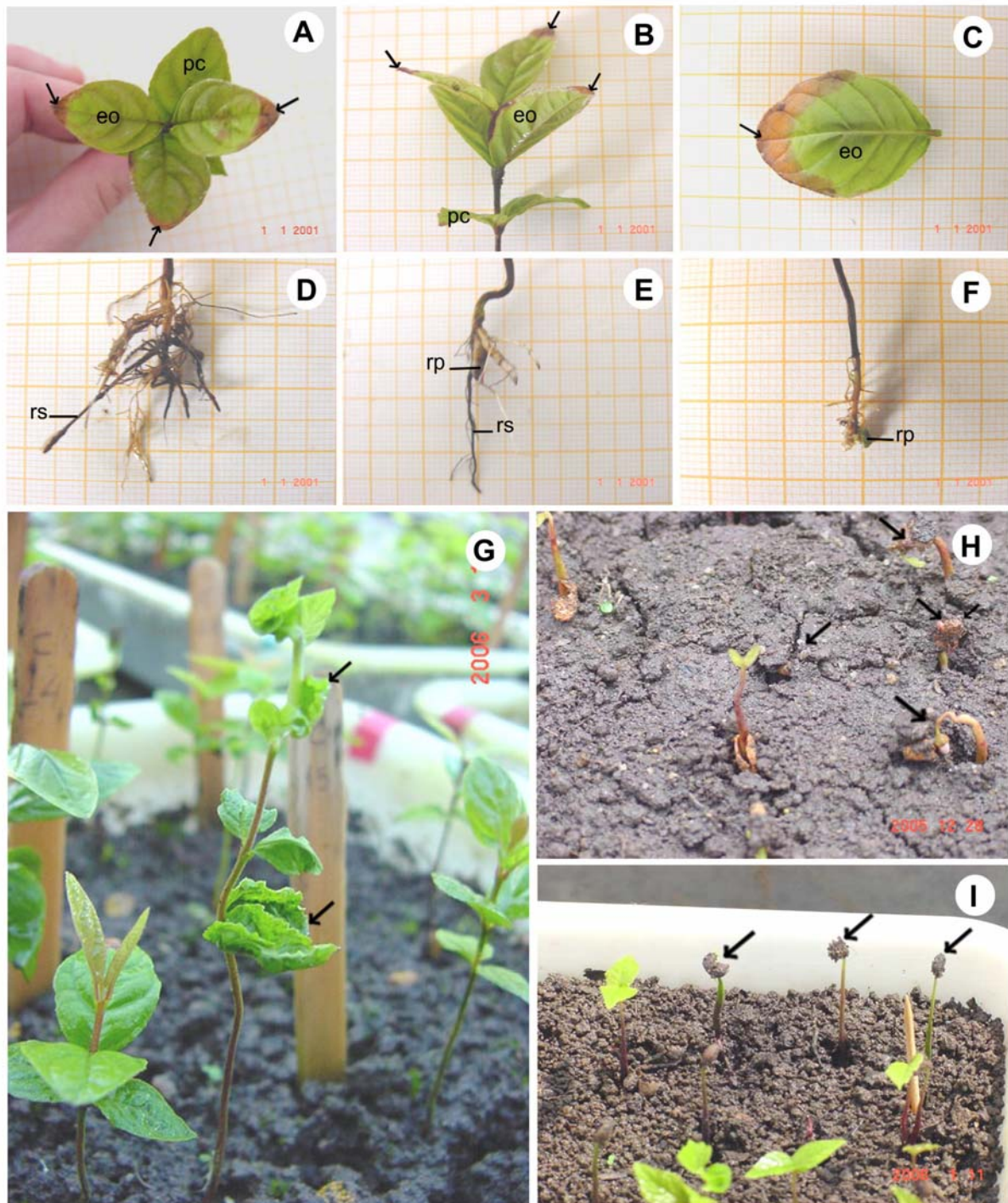


Figura 10 – Morfologia das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) crescendo em solo contaminado com petróleo. A, B, C - lesões em “V” nos paracotilédones e eofilos (seta); D, E, F - necrose no ápice da raiz principal e formação de raízes secundárias; G - enrugamento dos paracotilédones e eofilos; H - estrutura compactada do solo contaminado por petróleo e mortalidade de algumas plântulas (seta); I - camada impregnada de óleo e partículas de solo nos envoltórios da semente (seta). (ef): eofilo; (pc): paracotilédone; (hp): hipocótilo; (rp): raiz principal e (rs): raiz secundária.

4 CONCLUSÃO

A contaminação por petróleo não alterou a porcentagem final de germinação das sementes de *C. xanthocarpa* e também, não teve influencia significativa na produção de biomassa e no comprimento das plântulas, exceto a biomassa e área foliar do eofilo. Por outro lado, nota-se que o contaminante afetou a estrutura morfológica das plântulas, principalmente da raiz.

As alterações morfológicas nas plântulas do tratamento contaminado, tais como: necrose e morte da raiz, o enrugamento e as lesões em “V” nos paracotilédones e eofilos, assim como, o atraso na expansão dos paracotilédones sugerem que o contaminante exerceu influencia negativa sobre as plântulas. Provavelmente, a contaminação por petróleo causou modificações na estrutura física do solo, como por exemplo, a compactação e a aglomeração de partículas impregnadas de óleo. Além disso, o efeito tóxico do contaminante pode ter alterado quimicamente o solo. Este por sua vez, deve ter influenciado na disponibilidade de nutrientes, ou na absorção destes pelas plântulas.

A biorremediação do solo amenizou o efeito do contaminante e resultou em aumento na biomassa e no comprimento das plântulas.

5 REFERÊNCIAS

- ACHUBA, F. The effects of sublethal concentrations of crude oil on the growth and metabolism of cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. **The Environmentalist**, Ontario, v. 26, n. 1, p. 17-20, 2006.
- ADAM, G.; DUNCAN, H. J. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. **Environmental Geochemistry and Health**, Glasgow, v. 21, p. 353-357, 1999.
- ADAM, G.; DUNCAN, H. J. Influence of diesel fuel on seed germination. **Environmental Pollution**, Glasgow, v. 120, p. 363-370, 2002.
- AGBOGIDI, O. M., ONOSODE, A.T., OKONTA, C. Susceptibility of *Dennettia tripetala* (Bak.) F. seeds to crude oil. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Asaba, vol. 4, n. 2, p. 350-352, 2006.
- ALKIO, M.; TABUCHI, T. M.; WANG, X; COLÓN-CARMONA, A. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms, **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 56, n. 421, p. 2983-2994, nov. 2005.
- BAKER, J. M. The effects of oils on plants, **Environmental Pollution**, London, v.1, p. 27-44, 1970.
- BANKS, M. K.; SCHULTZ, K. E. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, Lafayette, v. 167, p. 211-219, 2005.
- BARDELI-DA-SILVA, M. Y. **Efeitos do solo contaminado com óleo diesel na germinação, crescimento e morfoanatomia de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. Sm. & Downs (Euphorbiaceae)**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds**. Berlin: Springer-Verlag, 1985.
- BONA, C; SANTOS, O.G. **Adaptações morfo-fisiológicas de espécies vegetais crescendo em solo contaminado com petróleo**. Curitiba: FUNPAR-UFPR, 2003. Relatório técnico.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1983.

CHAÎNEAU, C. H.; MOREL, J. L.; OUDOT, J. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. **Jornal of Environmental Quality**, Madison, v. 26, n. 6, p. 1478-1483, 1997.

CHUPAKHINA, G. N. E.; MASLENNIKOV, P. V. Plant adaptation to oil stress. **Russian Journal of Ecology**, Moscou, v. 35, n. 5, p. 209-295, 2004.

FARIAS, L.H.M. **Efeitos do solo contaminado por petróleo nas folhas e raízes de *Rhynchospora corymbosa* (L.) Britt. (Cyperaceae)**. 75 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

FREEDMAN, B. **Environmental Ecology: the ecological effects of pollution, disturbance, and other stress**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1993.

GILL, L. S.; NYAWUAME, H. G. K.; EHIKHAMETALOR, A. O. Effect of crude oil on the growth and anatomical features of *Chromolaena odorata* (L) K. e R. **Newsletter**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 1992.

KINAKO, P. D. S. Short-term effects of oil pollution on species numbers and productivity of a simple terrestrial ecosystem. **Environmental Pollution**, Port Harcourt, v. 26, p. 87-91, 1981.

KRAMER J. P.; KOZLOWSKI T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1960.

LABORIAL, L. G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *Salvia hispanica* L. I. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 59, n.1, p. 39-56, 1987.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. 531p.

LI, X.; FENG, Y.; SAWATSKY, N. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. **Plant soil**, Rotterdam v.192, n.2, p. 219-226, 1997.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, p. 176-177, 1962.

MALALLAH, G.; AFZAL, M.; GULSHAN, S.; ABRAHAM, D.; KURIAN, M.; DHAMI, M. S. I. *Vicia faba* as a bioindicator of oil pollution. **Environmental Pollution**, London, v. 92, n. 2, p. 213-217, 1996.

MARANHO, L. T. **Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha e do lenho de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl. (PODOCARPACEAE)**. 201 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

MAYER, J. L. S. **Impacto do solo contaminado com petróleo no crescimento e desenvolvimento de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae)**. 82 f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

MAYER, J. L. S.; BONA, C.; SANTOS, G. de O.; KOEHLER, H. S. Efeito do solo contaminado por petróleo no crescimento e desenvolvimento de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). VI Simpósio Nacional e Congresso Latino-americano. **Anais: Recuperação de áreas degradadas**, p. 299-305, Curitiba, 2005.

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R.; INFANTE, C. Phytoremediation in the tropics - The Effect of Crude Oil on the Growth of Tropical Plants. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v. 8, n. 1, p. 177- 184, 2004.

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R.; INFANTE, C. Phytoremediation in the tropics – influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. **Environmental Pollution**, London, v.138, n.1, p. 86 - 91, 2005.

OGBONNA, D. N.; IWEGBUE, C. M. A.; SOKARI, T. G.; AKOKO, I. O. Effect of bioremediation on the growth of okro (*Abelmoshus esculetus*) in the Niger Delta soils. **Environmentalist**, v. 27, p. 303-309, Port Harcourt, 2007.

PEÑA-CASTRO, J. M.; BARRERA-FIGUEROA, E. B.; FERNÁNDEZ-LINARES, L.; RUIZ-MEDRANO, R. Isolation and identification of up-regulated genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon* L.) grown under petroleum hydrocarbon stress. **Plant Science**, San Pedro Zacatenco, v. 170, p. 724-731, 2006.

PEZESHKI, S. R.; DeLAUNE, R. D. Effect of crude oil and the effectiveness of cleaner application following oiling on US Gulf of Mexico coastal marsh plants. **Environmental Pollution**, v. 112, n. 3, p. 483-489, 2001.

PROFFITT, C. E.; DEVLIN, D. J.; LINDSEY, M. Effects of oil on mangrove seedlings grown under different environmental conditions. **Marine Pollution Bulletin**, Londres, v. 30, n. 12, p. 788-793, 1995.

REIS, J. C. **Environmental control in petroleum Engineering**. Houston: Gulg Prof. Publ., 1996. 400p.

REITZ, P. R. Mirtáceas In: **Flora Ilustrada Catarinense**. (C. D. Legrand & R. M. Klein, Eds). Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues, 1977.

REZENDE, I. M. de. **Efeito do solo contaminado por óleo diesel na germinação e no desenvolvimento das plântulas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anarcadiaceae)**, 75f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

RODERJAN, C. V.; Galvão, F.; Kuniyoshi, Y. S. & Hatschbach, G. As unidades fitogeográficas do Estado do Paraná. **Ciência e Ambiente**, Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), n. 24, p. 75-92, 2002.

SANTANA, D. G de.; RANAL, M. A. **Análise da Germinação: um enfoque estatístico**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2004. 248 p.

SANTOS, C. M. R. dos; FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n.2, p. 13-20, 2004.

SANTOS, G. de O. **Crescimento, nutrição e estrutura do lenho juvenil de três espécies florestais com potencial de fitorremediação em solos contaminados com petróleo**. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SOUZA, S. L. **Revegetação de área de biorremediação contaminada por resíduos óleos de petróleo**. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TIBURTIUS E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v.27, n. 3, p. 441 - 446, 2004.

UDO, E. J.; FAYEMI, A. A. A. The effect of oil pollution of soil on germination, growth and nutrient uptake of corn. **Jornal Environmental Quality**, Madison, v.4, n.2, p. 537-540, 1975.

CAPÍTULO 3

**MORFOANATOMIA DE *Campomanesia xanthocarpa* O. BERG. (MYRTACEAE)
CRESCENDO EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO E SOLO
BIORREMEIADO**

RESUMO

O efeito da contaminação por óleo na estrutura das plantas tem sido pouco abordado no Brasil. O objetivo desse trabalho foi analisar a influência do solo contaminado com petróleo na estrutura interna de plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) e verificar se a biorremediação diminuiu os efeitos negativos do contaminante. Essa é espécie nativa, heliófita, ocorrente desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. O solo foi coletado na área da REPAR (Petrobrás) no município de Araucária, PR., onde ocorreu um vazamento de petróleo em 2000. O experimento foi montado em casa de vegetação com três tratamentos, solo contaminado (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC), e, cinco repetições cada. Foram plantadas 50 sementes em cada bandeja, totalizando 750 sementes. Coletou-se 10 plântulas por tratamento com trinta dias de idade. As plântulas foram seccionadas na região do ápice da raiz, região um centímetro acima do ápice radicial, região do colo, região mediana do hipocótilo e dos paracotilédones. As amostras foram fixadas com glutaraldeído (1%) + formaldeído (4%) e processadas em historesina. Posteriormente, foram seccionadas em micrótomo de rotação, distendidas em lâminas, submetidas à coloração com azul de toluidina e montadas de forma permanente. Para os testes microquímicos, utilizou-se lugol, sudam e cloreto férrico. Em solo contaminado a espécie apresentou alterações significativas, principalmente na raiz. Foram constatadas necrose e morte de raízes, deformações e bifurcação do ápice radicial, presença de uma camada de mucilagem envolvendo a raiz e alterações na anatomia das células de alguns tecidos. No solo biorremediado, a região do colo apresentou maior diâmetro total e espessura do córtex. *C. xanthocarpa* apresenta amido e óleo em praticamente todos os órgãos. Os compostos fenólicos estão presentes em todos os órgãos analisados para os três tratamentos. No entanto, nas plântulas do tratamento contaminado, esses compostos são mais escassos do que nos demais tratamentos. O solo contaminado com petróleo causou efeitos negativos na anatomia das plântulas. No entanto, a biorremediação do solo favoreceu o desenvolvimento das plântulas e diminuiu o efeito do contaminante.

Palavras-chave: Anatomia; poluição; biorremediação; *Campomanesia xanthocarpa*.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a poluição do solo, das águas e da atmosfera vêm se agravando, com conseqüente prejuízo para os ecossistemas. Com o aumento da demanda de combustíveis fósseis, o risco de acidentes torna-se cada vez maior. Considerando a grande variedade de contaminantes que acumulam no solo, nas águas continentais, nos oceanos e até mesmo nos organismos, o petróleo e seus derivados estão entre os mais perigosos.

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos com componentes orgânicos, sulfúricos, nitrogênio e oxigênio. Os hidrocarbonetos são quantitativamente os mais importantes constituintes do petróleo e, segundo FREEDMAN (1993), podem ser classificados em três grandes grupos: hidrocarbonetos alifáticos, acíclicos e aromáticos.

O efeito tóxico dos hidrocarbonetos pode ser influenciado por uma série de fatores como: a quantidade de óleo derramada; o tipo de óleo e os componentes tóxicos; a freqüência e o tempo de exposição; as mudanças no clima e a quantidade de oxigênio (BAKER, 1970; FREEDMAN, 1993).

Um grave acidente ambiental ocorreu na Refinaria Getúlio Vargas pertencente à Petrobrás em julho de 2000, no município de Araucária do Estado do Paraná. Houve o rompimento de um ducto e foram derramados cerca de quatro milhões de litros de petróleo afetando, além da vegetação local (vegetação natural de Floresta Ombrófila Mista), os rios Barigui e Iguaçu. A área contaminada vem sendo biorremediada com adição de microorganismos no solo, visando minimizar os efeitos do contaminante. A biorremediação é uma nova tecnologia que pode ser efetiva no tratamento de solos contaminados, sendo baseada na habilidade dos microorganismos de degradar os constituintes do petróleo e de utilizar o carbono como fonte de energia (LI *et al.*, 1997; HUTCHINSON *et al.*, 2001; AL-ZALZALEH & SHABBIR, 2004; MERKL *et al.*, 2004).

Como organismos sedentários, as plantas estão sempre expostas ao estresse das emissões locais de poluentes em maior intensidade do que os animais. Por essa razão, elas podem ser utilizadas como bioindicadoras em relação a uma variedade de substâncias tóxicas. Bioindicadores são organismos ou uma comunidade de organismos sensíveis à poluição. Esses respondem por meio de alterações dos seus

processos vitais (indicadores por meio de respostas) ou pela acumulação do poluente (indicadores por meio de acumulação) (LARCHER, 2000). Por outro lado, determinadas espécies vegetais podem ter a capacidade de estabilizar a contaminação do solo com petróleo, por exemplo, fazendo associação com microorganismos, podendo ser utilizadas para descontaminação de ambientes poluídos, sendo denominadas fitorremediadoras (PILON-SMITS, 2005).

O impacto causado pela poluição depende de muitas variáveis tais como: a quantidade e o tempo de duração do poluente; fatores intrínsecos como a idade da planta e o estágio de crescimento; respostas bioquímicas, morfológicas e fisiológicas; além de fatores ambientais (BAKER, 1970; CRAWLEY, 1997; MERKL *et al.*, 2004). Diversos autores relatam o efeito do óleo na morfologia e desenvolvimento do vegetal (BAKER, 1970; PEZESHKI & DELAUNE, 1993; BARGAGLI, 1995; VARTAPETIAN & JACKSON, 1997; ADAM & DUNCAN, 1999 e 2002; BONA & SANTOS, 2003; CHUPAKHINA & MASLENNIKOV, 2004; MARANHO, 2004; GISBERT *et al.*, 2006; MERKL *et al.*, 2004; ALKIO *et al.*, 2005; AGBOGIDI *et al.*, 2006; KECHAVARIZI *et al.*, 2006; PEÑA-CASTRO *et al.*, 2006).

Segundo ALKIO *et al.* (2005), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos causam sintomas de estresse como redução do crescimento, deformidade e redução dos tricomas, clorose, atraso na florescência, aparecimento de manchas brancas, atraso no desenvolvimento e lesões necróticas. Além disso, pode ocorrer redução no crescimento da raiz, no desenvolvimento dos pêlos radiculares, no tamanho e número de folhas e tricomas.

As plantas podem sofrer modificações variáveis em sua estrutura, quando submetidas ao estresse anaeróbico tais como, alteração no número de estômatos e aumento de espaços intercelulares, para facilitar a entrada e distribuição do oxigênio, além de aumento no número de raízes adventícias (VARTAPETIAN & JACKSON, 1997).

AGBOGIDI *et al.* (2006) afirmaram que a contaminação com óleo cru pode causar a redução da expansão celular, do crescimento dos cotilédones, da fotossíntese e da translocação de fotoassimilados nas plantas. Os poluentes têm diversos efeitos na fotossíntese, respiração, abertura dos estômatos, metabolismo, transporte de carboidratos, migração de reguladores vegetais para regiões meristemáticas, transpiração, permeabilidade de membrana e atividade enzimática (KRAMER & KOZLOWSKI, 1960). O petróleo pode afetar as plantas cobrindo as

raízes e as folhas, causando assim uma redução na transpiração e na fotossíntese em função do bloqueio físico dos estômatos e das raízes (PEZESHKI & DELAUNE, 1993).

RODRIGUES (2005) fez análises anatômicas do lenho de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. e *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs, sob efeito da contaminação por petróleo, as quais revelaram alterações estruturais no xilema destas espécies. Em solo contaminado, as duas espécies apresentaram menor número de elementos de vaso e estes tiveram tendência de menor comprimento e maior diâmetro.

MARANHO (2004) estudou o efeito da contaminação do solo por petróleo em *Podocarpus lambertii* e observou que a cutícula das folhas dos indivíduos coletados na região exposta à poluição por petróleo foi, em média, 75% mais espessa do que nas folhas dos indivíduos controle. Para esse mesmo autor, as alterações ocorridas, tanto nas folhas, como no lenho dos indivíduos expostos à poluição por petróleo, podem refletir os efeitos e/ou as adaptações das plantas para a sobrevivência sob condições de estresse hídrico.

Os solos contaminados com materiais hidrofóbicos, como os hidrocarbonetos orgânicos, tornam-se repelentes à água (LI *et al.*, 1997). Se o teor de água no solo é muito maior que a capacidade de campo, o ar é deslocado do espaço correspondente aos poros não capilares e o crescimento da raiz e a absorção de água ficam impedidos por déficit aeróbio. Se o teor de água é muito baixo, esta fica tão fortemente aderida às partículas do solo que se torna indisponível às raízes. (KRAMER & KOZLOWSKI, 1960).

São inúmeros os acidentes ambientais e os efeitos da contaminação sobre a vegetação. No entanto, são poucos os trabalhos que relatam a influência da contaminação por petróleo na morfoanatomia das plantas. Em função disso, o presente estudo tem como objetivo analisar o efeito do solo contaminado com petróleo na morfologia e estrutura interna de plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* e verificar se a biorremediação diminuiu esses efeitos. Esta é espécie nativa, heliófita, ocorrente desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, presente na formação vegetal Floresta Ombrófila Mista em que ocorreu o acidente. Apresenta grande importância, pois, além de ser espécie freqüente na região da REPAR, seus frutos são bastante apreciados pela fauna.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e montagem do experimento

Foram coletados frutos maduros de árvores localizadas no município de Colombo-PR, em uma área de Floresta Ombrófila Mista, próxima a Embrapa Florestas. Os frutos foram despulpados em água corrente com o auxílio de uma peneira para a extração das sementes. Estas, posteriormente, foram deixadas ao ar livre para secagem.

O solo foi coletado em dezembro de 2005 na REPAR/Petrobrás. Este foi peneirado, homogeneizado e distribuído em bandejas plásticas. O experimento consistiu de três tratamentos com cinco repetições cada: tratamento (C) - solo contaminado com petróleo; tratamento (BR) - solo biorremediado; tratamento (NC) - solo não contaminado.

O experimento foi montado em casa de vegetação do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, em dezembro de 2005. Foram plantadas cerca de 50 sementes em cada bandeja e estas ficaram sob controle de nebulização a cada 30 minutos.

2.2 Estudo mofoanatômico

Foram coletadas aleatoriamente duas plântulas (com 30 dias de idade) de cada uma das cinco repetições (bandejas). Dessas, foram seccionadas e fixadas as seguintes partes: ápice da raiz, região a um centímetro do ápice, região do colo, região mediana do hipocótilo e dos paracotilédones (Figura 1).

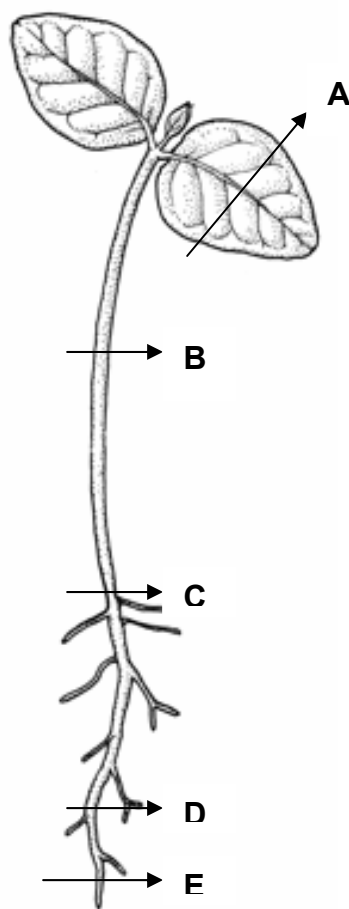


Figura 1 - Esquema da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) mostrando as regiões que foram seccionadas. A – região mediana do paracotilédone; B – região mediana do hipocótilo; C – região do colo; D – região a um centímetro do ápice; E – região do ápice da raiz.

As amostras foram fixadas em glutaraldeído (1%) + formaldeído (4%) (McDOWELL & TRUMP, 1976) e incluídas em historresina, seccionadas em micrótomo de rotação, distendidas em lâminas e submetidas à coloração com azul de toluidina (O` BRIEN *et al.*, 1965). Para os testes microquímicos foram realizados cortes a mão livre. utilizou-se lugol (BERLYN & MIKSCHE, 1976) para detectar amido; sudan III (SASS, 1951) para detectar substâncias graxas e cloreto férrico 10% (JOHANSEN, 1940) para detectar compostos fenólicos.

As lâminas foram analisadas qualitativamente e quantitativamente e os tecidos fotografados ao microscópio fotônico da marca Zeiss com câmera fotográfica Sony Cyber Shoot 2000, no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica da UFPR. As caracterizações tanto morfológicas, como anatômicas, foram descritas de acordo com as terminologias de VOGEL (1980) e SOUZA (2003).

As secções anatómicas foram mensuradas com o auxílio de ocular micrometrada, sendo registrado da raiz, do hipocótilo e do colo - o diâmetro total, a espessura do córtex, o diâmetro do cilindro vascular e da medula e a espessura da epiderme; e dos paracotilédones, a espessura total do mesofilo, a espessura do parênquima paliçádico, do parênquima lacunoso, da epiderme e o número de estômatos por mm². Foram mensurados também os espaços lacunares da raiz. Para tanto, utilizou-se microscópio fotônico com câmara clara acoplada para fazer as lustrações que foram digitalizadas e analisadas no programa Sigma-Scan Pro Versão 5.0. A contagem dos estômatos foi realizada em microscópio com câmara clara acoplada, onde se projetou a imagem da epiderme sobre uma área conhecida. Para isto, a epiderme da face abaxial dos paracotilédones foi coberta com três camadas de esmalte incolor que após seco foi retirado com auxílio de pinça. Os moldes retirados foram montados em lâminas com água. Para cada repetição foi considerado o valor médio das duas plântulas coletadas por bandeja, tendo sido medidos dez cortes por plântula.

2.3 Microscopia eletrônica de varredura

Para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizaram-se três amostras do terço médio dos paracotilédones, tanto da face adaxial como da abaxial, de plântulas cultivadas em solo contaminado, biorremediado e não contaminado. Estas foram fixadas em F.A.A. 50 e desidratadas em série alcoólico-etílica. Em seguida, o material foi submetido ao método do ponto crítico no equipamento Balzers CPC 10. As amostras foram aderidas em suporte metálico com fita adesiva de cobre. Posteriormente, efetuou-se a metalização com ouro no equipamento Balzers Sputtering SCD 030. A análise e registro eletromicrográfico do material foram efetuados no MEV Jeol JSM-6360LV.

2.4 Análise química e física do solo

No início do experimento foram coletadas amostras de solo de cada repetição dos três tratamentos para análise química e física, realizada pelo laboratório de Análises Agronômicas do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná. A análise de TPH (total de hidrocarbonetos do petróleo) foi feita pelo LACTEC (Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento) (Tabela 1).

2.5 Estatística

Os resultados morfométricos foram submetidos à análise estatística no programa MSTAT-C®. Os dados foram analisados estatisticamente seguindo um delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos e cinco repetições cada. Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett para verificar a homogeneidade das variâncias. Posteriormente, realizou-se a análise de variância (ANOVA) para observar se houve diferenças estatísticas entre as médias testadas. Nos casos em que o resultado da ANOVA foi significativo, aplicou-se o teste Tukey de comparação de médias. Foi utilizado um nível de probabilidade de 0,05. Para confecção dos gráficos utilizou-se o programa Excel 2003 para Windows XP (Microsoft Corporation).

3 RESULTADOS

3.1 Anatomia da raiz

3.1.1 Raiz

Em secção transversal da raiz a um centímetro do ápice, a espessura da epiderme, o diâmetro total da raiz e o diâmetro do cilindro vascular não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Figura 2 A-C). Observou-se que a espessura do córtex no solo biorremediado foi maior em relação aos demais tratamentos, sendo que o contaminado e o não contaminado foram iguais (Figura 2 D). Porém, não foi avaliado se estas diferenças são devidas ao maior diâmetro ou à maior quantidade de células. A área de espaço intercelular do córtex da raiz também foi igual nos três tratamentos (Figura 2 E). No entanto, é possível notar que as células da região do córtex, no tratamento contaminado, são mais compactadas (Figura 3 A, B) que as células corticais dos demais tratamentos (Figura 3 C-F). As células da exoderme no solo contaminado são pouco diferenciadas, quando comparadas com os demais tratamentos (Figura 3 B, D, F). Além disso, as células da endoderme nos tratamentos não contaminado e biorremediado apresentam conteúdo escuro, tratando-se de compostos fenólicos (Figura 3 C, E). Nas células do tratamento contaminado este conteúdo parece ser mais escasso (Figura 3 A).

As raízes analisadas estavam em início de crescimento secundário em todos os tratamentos. Porém, houve um atraso no desenvolvimento dos tecidos secundários nas plântulas do solo contaminado, quando comparado aos demais tratamentos (Figura 3 A, C, E).

Em solo contaminado observou-se uma camada conspícua de substância envolvendo a superfície da raiz, mais intensamente na região do ápice, podendo se tratar de mucilagem formada pela raiz em resposta ao estresse causado pela contaminação (Figura 4 A, B, C, D e E). Esta camada não foi observada nos demais tratamentos (Figura 5 A, B). Também é possível notar que houve deformações das raízes, especialmente na região do ápice, nas plântulas do tratamento contaminado, o que não ocorreu nos demais tratamentos (Figura 4 B, C e 5 A, B). Além disso, as células do ápice radicial em solo contaminado, apresentaram a parede celular com

coloração mais escura que o normal, conteúdo mais denso e formato mais irregular, quando comparadas àquelas dos demais tratamentos (Figuras 4 C, D, E, F e 5 C-E). Além disso, ocorreu também a formação de raízes secundárias muito próximas ao ápice, provenientes do periciclo, nas plântulas do tratamento contaminado (Figura 4 G) e, até mesmo, a bifurcação do ápice da raiz principal, nesse mesmo tratamento (Figura 4 A). É possível ainda notar que a região do cilindro vascular e do córtex (meristema fundamental cortical), nas plântulas do solo contaminado, apresentam forma mais irregular (Figura 4 A, B, C) quando comparadas com as dos solos biorremediado (Figura 5 A, D) e não contaminado (Figura 5 B, F).

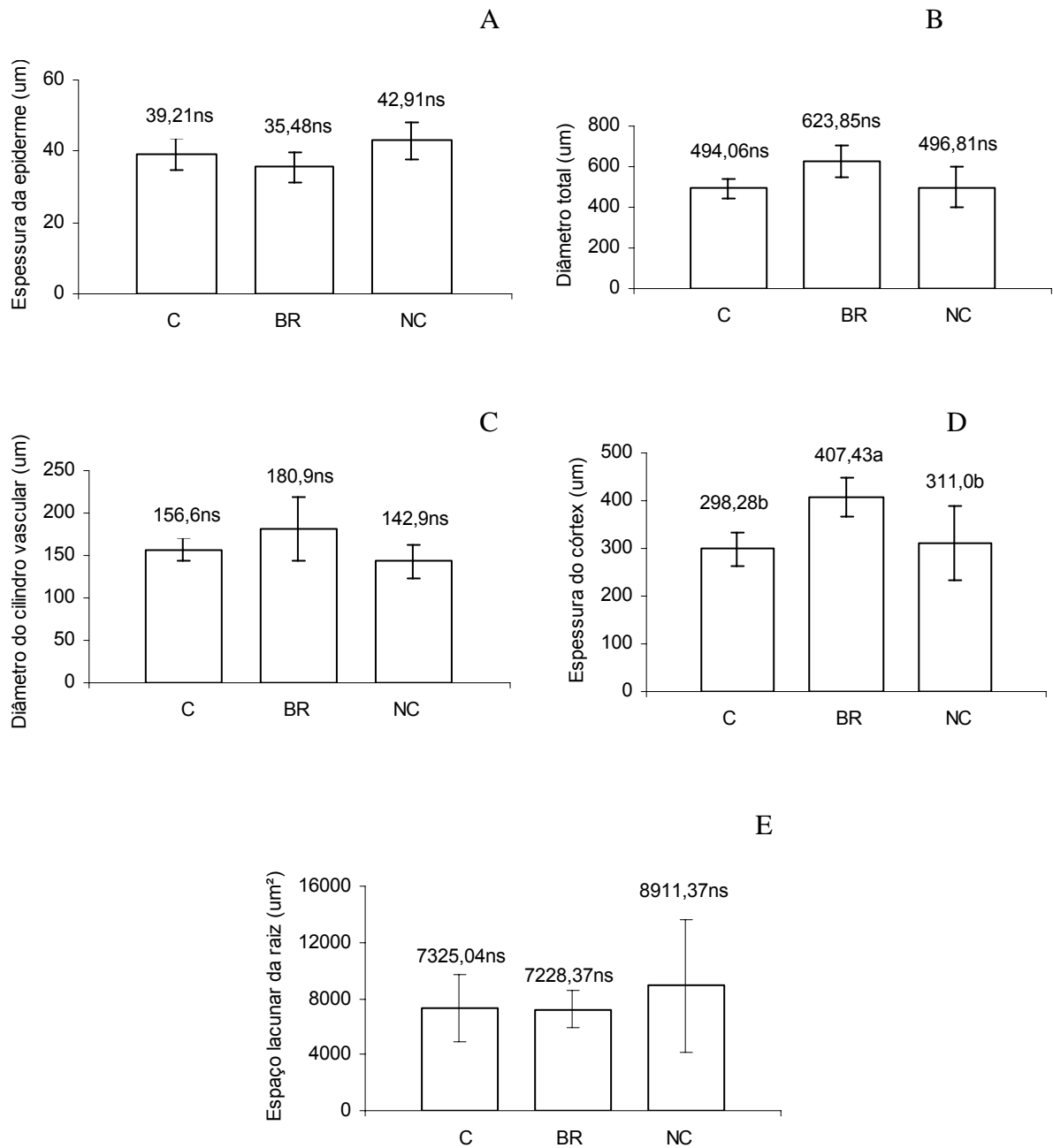


Figura 2 – Parâmetros anatômicos da raiz a um centímetro do ápice das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 dias, em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. ns: não são significativamente diferentes, considerando ($\alpha = 0,05$).

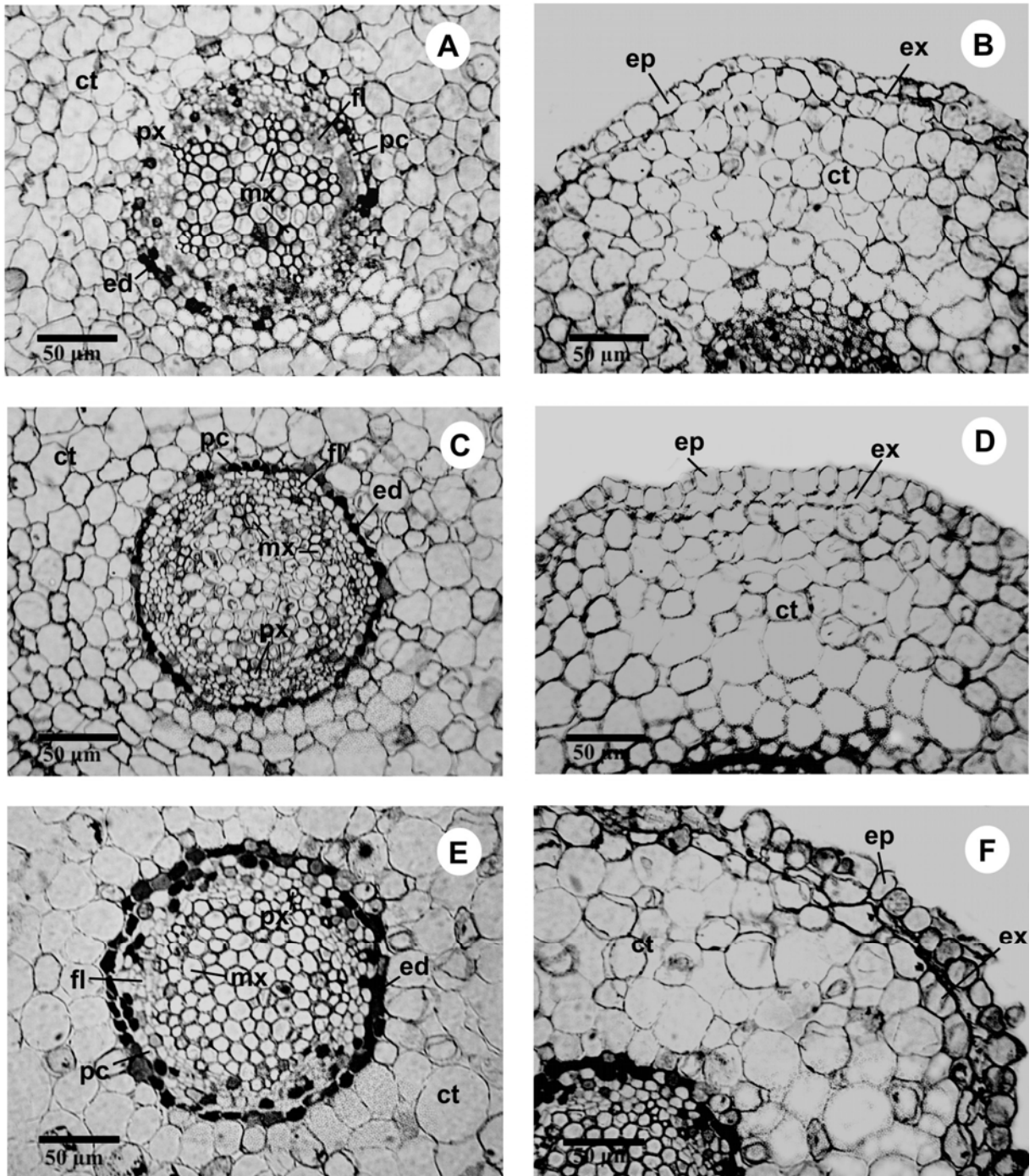


Figura 3 - Secções transversais da raiz a um centímetro do ápice de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) cultivadas em solo contaminado com petróleo (A, B), solo biorremediado (C, D) e solo não contaminado (E, F). A, C, E – região evidenciando a ed: endoderme; ct: córtex; fl: floema; mx: metaxilema; px: protoxilema, pc: periciclo. B, D, F – região evidenciando a ep: epiderme; ex: exoderme e ct: córtex.

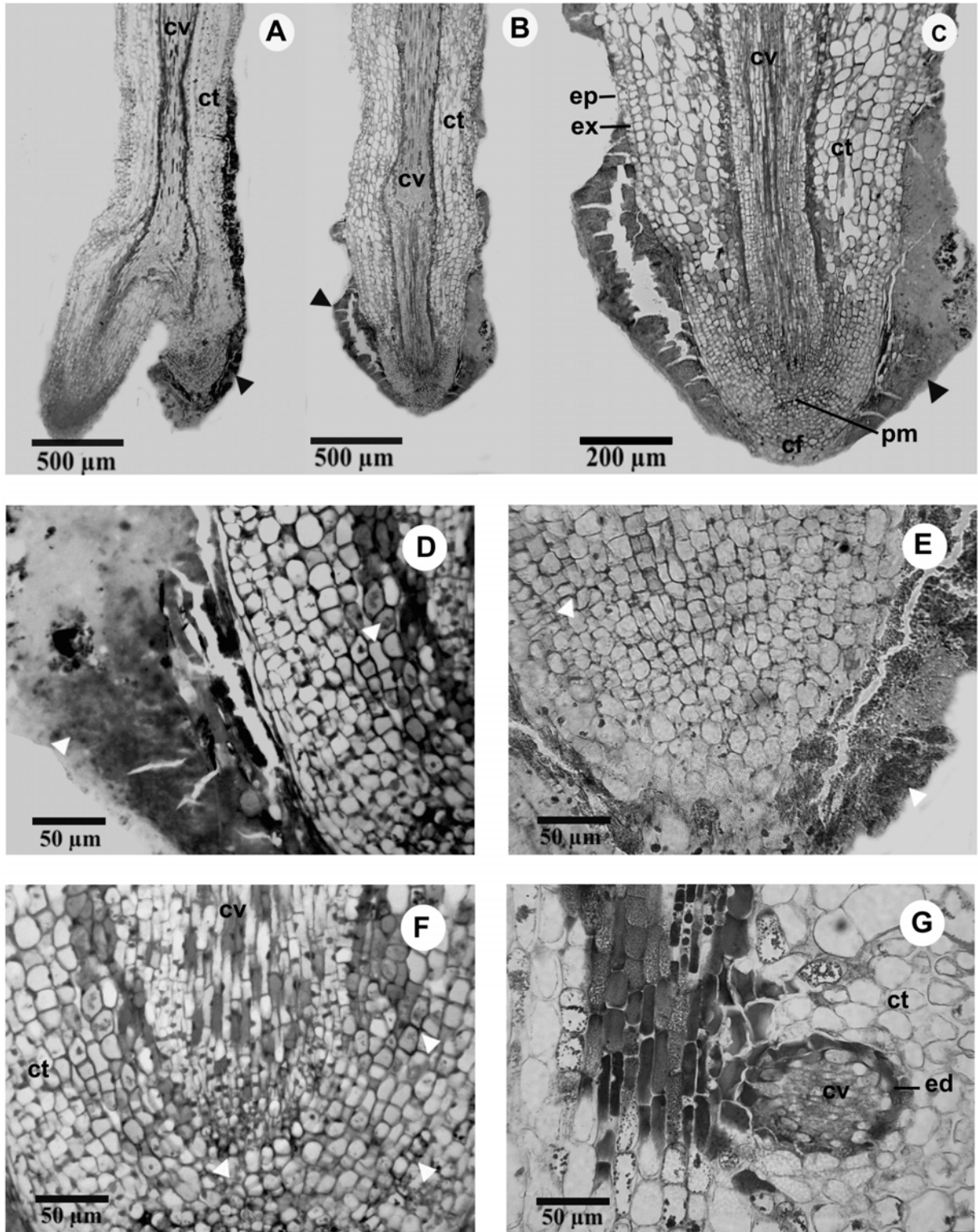


Figura 4 - Secções longitudinais do ápice da raiz de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) em solo contaminado por petróleo. A - setas indicando a bifurcação do ápice e acúmulo de mucilagem. B - sinuosidade no ápice e acúmulo de mucilagem (seta). C - presença de mucilagem (seta) e células da coifa com parede mais espessa. D, E - presença de mucilagem e parede celular mais espessa (seta); F - setas evidenciando parede celular mais espessa; G - formação de raiz secundária. ep: epiderme; ex: exoderme; ed: endoderme; ct: córtex; cv: cilindro vascular; cf: coifa; pm: prómeristema.

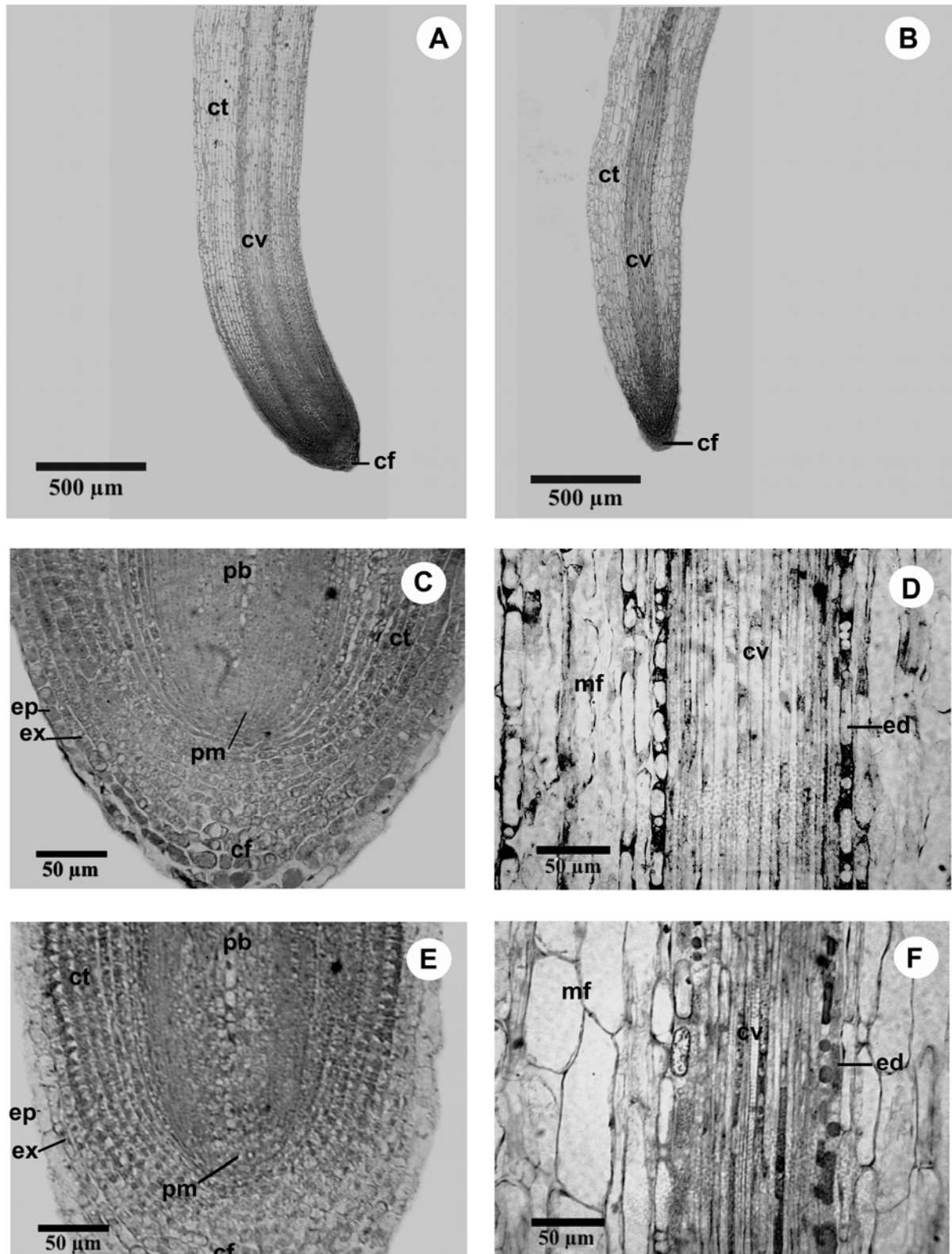


Figura 5 - Secções longitudinais do ápice da raiz de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). A – estrutura geral do ápice em solo biorremediado. B - estrutura geral do ápice em solo não contaminado. A, C, E - solo biorremediado. B, D, F – solo não contaminado. C, E – meristema apical evidenciando ep: epiderme; ex: exoderme; ed: endoderme; ct: córtex; pc: prócambio; cf: coifa; pm: prómeristema. D, F – meristema apical evidenciando o mf: meristema fundamental; cv: cilindro vascular e ed: endoderme.

3.1.2 Colo

A espessura da epiderme na região do colo foi menor no tratamento biorremediado em relação ao não contaminado, porém, no solo contaminado a epiderme não diferiu em relação aos demais tratamentos (Figura 6 A). Tanto o diâmetro total, quanto a espessura do córtex da região do colo, foram maiores em solo não contaminado do que no solo biorremediado e contaminado ($p < 0,05$) (Figura 6 B, C). Por outro lado, o diâmetro do cilindro vascular não apresentou diferença estatística entre os três tratamentos (Figura 6 D). Para a morfologia das células da raiz nessa região, não foi observada nenhuma alteração significativa (Figura 7 A-F). No entanto, nota-se que houve, tal como na raiz, um atraso no desenvolvimento do cilindro vascular em solo contaminado, quando comparado aos demais tratamentos (Figura 7 A, C, E). Além disso, é possível notar que as células na periferia do floema apresentam conteúdo escuro (compostos fenólicos) no solo biorremediado e não contaminado. Entretanto, é possível notar que embora ocorra conteúdo escuro (compostos fenólicos) na periferia do floema das plântulas dos três tratamentos, tal conteúdo é mais escasso no solo contaminado.

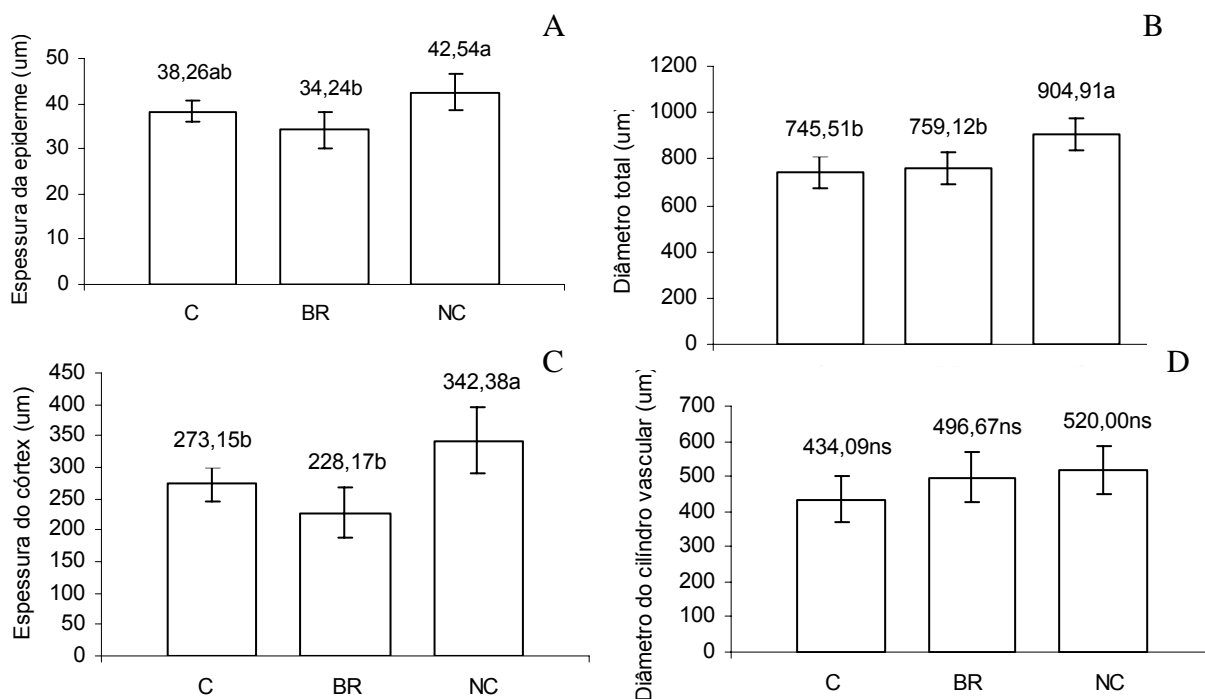


Figura 6 - Valores das médias para região do colo das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 dias, em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. ns: não são significativamente diferentes, considerando ($\alpha = 0,05$).

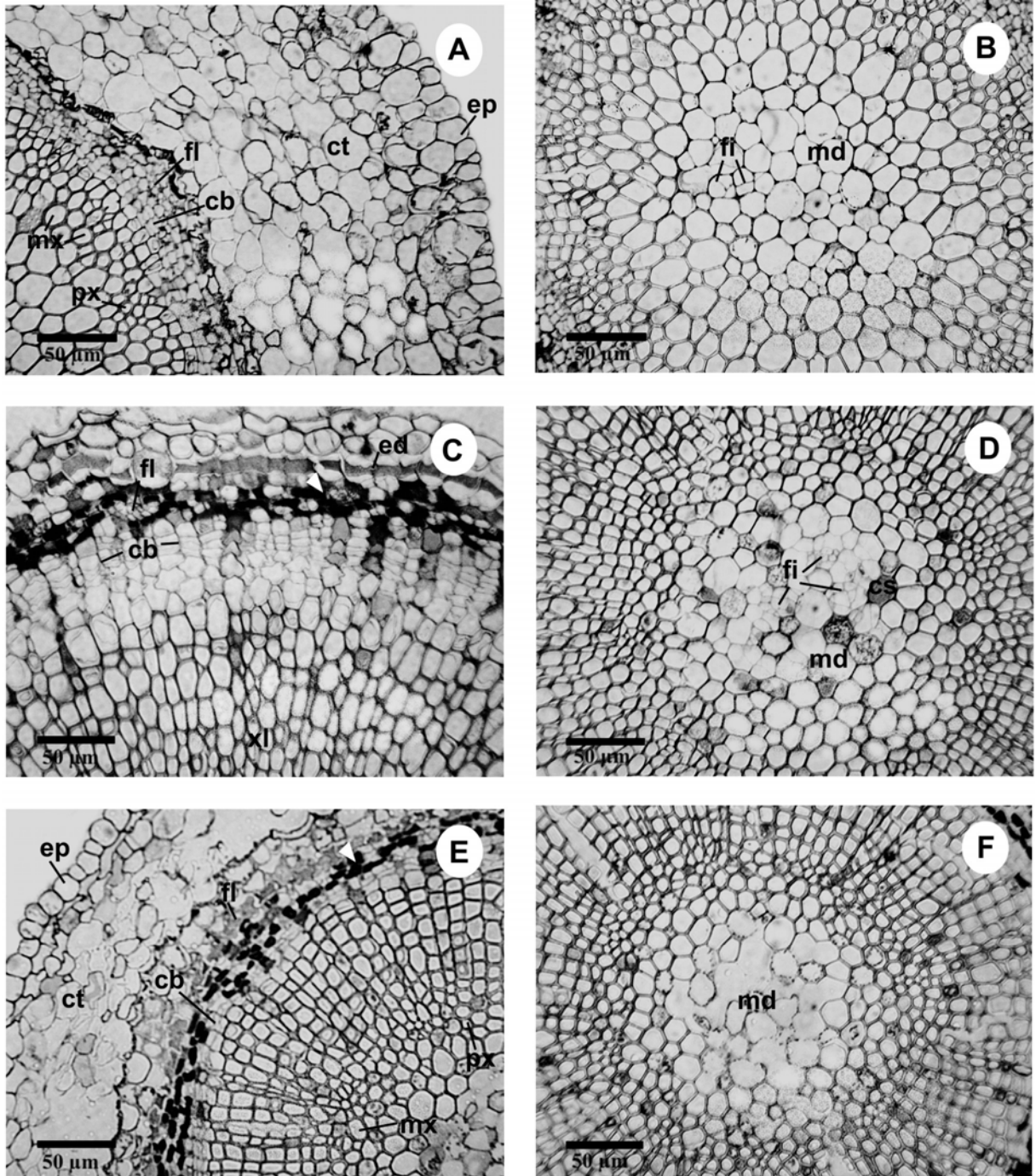


Figura 7 - Secções transversais da região do colo de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) cultivadas em solo contaminado com petróleo (A, B), solo biorremediado (C, D) e solo não contaminado (E, F). A, C, E – região evidenciando a ep: epiderme; cb: câmbio; ct: córtex; fi: floema; mx: metaxilema; px: protoxilema. B, D, F – região evidenciando fi: floema interno; cs: célula secretora e md: medula.

3.1.3 Hipocótilo

Na região do hipocótilo a espessura da epiderme no tratamento não contaminado é maior em relação ao biorremediado, mas não difere do solo contaminado (Figura 8 A). Por outro lado, tanto o diâmetro total, quanto o diâmetro da medula e a espessura do córtex não diferiram estatisticamente entre os três tratamentos (Figura 8 B-D). O diâmetro do cilindro vascular no tratamento não contaminado apresentou média maior do que as do tratamento contaminado, não diferindo do biorremediado (Figura 8 E). Quanto à morfologia das células da epiderme e do córtex nessa região, não foi observada nenhuma alteração significativa (Figura 9 A-F). Por outro lado, as células do xilema secundário no solo contaminado são menores do que nos demais tratamentos (Figura 9 B, D, F). Além disso, como observado na região do colo, as células contendo compostos fenólicos são mais escassas no tratamento contaminado do que nos demais (Figura 9 B, D, F).

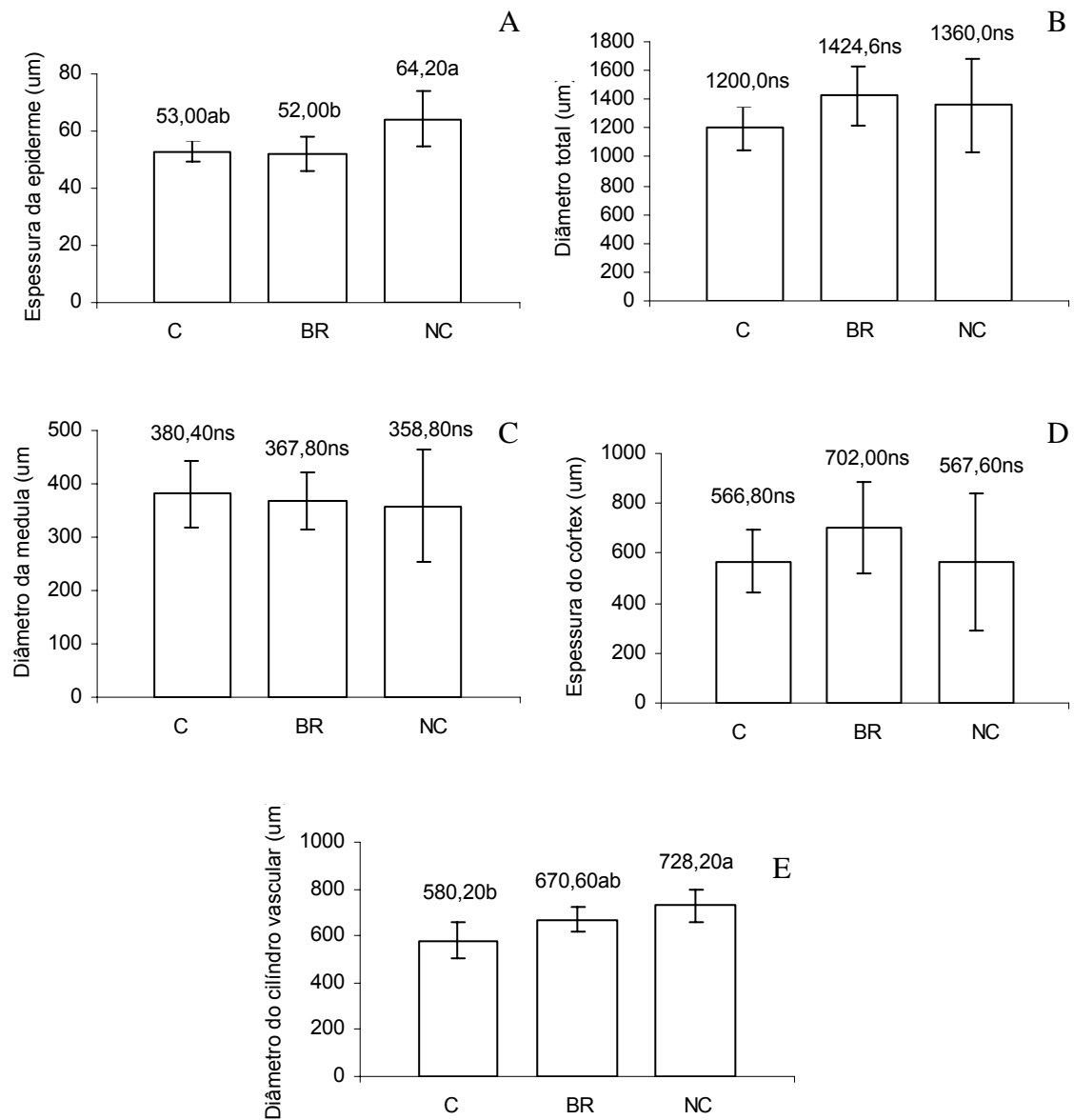


Figura 8 - Valores das médias para região do hipocótilo das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 dias, em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. ns: não são significativamente diferentes, considerando ($\alpha = 0,05$).

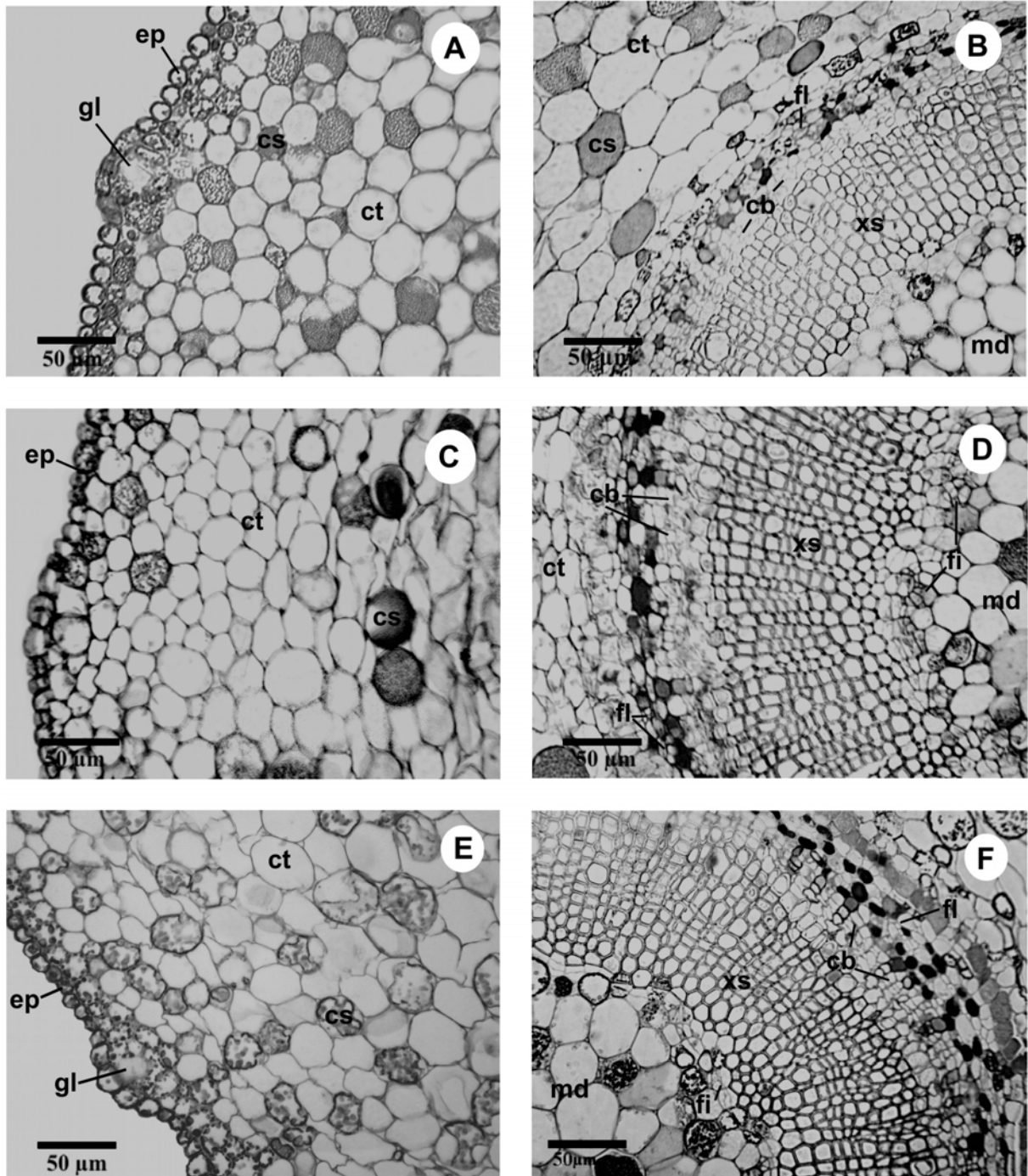


Figura 9 - Secções transversais da região mediana do hypocótilo de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) cultivadas em solo contaminado com petróleo (A, B), solo biorremediado (C, D) e solo não contaminado (E, F). A, C, E – região evidenciando a ep: epiderme; ct: córtex; gl: glândula; cs: célula secretora. B, D, F região evidenciando ct: córtex; cb: câmbio; xs: xilema secundário; fl: floema; fi: floema interno; cs: célula secretora e md: medula.

3.1.4 Paracotilédones

Nos paracotilédones não houve diferença significativa no número de estômatos, nas espessuras da epiderme e do parênquima lacunoso, entre os três tratamentos (Figura 10 A-C). No entanto, a espessura do parênquima paliçádico em solo contaminado com petróleo foi menor do que nos demais tratamentos ($p < 0,05$), e o biorremediado não diferiu do não contaminado (Figuras 10 D). Portanto, espera-se que a espessura total dos paracotilédones seja menor no tratamento contaminado. Isto parece ocorrer quando se considera a média absoluta neste tratamento (Figura 10 E). Porém, não foi possível confirmar este fato porque as variâncias não foram homogêneas. Na região do mesofilo dos paracotilédones as células do parênquima paliçádico apresentam menor tamanho em solo contaminado quando comparado com os demais tratamentos (Figura 11 B, D, F). Além disso, nota-se que o tecido vascular na nervura central dos paracotilédones é menos espesso no solo contaminado, quando comparado com o solo biorremediado e não contaminado (Figura 11 A, C, E). As células do xilema têm, em geral, paredes mais finas no solo contaminado, do que nos demais tratamentos (Figura 11 A, C, E). Na região da nervura central dos paracotilédones dos três tratamentos nota-se que ocorrem células com compostos fenólicos, tanto na periferia dos tecidos vasculares, quanto logo abaixo das células da epiderme, na face abaxial (Figura 11 A, C, E). No entanto, esse conteúdo é mais escasso nas células do solo contaminado (Figura 12 A).

A epiderme do paracotilédone, em vista frontal, apresenta células de formato irregular, com paredes anticlinais sinuosas em ambas as faces do limbo (Figura 12 A-F e 13 A-F). Também se observa a presença de estrias epicuticulares na parede celular (Figura 12 D). Na face abaxial é possível notar o aparato estomático, do tipo anomocítico, e a presença de glândulas secretoras de óleo (Figura 13 B, D, E, F). Tanto na face adaxial, quanto na face abaxial, observa-se a presença de tricomas tectores unicelulares, principalmente sobre as nervuras (Figuras 12 A, F e 13 A-C). Na face abaxial e na adaxial, em todos os tratamentos, não foram constatadas quaisquer alterações na estrutura das células.

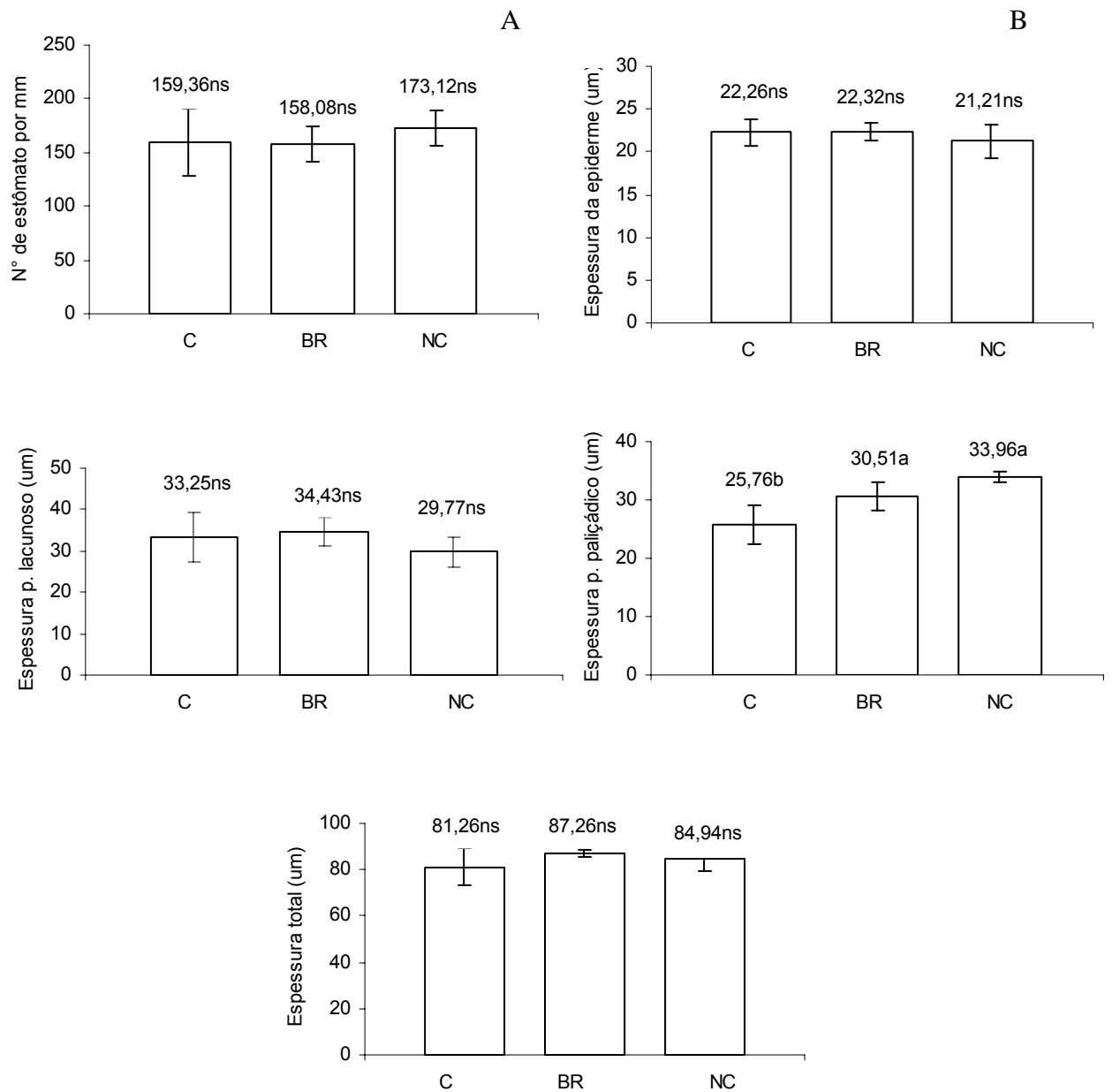


Figura 10 - Valores das médias para região dos paracotilédones das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) com 30 dias, em solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Cada coluna representa a média de cinco repetições, barras indicam o desvio padrão. ns: não são significativamente diferentes considerando ($\alpha = 0,05$).

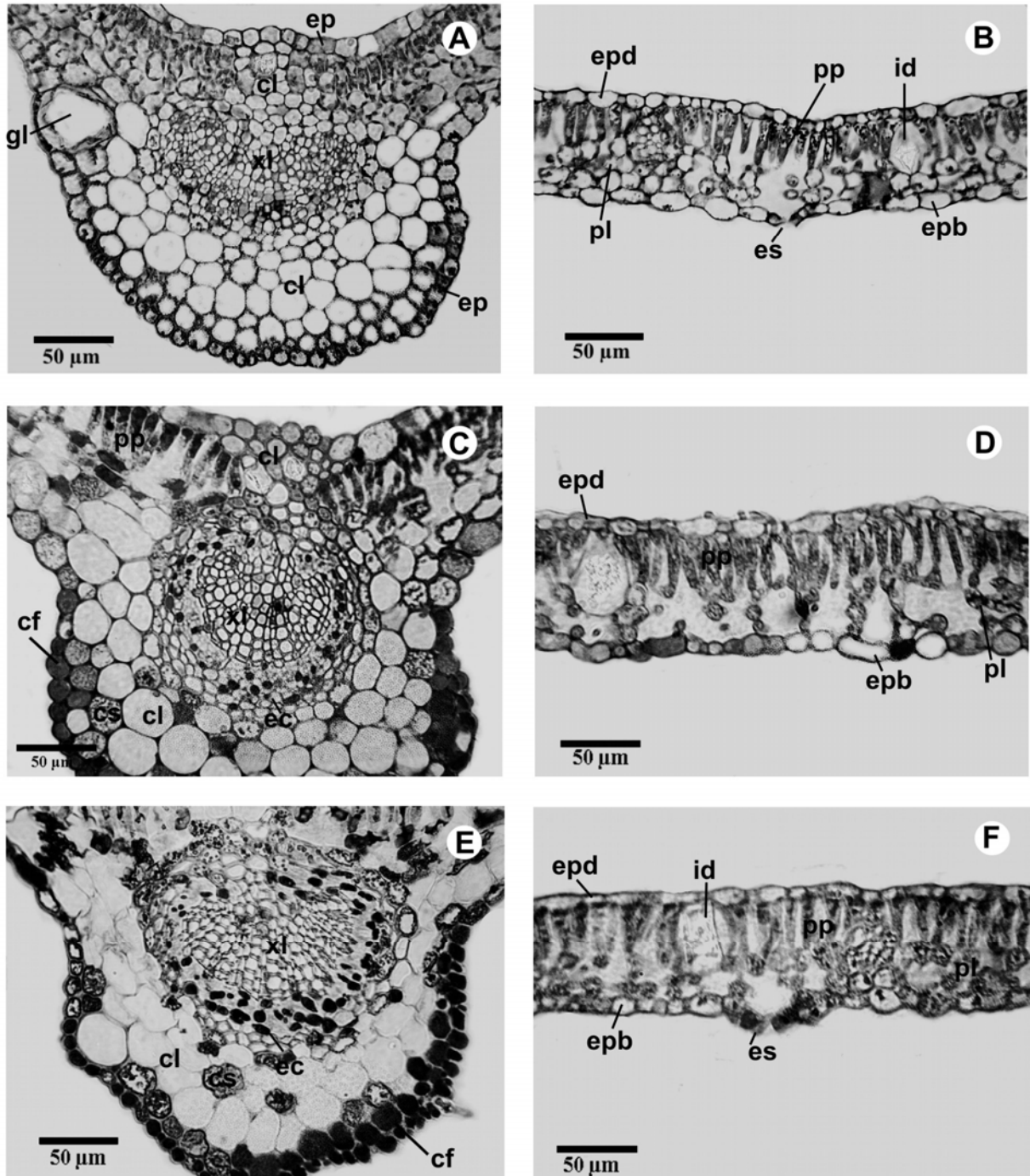


Figura 11 - Secções transversais da região mediana do paracotilédone de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) cultivadas em solo contaminado com petróleo (A, B), solo biorremediado (C, D) e solo não contaminado (E, F). A, C, E – região da nervura central evidenciando a cf: composto fenólico; cl: colênquima; ep: epiderme; gl: glândula; xl: xilema. B, D, F – região do mesofilo evidenciando a epd: epiderme da face adaxial; epb: epiderme da face abaxial; es: estômato; id: idioblasto; pl: parênquima lacunoso e pp: parênquima paliádico.

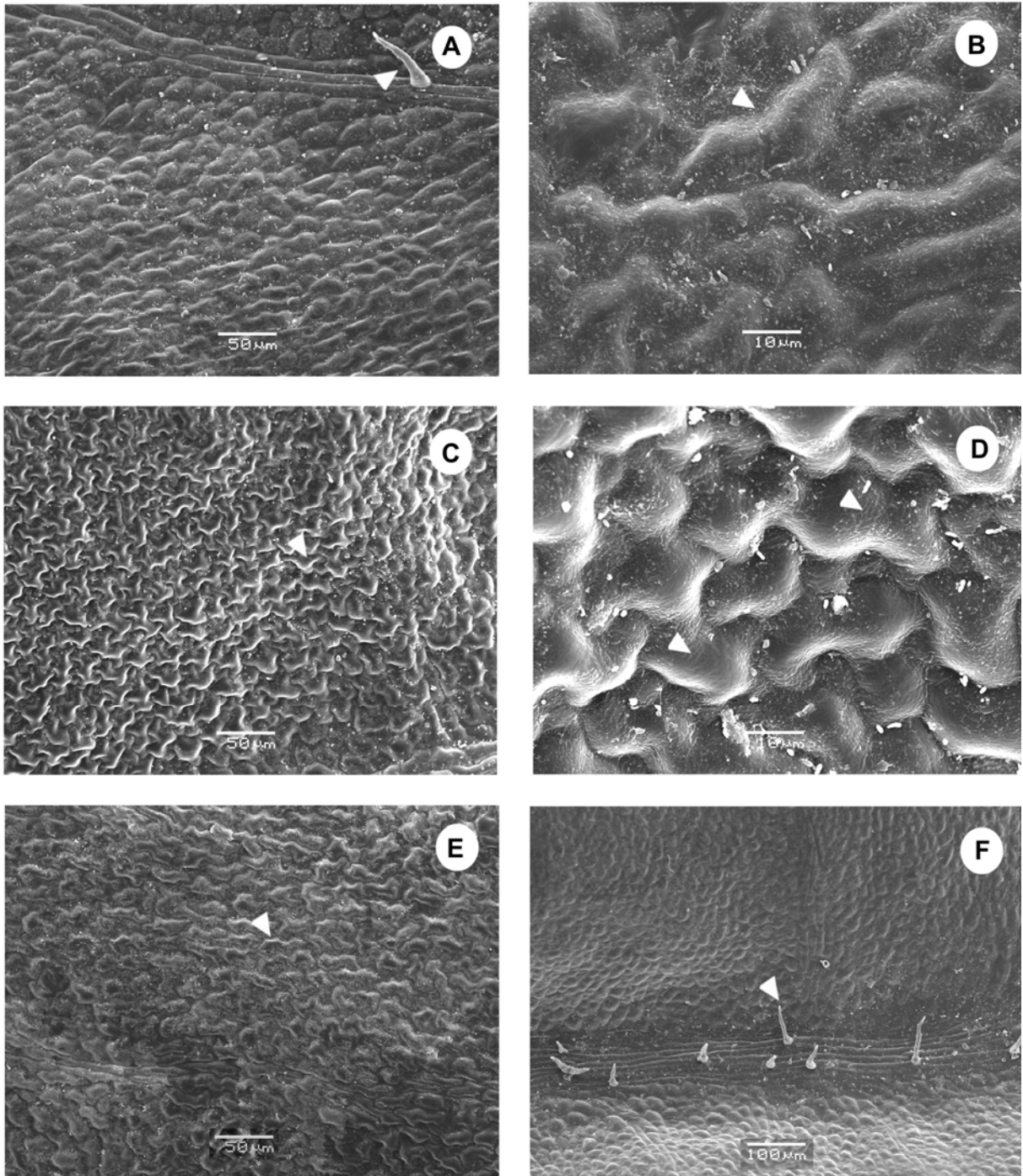


Figura 12 - Superfície adaxial dos paracotilédones de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) cultivadas em solo contaminado com petróleo (A, B), solo biorremediado (C, D) e solo não contaminado (E, F). A, F - parede celular e tricoma tector. B, C, E – sinuosidades na parede celular (seta). D – parede celular evidenciando as estrias epicuticulares (seta).

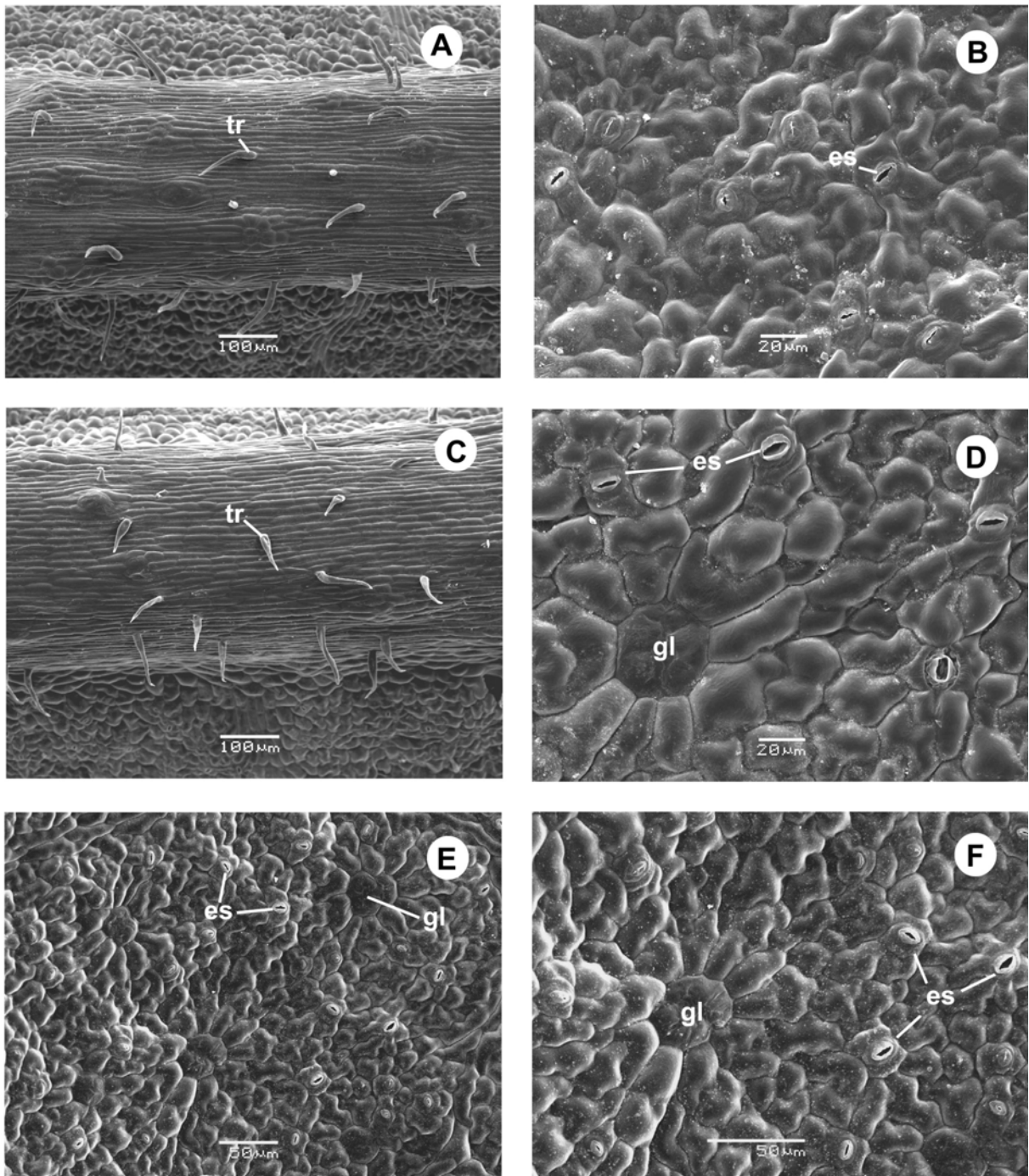


Figura 13 - Superfície abaxial dos paracotilédones de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) cultivadas em solo contaminado com petróleo (A, B), solo biorremediado (C, D) e solo não contaminado (E, F). A, C – região da nervura central evidenciando os tricomas. B, D, E, F – região evidenciando as células da epiderme. es: estômato; gl: glândula; tr: tricoma tector.

3.2 Testes microquímicos

C. xanthocarpa apresenta glândulas secretoras em praticamente todos os órgãos, exceto na raiz. Essas têm conteúdo lipídico, como verificado através do teste com Sudam III. Com base neste mesmo teste, pode-se constatar a ocorrência de uma cutícula relativamente delgada sobre a epiderme do hipocótilo (Figura 14 A, B). Apesar de *C. xanthocarpa* apresentar tricomas do tipo tector, com o teste de Sudam III foi possível notar a presença de um conteúdo de natureza lipídica nos tricomas do hipocótilo (Figura 14 A, B) e nos paracotilédones.

Através do teste com Lugol foi observada a presença de amido nas células parenquimáticas do córtex e da medula do hipocótilo (Figura 14 C, D), bem como nos paracotilédones das plântulas de *C. xanthocarpa*.

Constatou-se a presença de células secretoras na epiderme, no córtex e na medula do hipocótilo, assim como no mesofilo e na nervura central do paracotilédone. O conteúdo destas células ocorre de diferentes formas e, considerando o resultado do teste com sulfato ferroso, se trata de compostos fenólicos (Figura 14 E, F).

A espécie apresentou resultado positivo para todas as substâncias químicas testadas, nos três tratamentos (Figura 14 A-F). No entanto, o conteúdo escuro (compostos fenólicos) na região um centímetro do ápice, região do colo, região do hipocótilo e dos paracotilédones, foi mais escasso no solo contaminado quando comparados com o biorremediado e o não contaminado (Figuras 3 A, C, E; 7 A, C, E; 9 A, C, E e 11 A, C, E).

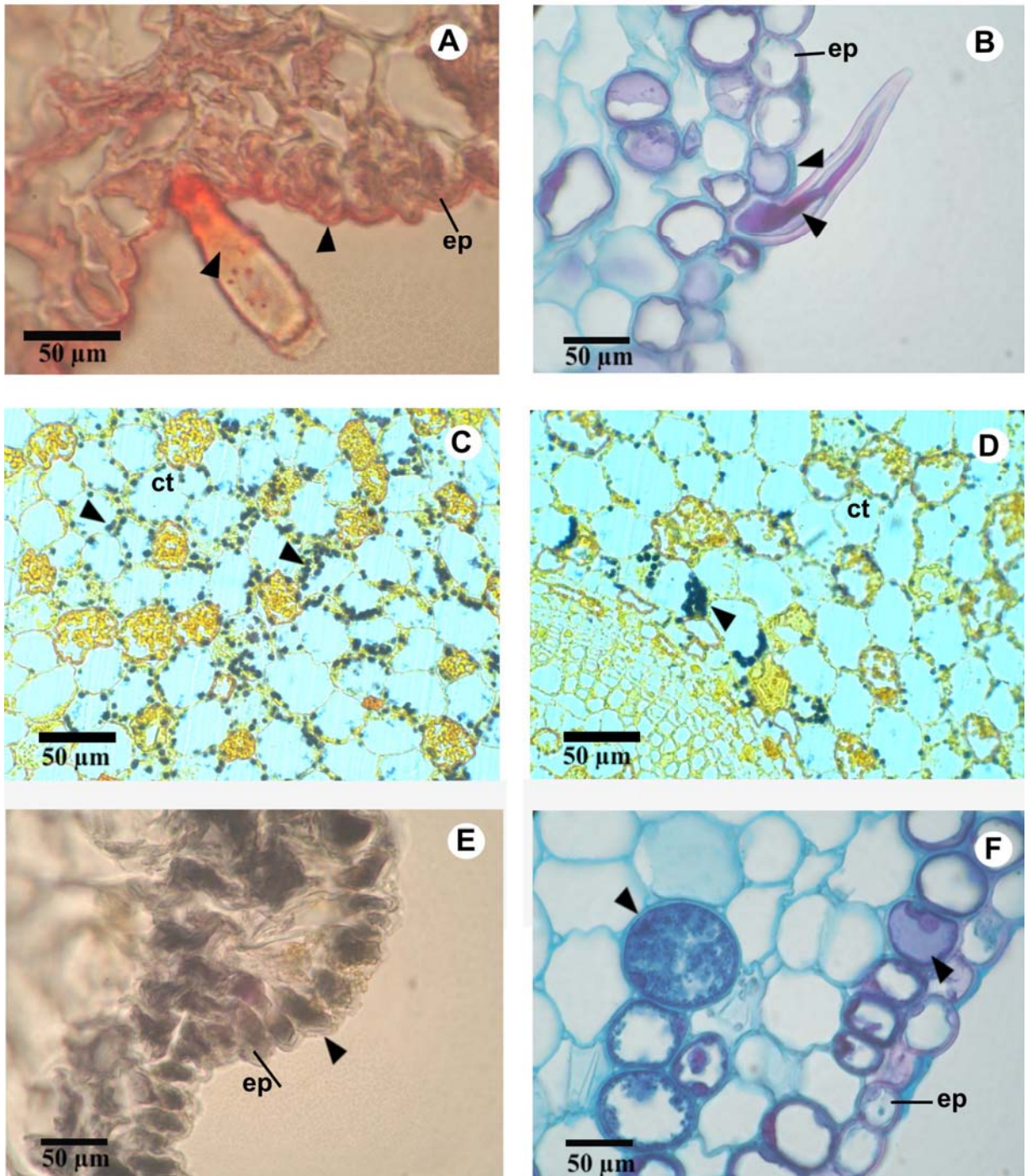


Figura 14 - Testes microquímicos na região do hipocótilo da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) em solo não contaminado. A e B - epiderme e tricoma tector com lipídio (seta); C e D - parênquima cortical com amido (seta); E e F - epiderme e parênquima cortical com compostos fenólicos (seta).

4 DISCUSSÃO

A contaminação por petróleo pode causar diversas alterações no crescimento, na morfologia e na anatomia das plantas. Por outro lado, apesar de serem freqüentes os acidentes com derramamento de petróleo, que causam grandes prejuízos à vegetação, são poucos os trabalhos que abordam a influência do contaminante na estrutura interna das plantas. Além disso, quando ocorre um derramamento por petróleo, a estrutura física e química do solo pode ser alterada. Por isso, torna-se difícil compreender quais as variáveis que podem estar afetando a fisiologia e a anatomia das plantas. Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se dizer que *C. xanthocarpa* foi afetada pela contaminação por petróleo. Esse fato é evidente quando se considera que houve a formação de camada conspícua envolvendo o ápice, alterações significativas na anatomia dos tecidos, atraso na maturação das células, necrose e morte da raiz, deformações e bifurcação do ápice radicial.

A camada conspícua de substância que envolve a raiz de *C. xanthocarpa*, observada no presente trabalho, assim como no trabalho de MAYER (2004), pode ter sido formada em resposta ao estresse causado pela contaminação, uma vez que esta afetou a estrutura do solo, agregando as partículas. De acordo com TAIZ & ZEIGER (2004) e TORREY & CLARKSON (1975), a coifa secreta um material gelatinoso, chamado mucigel, que freqüentemente envolve o ápice radicial. A função precisa do mucigel não é bem conhecida, mas tem sido sugerido que ele lubrifica a penetração da raiz através do solo, protege o ápice radicial da dessecação, promove a transferência de nutrientes à raiz e tem influência a interação entre raízes e microorganismos do solo.

A toxicidade do petróleo provavelmente é responsável pela necrose e pela morte das células do ápice radicial, observadas em *C. xanthocarpa*. Além disso, como ocorreram alterações na estrutura do solo, como compactação e aglomeração de partículas, a contaminação por petróleo pode ter interferido na absorção dos nutrientes pelas raízes. Segundo MERKL *et al.* (2005), durante a degradação dos hidrocarbonetos, o consumo de nutrientes aumenta e as plantas têm que competir com os microorganismos por esses. ALKIO *et al.* (2005) afirmam que a imobilização de nutrientes e a toxicidade dos metais causam distúrbio em alguns processos metabólicos da planta. Esses mesmos autores observaram que a contaminação tem

sido a causa da redução da expansão e do alongamento celular, redução no tamanho das folhas, na fotossíntese e translocação de fotoassimilados, em diversas plantas.

Como ocorreu a morte do ápice radicial das plântulas de *C. xanthocarpa* no solo contaminado com petróleo, estas tiveram que investir na formação de novos ápices. A bifurcação do ápice é, portanto, uma das respostas das plântulas ao efeito da contaminação. Além disso, ocorreu a formação de novas raízes secundárias próximas a superfície do solo. Esses resultados provavelmente indicam que as plântulas sofreram deficiência na absorção dos nutrientes ou até mesmo de água.

Alguns autores como BAKER (1970); LI *et al.* (1997) e PENÃ-CASTRO *et al.* (2006) afirmam que o petróleo pode alterar as propriedades do solo, tornando-o hidrofóbico, gerando um estresse hídrico e de oxigênio nas plantas. Segundo KRAMER & KOZLOWSKI (1960), a deficiência de oxigênio no solo provoca, com frequência, a paralisação do crescimento da raiz e, ao mesmo tempo, dano ou a morte dos sistemas radiciais. Esta situação pode ser determinada por inundação, por uma má drenagem, ou pela compactação do solo. Pode-se dizer que a interferência na estrutura do solo, em função da contaminação por petróleo, é um dos fatores que causaram estresse para as plântulas de *C. xanthocarpa*. AGBOGIDI *et al.* (2006) também relataram a susceptibilidade de *Dennettia tripetala* (Bak.) F. ao óleo cru. Esses autores sugerem que as alterações nas plantas em altura, tamanho e número de folhas, em solo contaminado com óleo podem ser atribuídos à alteração na estrutura do solo, criando uma condição de estresse, em consequência do déficit hídrico. GILL *et al.* (1992) constataram que a contaminação com óleo cru pode impedir a passagem de água e oxigênio, bloqueando as partículas do solo. O autor relatou deformidade nos estômatos, distorção nas células da epiderme e na região do córtex da raiz, do caule, do pecíolo, e no mesofilo da folha.

Quando ocorrem alterações na estrutura física do solo, como compactação e aglomeração das partículas, as plantas podem ter dificuldades na penetração da raiz. As deformações na raiz das plântulas de *C. xanthocarpa*, observadas no solo contaminado, podem ser uma consequência do estresse imposto pelo contaminante. GILL *et al.* (1992) constatou alterações significativas na raiz de *Chromolaena odorata* (L.) K. & R. cultivadas em solo contaminado com óleo, observando, inclusive deformações nas suas células.

Analisando a anatomia das plântulas de *C. xanthocarpa*, cultivadas em solo contaminado, foi possível notar que essas tiveram um atraso no seu desenvolvimento, quando comparado com as plântulas cultivadas nos demais tratamentos. Além disso, constatou-se que o xilema secundário no hipocótilo teve menor espessura e que as células da raízes são mais compactas no solo contaminado. Esses fatores sugerem que o contaminante causou um atraso no crescimento das plântulas. MERKL *et al.* (2005) também constatou menor crescimento da raiz das plantas de *Cyperus aggregatus* (Willd.) Endl. sob influência da contaminação por óleo.

A presença dos hidrocarbonetos do petróleo no solo é um fator negativo para o crescimento e desenvolvimento das plantas (LI *et al.*, 1997). PEÑA-CASTRO *et al.* (2006) estudaram a toxicidade do petróleo em plantas de *Cynodon dactylon* L. e, em todas as concentrações testadas foi observado clorose nas folhas, interrupção no crescimento, principalmente das raízes, e decréscimo no número de folhas. ALKIO *et al.* (2005) pesquisaram a influência dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. e observaram que estes causam sintomas de estresse, tais como: redução do crescimento; deformidade e redução dos tricomas; clorose; atraso na florescência; aparecimento de manchas brancas; atraso no desenvolvimento e lesões necróticas

Os menores valores de espessura total e espessura do córtex, constatados para a região do colo, assim como os observados para a espessura do cilindro vascular do hipocótilo, das plântulas crescendo em solo contaminado, indicam que o contaminante afetou o desenvolvimento dos tecidos. Segundo KRAMER & KOZLOWSKI (1960), um dos fatores que mais afetam o desenvolvimento das plantas está relacionado com a água. O déficit de água reduz mais o crescimento das células, do que a sua divisão ou diferenciação. A absorção permanente de água é essencial à contínua expansão da célula, uma vez que o crescimento das células cessa mesmo quando estas se encontram ligeiramente plasmolisadas. LARCHER (2000) também afirma que a primeira e mais sensível resposta ao déficit hídrico é a diminuição da turgescência celular e, associada a esse evento, a diminuição do processo de crescimento (particularmente o crescimento em extensão). Por outro lado, as diferenças observadas na anatomia das plântulas podem ter ocorrido em função da menor disponibilidade de nutrientes no solo contaminado. Como são

muito complexos os efeitos do contaminante e as plantas estão sujeitas às várias interações do meio, torna-se difícil à interpretação dos resultados.

Além dos aspectos físicos da influência do contaminante sobre as plântulas, discutidos anteriormente, não se deve descartar a hipótese da contaminação ter afetado quimicamente a fisiologia das plântulas.

A parede celular da região do ápice radicial de *C. xanthocarpa* crescendo em solo contaminado apresentou uma coloração mais escura. Isto sugere que ocorreu maior espessura da parede celular. BARDELI-DA-SILVA (2006) estudou a morfoanatomia de *Sebastiania comersoniana* (Baillon) Smith & Downs crescendo em diferentes períodos após a contaminação do solo por óleo diesel. Este autor constatou que, nas amostras dos tratamentos com contaminação, foi freqüente a ocorrência de manchas pardas na parede das células subepidérmicas e do córtex da raiz. Segundo BARDELI-DA-SILVA (2006) durante as fases iniciais do desenvolvimento da planta, a atividade metabólica é alta e as paredes celulares são mais delgadas. Isso pode permitir maior sensibilidade a injúrias, causando alterações nas estruturas internas dos órgãos, possibilitando a entrada de óleo no interior da planta. No entanto, esse fato requer análises mais específicas e de longo prazo. Segundo BURKEN (2003), em plantas sob estresse de contaminação, os compostos orgânicos podem ser conjugados e alocados para os locais que causam menos danos, como os vacúolos ou a parede celular, alterando as características dos mesmos.

Por outro lado, a camada escura presente na parede celular dos ápices radiciais das plântulas de *C. xanthocarpa* pode não estar necessariamente relacionada com a impregnação do óleo, mas sim com o grau de diferenciação celular, principalmente quando se considera que houve necrose dos ápices radiciais. Como o contaminante afetou a estrutura morfológica da raiz, inclusive levando-a a morte, provavelmente deve ter interferido em nível celular.

A menor quantidade de compostos fenólicos nos tecidos das plântulas do solo contaminado, quando comparado ao biorremediado e ao não contaminado, provavelmente ocorreu em função das plântulas daquele estarem em fase mais inicial de desenvolvimento.

5 CONCLUSÃO

O solo contaminado por petróleo teve influência negativa na estrutura das plântulas de *C. xanthocarpa*, causando, principalmente modificações na raiz, tais como: necrose, morte celular; e deformações na raiz. Além disso, como resposta a contaminação, ocorreram a bifurcação do ápice radicial e a formação de uma camada de mucilagem nesta região. De modo geral, pode-se dizer que o petróleo causou alterações principalmente na estrutura física do solo e conseqüentemente nas plântulas. No entanto, a interpretação desses efeitos é de difícil compreensão, quando se considera que as plantas são sujeitas a muitas alterações ambientais. Por outro lado, a biorremediação do solo diminuiu o efeito do contaminante, considerando que muitas das variáveis analisadas neste tratamento têm valores aproximados aos do solo não contaminado ou, em muitos casos, maiores do que este tratamento. Nota-se ainda que no solo biorremediado não foram observados os sintomas presentes nas plântulas do solo contaminado.

6 REFERÊNCIAS

ADAM, G.; DUNCAN, H. J. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. **Environmental Geochemistry and Health**, Glasgow, v. 21, p. 353-357, 1999.

ADAM, G.; DUNCAN, H. J. Influence of diesel fuel on seed germination. **Environmental Pollution**, Glasgow, v. 120, p. 363-370, 2002.

AGBOGIDI, O. M., ONOSODE, A.T., OKONTA, C. Susceptibility of *Dennettia tripetala* (Bak.) F. seeds to crude oil. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Asaba , vol. 4, n. 2, p. 350-352, 2006.

ALKIO, M.; TABUCHI, T. M.; WANG, X; COLÓN-CARMONA, A. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms, **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 56, n. 421, p. 2983-2994, nov. 2005.

AL-ZALZALEH, H.; SHABBIR, G. Effect of biorremediated soil on growth of different plant species. **Kuwait Journal of Science & Engineering**, Reading, v. 31, n. 1, p. 107-118, 2004.

BAKER, J. M. The effects of oils on plants, **Environmental Pollution**, London, v.1, p. 27-44, 1970.

BARDELI-DA-SILVA, M. Y. **Efeitos do solo contaminado com óleo diesel na germinação, crescimento e morfoanatomia de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. Sm. & Downs (Euphorbiaceae)**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006

BARGAGLI, R. The elemental composition of vegetation and the possible incidence of soil contamination of samples. **The Science of the Total Environment**, v. 176, p. 121-128, 1995.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames, The Iowa State Press, 1976, 326p.

BONA, C; SANTOS, O.G. **Adaptações morfo-fisiológicas de espécies vegetais crescendo em solo contaminado com petróleo**. Curitiba: FUNPAR-UFPR, 2003. Relatório técnico.

BURKEN, J. G. Uptake and metabolism of organic compounds: green-liver model. In: McCUTCHEON; S. C.; SCHNOOR, J. I. **Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants**. New York: Wiley, 2003. p. 59-84.

CHUPAKHINA, G. N. E.; MASLENNIKOV, P. V. Plant adaptation to oil stress. **Russian Journal of Ecology**, Moscou, v. 35, n. 5, p. 209-295, 2004.

CRAWLEY, M. J. **Plant Ecology**, 2nd ed., Blackwell, Oxford, 1997, 717p.

FREEDMAN, B. **Environmental Ecology: the ecological effects of pollution, disturbance, and other stress**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1993.

GILL, L. S.; NYAWUAME, H. G. K.; EHIKHAMETALOR, A. O. Effect of crude oil on the growth and anatomical features of *Chromolaena odorata* (L) K. e R. **Newsletter**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 1992.

GISBERT, C., CLEMENTE, R., NAVARRO-AVINÓ, J., BAIXAULI, C., GINÉR, A., SERRANO, R., WALKER, D., BERNAL, M. P. Tolerance and accumulation of heavy metals by Brassicaceae species grown in contaminated soils from Mediterranean regions of Spain. **Environment and Experimental Botany**, v. 56, p. 9-27, 2006.

HUTCHINSON, S. L.; BANKS, M. K.; SCHWAB, A. P. Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effects of inorganic fertilizer. **Journal Environmental Quality**, Madison, v. 30, n.2, p. 395-403, 2001.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book., 1940

KECHAVARZI, C.; PETTERSSON, K.; LEEDS-HARRISON, P.; RITCHIE, L.; LEDIN, S. Root establishment of perennial ryegrass (*L. perenne*) in diesel contaminated subsurface soil layers. **Environmental Pollution**, London, v.2, p. 1-7, 2006.

KRAMER J. P.; KOZLOWSKI T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1960.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. 531p.

LI, X.; FENG, Y.; SAWATSKY, N. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. **Plant soil**, Rotterdam v.192, n.2, p. 219-226, 1997.

MALALLAH, G.; AFZAL, M.; GULSHAN, S.; ABRAHAM, D.; KURIAN, M.; DHAMI, M. S. I. *Vicia faba* as a bioindicator of oil pollution. **Environmental Pollution**, London, v. 92, n. 2, p. 213-217, 1996.

MARANHO, L. T. **Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha e do lenho de *Podocarpus lambertii* Klotzsch EX ENDL. (PODOCARPACEAE)**. 201 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

MATTA, F. M. Mecanismos fisiológicos associados ao desenvolvimento do sistema radicular das plantas. In: FERNANDES, M. F., TAVARES, E. D., LEAL, M. de L. da S. **Workshop sobre sistema radicular: metodologias e estudo de casos**. Anais, Embrapa Tabuleiros Costeiros, 1999, 300p.

MAYER, J. L. S. **Impacto do solo contaminado com petróleo no crescimento e desenvolvimento de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae)**. 82 f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

MCDOWELL, E.M. & TRUMP, B. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 100, p. 405-414, 1976.

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R.; INFANTE, C. Phytoremediation in the tropics - The Effect of Crude Oil on the Growth of Tropical Plants. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v. 8, n. 1, p. 177- 184, 2004.

O` BRIEN, T. P.; FEDER, N. & MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**. v. 59, n. 2, p. 368-373, 1965.

PEÑA-CASTRO, J. M.; BARRERA-FIGUEROA, E. B.; FERNÁNDEZ-LINARES, L.; RUIZ-MEDRANO, R. Isolation and identification of up-regulated genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon* L.) grown under petroleum hydrocarbon stress. **Plant Science**, San Pedro Zacatenco, v. 170, p. 724-731, 2006.

PEZESHKI, S. R.; DeLAUNE, R. D. Effect of crude oil on gas exchange functions of *Juncus roemerianus* and *Spartina alterniflora*. **Water, Air, and Soil Pollution**, Ontario, v. 68, n. 3-4, p. 461-468, 1993.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 15-39, 2005.

RODRIGUES, T. T. **Os efeitos do solo contaminado com petróleo na estrutura anatômica e estado nutricional do lenho jovem de *Campomanesia xanthocarpa* Berg (Myrtaceae) e *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae)**. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**, 2nd ed., Ames: The Iowa State College Press, p. 98, 1951.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TORREY, J. G.; CLARKSON, D. T. **The Development and Function of Roots**. London, Academic Press, 1975.

VARTAPETIAN, B. B., JACKSON, M. B. Plant adaptations to anaerobic stress – A Review. **Annals of Botany**, v. 79, n.A, p. 3-20, 1997.

VASELLATI, V.; OESTERHELD, M.; MEDAN, D.; LORETI, J. Effects of flooding and drought on the anatomy of *Paspalum dilatatum*. **Annals of Botany**, v. 88, p. 355-360, 2001.

VOGEL, E.F. **Seedlings of dicotyledons: structure, development, types: descriptions of 150 woody Malesian taxa**. Centre for Publishing and Documentation, Wageningen, 1980.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os efeitos negativos do solo contaminado em *C. xanthocarpa*, já descritos anteriormente, como alterações na morfologia, na anatomia, biomassa e crescimento, pode-se dizer que esta é uma espécie sensível ao contaminante. Tal sensibilidade parece estar mais evidente na raiz, indicando que este é um órgão bastante relevante para estudos de contaminação e de biorremediação.

No presente trabalho, os efeitos negativos causados pela contaminação por petróleo parecem estar relacionados com a estrutura física do solo, como a compactação e a aglomeração de partículas. Entretanto, são muitos os fatores intrínsecos e extrínsecos que podem exercer influência sobre as plantas. Além disso, é importante lembrar que a fase de plântula é um período crítico de desenvolvimento.

A biorremediação do solo amenizou o efeito do contaminante favorecendo o desenvolvimento das plantas em fase inicial de crescimento.