

MICHELLE CARNEIRO DE ANDRADE DE FREITAS

**INFLUÊNCIA DE FATORES EXÓGENOS NA GERMINAÇÃO
DE ESPOROS E DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B (RUV B)
NO DESENVOLVIMENTO DE GAMETÓFITOS DE
ACROSTICHUM DANAEIFOLIUM LANGSD. & FISCH.
(POLYPODIOPSIDA, PTERIDACEAE): UMA PTERIDÓFITA
DO MANGUEZAL**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Biologia Vegetal da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como parte dos
requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Biologia
Vegetal.**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Áurea Maria Randi
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Rodrigues**

**FLORIANÓPOLIS
2012**

F866i Freitas, Michelle Carneiro de Andrade de
Influência de fatores exógenos na germinação de esporos e
da radiação ultravioleta B (RUV B) no desenvolvimento de
gametófitos de *Acrostichum Danaeifolium* Langsd. & Fisch
(Polypodiopsida, Pteridaceae) [dissertação]: uma pteridófito
do manguezal / Michelle Carneiro de Andrade de Freitas;
orientadora, Áurea Maria Randi. - Florianópolis, SC, 2011.
78 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Vegetal.

Inclui referências

1. Biologia vegetal. 2. Pteridófito. 3. Radiação
ultravioleta. 4. Germinação. 5. Ultraestrutura. 6. Pigmentos.
I. Randi, Áurea Maria. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. III.
Título.

CDU 57

MICHELLE CARNEIRO DE ANDRADE DE FREITAS

**INFLUÊNCIA DE FATORES EXÓGENOS NA GERMINAÇÃO
DE ESPOROS E DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B (RUV B)
NO DESENVOLVIMENTO DE GAMETÓFITOS DE
ACROSTICHUM DANAEIFOLIUM LANGSD. & FISCH.
(POLYPODIOPSIDA, PTERIDACEAE): UMA PTERIDÓFITA
DO MANGUEZAL**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Biologia Vegetal da Universidade
Federal de Santa Catarina, como
parte dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Biologia
Vegetal.

Aprovado pela Banca Examinadora em 16 de dezembro de 2011

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^o Dr. Paulo Günter Windisch – UFRGS

Prof.^a Dr.^a Zenilda Laurita Bouzon – UFSC/CCB/BEG

Prof.^a Dr.^a Marisa Santos – UFSC/CCB/PPGBV

Prof.^a Dr.^a Áurea Maria Randi – UFSC/CCB/PPGBV - Orientadora

*Dedico esse trabalho
a Deus e a virgem Maria, por serem meu sustento durante toda essa
caminhada.*

*Aos meus pais, Rita e Antônio, pelo esforço e dedicação.
Ao meu marido, Paulo, por sua compreensão e apoio imensuráveis e
aos meus filhos, Cristiano e José Antônio, que certamente foram a
minha maior “produção” nesse mestrado.*

*“Não são os elementos do cosmo, as leis da matéria que, no fim das contas, governam o mundo e o homem, mas é um Deus pessoal que governa as estrelas, ou seja, o universo; as leis da matéria e da evolução não são a última instância, mas razão, vontade, amor: uma pessoa. E se conhecemos esta pessoa e ela nos conhece, então verdadeiramente o poder inexorável dos elementos materiais deixa de ser a última instância; deixamos de ser escravos do universo e de suas leis, então somos livres. Tal consciência impeliu na antiguidade os ânimos a indagar. O céu não está vazio. A vida não é um simples produto das leis e da casualidade da matéria, mas em tudo, e contemporaneamente acima de tudo, há uma vontade pessoal, há um Espírito que em Jesus se revelou como **Amor**.”*
Papa Bento XVI (Encíclica Spe salvi, pg.15)

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor nosso Deus que merece todo amor do mundo, toda honra e glória pelos séculos sem fim. A ti, meu amado, dedico todo esse trabalho e consagro a Ti todas as pessoas que dele participaram.

A Maria, minha Mãe santíssima, agradeço os braços fortes que tanto me acalentaram nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora Dr^a. Áurea Maria Randi, por contribuir com meu aperfeiçoamento, por respeitar o meu tempo, pela experiência de vida que soube me transmitir, por saber a hora certa de interferir na minha produção e por ter acreditado em meu trabalho acadêmico.

A minha co-orientadora Dr^a. Ana Cláudia Rodrigues pela compreensão em minhas demoras e por toda a experiência de vida transmitida. Agradeço aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina (PPGBV/UFSC), em especial a Roberta, Sérgio e Rafaella, por toda infra-estrutura e suporte nos experimentos com microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A(os) professoras(es) e funcionários(as) do PPGBV/UFSC pelo prazer de tê-los conhecido, pelas conversas e pela oportunidade ímpar de convívio.

A todos os colegas que me acompanharam até a conclusão desse mestrado e que tanto me ajudaram com suas opiniões.

A Vera Lúcia Araújo de Mello Zapelini, secretária do PPGBV/UFSC, por nunca ter desistido de meu projeto, ter acolhido algumas de minhas lágrimas e ser um apoio indispensável para que esse trabalho se concluísse.

A Eliana de Medeiros Oliveira e Renata Avila Ozório do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, pela amizade, profissionalismo e responsabilidade.

Ao prof. Marcelo Maraschim pelo auxílio nas análises bioquímicas e, aos funcionários e alunos do Laboratório de Morfologia e Bioquímica Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da UFSC. A todos, meus sinceros agradecimentos pela disponibilização do laboratório, equipamentos e materiais fundamentais para esse trabalho.

Ao Dr. Paulo Antunes Horta do Laboratório de Ficologia (LAFIC) e seus colaboradores, pelo empréstimo das câmaras de germinação, da sala de cultivo, e pelo uso do fluorímetro de pulso

modulado (PAM) e de outros equipamentos fundamentais para o bom desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Moacir Aluisio Torres do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/Lages) pelo auxílio nas análises das curvas rápidas de luz (RLCs).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro sob forma de bolsa REUNI (Reestruturação e Expansão das Universidades Federais).

A todos irmãos e irmãs da Comunidade Católica Shalom pelo estímulo e orações durante todos esses anos.

Ao meus pais Rita e Antônio pela vida, pelo carinho, dedicação, educação esmerada e valores cristãos que me sustentam e guiam. Obrigada por muitas vezes abrirem mão de seus sonhos para que os meus se realizassem. Deus os abençoe sempre!

Aos meus irmãos Daniel e Gabriel, que me apoiam com suas orações. Obrigada pela torcida! Estaremos sempre unidos pela alma e pelo coração!

Ao meu esposo Paulo Roberto Pereira de Freitas por nunca me deixar desistir de meus sonhos, por ser meu apoio, amigo e abrigo. Sou eternamente grata a você por me escolher, para dividir comigo suas alegrias e tristezas. Te amo com amor eterno!

Aos meus filhos Cristiano de Andrade de Freitas e José Antônio de Andrade de Freitas por serem meus anjinhos e bênçãos divinas em minha vida. Vocês são fundamentais para mim e, por vocês, vou me esforçar para ser uma pessoa melhor.

Peço licença para incluir uma homenagem a uma pessoa muito especial que marcou minha vida de uma forma muito positiva e, que partiu tão prematuramente. À Profª Drª Lourdes Isabel Velho do Amaral agradeço pelos ensinamentos e longas conversas sobre as coisas simples e importantes da vida. Que Deus a guarde no Seu coração misericordioso. Amém.

SUMÁRIO

| | |
|---|----------|
| 1.INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 ASPECTOS ECOLÓGICOS | 1 |
| 1.2 ASPECTOS FISIOLÓGICOS | 6 |
| 2. OBJETIVOS..... | 8 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 8 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 8 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 9 |
| 3.1 ESPÉCIE ESTUDADA | 9 |
| 3.2 LOCAL DE COLETA | 9 |
| 3.3 ACONDICIONAMENTOS DE ESPOROS | 11 |
| 3.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA DE ESPOROS | 11 |
| 3.5 ESTERILIZAÇÃO E GERMINAÇÃO DE ESPOROS | 11 |
| 3.6 EFEITO DE pH, TEMPERATURAS, SALINIDADE E RUV B NA GERMINAÇÃO | 13 |
| 3.7 ANÁLISE MORFOANATÔMICA DO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE GAMETÓFITOS DE A. DANAEIFOLIUM SOB RUV B | 14 |
| 3.7.1 Análise sob microscopia confocal | 14 |
| 3.7.2 Análise sob microscopia eletrônica de transmissão (MET)..... | 14 |
| 3.8 CURVAS RÁPIDAS DE LUZ (RLC) ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A EM GAMETÓFITOS JOVENS..... | 15 |
| 3.9 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS, CAROTENÓIDES E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM GAMETÓFITOS | 16 |
| 3.9.1 Extração e quantificação de clorofilas:..... | 16 |
| 3.9.2 Extração e quantificação de carotenóides:..... | 17 |
| 3.9.3 Extração e quantificação de compostos fenólicos totais:..... | 17 |
| 3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 4. RESULTADOS..... | 20 |
| 4.1 ESTRUTURA DOS ESPOROS..... | 20 |
| 4.2 EFEITO DE DIFERENTES pHs, TEMPERATURAS E SALINIDADE NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS | 21 |
| 4.3. EFEITO DA RUV B NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE GAMETÓFITOS ANALISADOS SOB MICROSCOPIA CONFOCAL | 24 |
| 4.4 ULTRAESTRUTURA DE GAMETÓFITOS JOVENS CULTIVADOS SOB PAR E RUV B..... | 30 |
| 4.5 ANÁLISE DOS PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS E DA TAXA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS (ETR) PELA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A EM GAMETÓFITOS JOVENS | 35 |
| 4.6 ANÁLISE DE CLOROFILAS, CAROTENÓIDES E COMPOSTOS FENÓLICOS EM GAMETÓFITOS JOVENS CULTIVADOS SOB PAR E RUV B | 36 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 45 |
| 5.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA DE ESPOROS EM MEV | 45 |
| 5.2 EFEITO DE DIFERENTES pHs, TEMPERATURAS E SALINIDADE NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS | 45 |
| 5.3 EFEITO DA RUV B NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE GAMETÓFITOS ANALISADOS SOB MICROSCOPIA CONFOCAL | 48 |
| 5.4 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE GAMETÓFITOS JOVENS CULTIVADOS SOB PAR E RUV B..... | 50 |
| 5.5 ANÁLISE DOS PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS E DA TAXA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS (ETR) PELA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A EM GAMETÓFITOS JOVENS | 52 |
| 5.6 ANÁLISE DE CLOROFILAS, CAROTENÓIDES E COMPOSTOS FENÓLICOS EM GAMETÓFITOS JOVENS CULTIVADOS SOB PAR E RUV B | 54 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS...57 | |
| 7. BIBLIOGRAFIA.....58 | |
| 8. SITES CONSULTADOS.....71 | |

RESUMO

A distribuição da vegetação mundial vem se alterando ao longo do tempo, mas atualmente as alterações climáticas estão ocorrendo rapidamente devido ao aumento da emissão de gases que causam o “efeito estufa” e o aquecimento global. *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch. (Polypodiopsida, Pteridaceae) é uma pteridófita que cresce tipicamente em ambientes salobres ou salinos que cercam as costas, sendo também encontrada em alguns manguezais da Ilha de Santa Catarina. Considerados ecossistemas costeiros de transição entre os ambientes terrestre e marinho, os manguezais possuem riqueza e importância biológica como grandes “berçários” naturais. Esse ecossistema poderá ser severamente atingido pelas mudanças climáticas. Conhecer a fisiologia de sua vegetação e suas possíveis adaptações é de fundamental importância para sua preservação. Dessa forma o estudo da germinação de *A. danaeifolium* e de seu desenvolvimento gametofítico está implicado no conhecimento de suas características reprodutivas, visando à conservação e o manejo da espécie. O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos de variações no pH, temperatura, salinidade e da radiação UV B (RUV B) na porcentagem de germinação de esporos de *A. danaeifolium*, além de verificar alterações morfofisiológicas e bioquímicas em gametófitos jovens submetidos à RUV B. Frondes férteis da espécie foram coletadas na área de preservação permanente (APP) do manguezal do Itacorubi situado na região centro-oeste da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil. Esporos foram filtrados em papel entretela e armazenados a 7°C. O teste de germinação foi realizado em sala de cultivo a 25°C ($27\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na germinação de esporos nos diferentes pHs utilizados (4 a 9). Temperaturas amenas (15-20°C) inibiram e/ou retardaram a germinação, enquanto que na temperatura de 30°C encontrou-se a máxima germinação da espécie. Observou-se uma diminuição na porcentagem de germinação com o aumento da salinidade e um retardo na germinação de esporos, com 7 dias de cultivo, submetidos à RUV B. Pode-se observar também redução de crescimento em gametófitos submetidos à RUV B, bem como o surgimento de ramificações anômalas, em imagens capturadas por microscópio confocal de varredura a laser. Alterações ultraestruturais no sistema de membranas dos cloroplastos e maior presença de grãos de amido e plastoglobulos foram observadas em gametófitos submetidos à RUV B. Não foram observadas diferenças nas curvas rápidas de luz, obtidas pelo fluorímetro PAM, tanto nos gametófitos submetidos à RUV B, quanto no controle. Houve variação na concentração de clorofilas com a diminuição de clorofila *a* e aumento de clorofila *b* em gametófitos submetidos à RUV B. Não houve diferença estatisticamente significativa com relação aos carotenóides, mas observou-se aumento de compostos fenólicos em gametófitos cultivados sob RUV B.

Palavras-chave: *Acrostichum danaeifolium*; radiação UV B; germinação; microscopia confocal de varredura a laser (CLSM); ultraestrutura; curvas rápidas de luz (RLC); pigmentos.

ABSTRACT

The distribution of the global vegetation has been changing over time, but now climate change is occurring rapidly due to increased emission of gases causing the "greenhouse effect" and global warming. *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fish. (Polypodiopsida, Pteridaceae) is a fern that typically grows in brackish or saline surrounding the coast being also found in some mangroves of the island of Santa Catarina. Coastal ecosystems considered transitional between terrestrial and marine environments, mangroves have wealth and great biological importance as natural "nurseries". This ecosystem may be severely affected by climate change. Knowing the physiology of its vegetation and its possible adaptations has fundamental importance to its preservation. Thus the study of germination and development of *A. danaeifolium* gametophyte is implicated in the knowledge of their reproductive characteristics, aiming at the conservation and management of the species. The objective of this study was to evaluate the effects of variations on pH, temperature, salinity and UV B radiation in the germination of spores of *A. danaeifolium*, correlating them the likely changes caused by climate change, and to identify morphophysiological and biochemical changes in young gametophytes undergo UV B radiation. Fertile fronds of this species were collected in permanent preservation areas (APP) of mangrove Itacorubi located in the central-west of Santa Catarina Island, SC, Brazil. Spores were filtered lens paper and stored at 7 ° C. The germination test was conducted in culture room at 25°C (27 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). There were no statistically significant differences in germination of spores used in the different pHs (4-9). Mild temperatures (15-20 ° C) inhibited and / or delayed germination, while the temperature of 30°C was found maximum germination of the species. There was a decrease in germination with increasing salinity and a delay in spore germination, with 7 days of culture, under UV B radiation. One can also observe a reduction of growth in gametophytes subjected to UV B radiation as well as the emergence of anomalous branches in images captured by confocal laser scanning microscopy. Ultrastructural changes in the membrane system of chloroplasts and greater presence of starch grains and plastoglobules were observed in gametophytes subjected to UV B radiation. No differences were observed in the rapid light curves, obtained by the PAM fluorometer, both in gametophytes subjected to UV B radiation and in control. There were variations in chlorophyll concentration, with decreased of chlorophyll *a* and increase of chlorophyll *b*. There was no statistically significant difference with respect to carotenoids, but there was an increase of phenolic compounds in gametophytes grown under UV B radiation.

Keywords: *Acrostichum danaeifolium*, UV B radiation, germination, confocal laser scanning microscopy (CLSM), ultrastructure, rapid light curves (RLC), pigments.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS ECOLÓGICOS

As filicíneas ou samambaias, como são popularmente conhecidas, compreendem uma parte significativa da flora vascular do planeta. Novas espécies continuam a ser descritas apesar do declínio abundante e da extirpação de algumas espécies e de habitats, devido aos fatores naturais como: fogo, inundações, furacões e, principalmente, fatores antrópicos (Arcand & Ranker, 2008). As respostas vegetais para essas perturbações são diversas e espécie-específicas. Por exemplo, Walker & Sharpe (2010) citam que a produção de esporos em *Dryopteris intermedia* (Muhl. ex Willd.) A. Gray (Dryopteridaceae) diminuiu após uma tempestade de neve no nordeste dos Estados Unidos em 1998. Os autores também alertam que as perdas de habitat promovidas pela urbanização e pela agricultura estão entre as principais causas do declínio da pteridoflora tropical.

Na natureza, são fundamentais para o desenvolvimento e estabelecimento de outros grupos vegetais (Smith, 1972), além de contribuírem na manutenção da umidade no interior da floresta, favorecendo a microfauna e microflora do substrato, necessárias ao equilíbrio ecológico (Brade, 1940). Também ajudam no controle e na prevenção de erosões e na estabilização do solo (Fonte: <http://www.nybg.org/bsci/herb/ferns.html>, acessado em 13/08/2008).

Sendo plantas sensíveis às mínimas variações climáticas, constituem-se em ótimos indicadores do grau de preservação ambiental de uma área florestal (Xavier & Barros, 2003). Além de importante banco de dados das características de uma região (Barros & Silva, 1996), algumas espécies exibem forte mecanismo de dominância nas áreas onde crescem, formando associações em que poucas espécies coexistem (Peres *et al.*, 2004).

As pteridófitas possuem ampla distribuição mundial, pois desenvolveram adaptações marcantes a meios extremos, sendo encontradas de regiões tropicais a temperadas, do nível do mar a elevadas altitudes, de situações subdesérticas a regiões costeiras (Page, 1979; Rathinasabapathi, 2006). Muitas espécies são cosmopolitas, vivendo preferencialmente nas regiões tropicais do mundo, em locais

úmidos e sombreados das matas. Ross (1996) estima que 80% das espécies de pteridófitas ocorrem em áreas tropicais.

Atualmente são conhecidas cerca de 10500 a 11300 espécies, mas a diversidade estimada varia de 12000 a 15000 espécies (Ross, 1996). Para as Américas, estima-se a ocorrência de 3250 espécies, estando 3000 na região tropical, que concentra importantes áreas de diversidade de pteridófitas (Tryon & Tryon, 1982). Para o Brasil, Prado (2010) estima que ocorram 1176 espécies. Segundo Labiak & Prado (1998), principalmente nas regiões Sul e Sudeste, as pteridófitas ocorrem preferencialmente nas áreas de Floresta Atlântica, conhecida região de endemismo e especiação no Continente Sul – Americano (Tryon, 1972; Windisch, 1990). Contudo, algumas espécies são encontradas nas regiões semi-áridas de caatingas, bem como em restingas e manguezais (Tryon & Tryon, 1982; Barros et al., 1989; Ambrósio & Barros, 1997).

Os manguezais são quase exclusivamente tropicais. Isto sugere uma limitação deste ecossistema pelo microclima, em particular, pela temperatura (Hogarth, 1999). Embora os manguezais possam sobreviver às temperaturas do ar tão baixas quanto 5 °C, esse mesmo autor afirma que este ecossistema é intolerante às temperaturas extremamente baixas. As mudas da vegetação desse tipo de ecossistema são particularmente vulneráveis às baixas temperaturas.

A despeito dessa vulnerabilidade, os manguezais são ecossistemas dinâmicos, de grande importância ecológica e geomorfológica. Sendo um ecossistema costeiro, de transição entre os ambientes terrestre e marinho, está sujeito ao regime das marés. Ocorre em regiões costeiras abrigadas como estuários, baías e lagunas, e apresenta condições propícias para alimentação, proteção e reprodução de muitas espécies animais, sendo considerado importante transformador de nutrientes em matéria orgânica e gerador de bens e serviços (Schaeffer-Novelli, 1995) por oferecerem espaço vital para numerosas espécies de peixes, moluscos e caranguejos, apresentando alto rendimento pesqueiro e representando, assim, a base da sobrevivência de grande parte da população que vive na costa brasileira.

A distribuição desse ecossistema está diretamente relacionada com a temperatura da água do mar. Na América do Sul, os manguezais são limitados a 3° 40' S à costa do Oceano Pacífico, devido à corrente fria de Humboldt e até 33° S à costa do Oceano Atlântico. A latitude mais alta na qual são encontrados os manguezais está em Corner Inlet (Victoria, Austrália) onde algumas espécies de *Avicennia* foram encontradas aos 38° 45' S (Hogarth, 1999).

O litoral brasileiro possui a maior região de mangue contínua do mundo desde o Cabo Orange no Amapá até o município de Laguna em Santa Catarina, estimada em 1,38 milhões de hectares que se estendem ao longo de uma costa de aproximadamente 6800 km (Schaeffer-Novelli, 1995; GEO Brasil, 2002). Na Ilha de Santa Catarina, localizada próxima ao limite austral de distribuição dos manguezais brasileiros, encontram-se cinco desses ecossistemas, a saber: manguezal de Ratonés; manguezal do Saco Grande; manguezal do Rio Tavares; manguezal da Tapera e manguezal do Itacorubi (Froidefond & Soriano-Sierra, 1996).

O manguezal do Itacorubi, cuja gestão é compartilhada entre a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a Prefeitura Municipal de Florianópolis (PMF), possui em sua bacia de drenagem um grande número de pequenos afluentes, englobando diversos bairros densamente habitados e próximos ao centro do município de Florianópolis - SC (Fonte: <http://www.agrorede.org.br/ceca/ucs/app.html>, acessado em 13/08/2008). Segundo Froidefond & Soriano-Sierra (1996), a localização do manguezal do Itacorubi, contígua a centros urbanos, tem provocado uma desestruturação desse ecossistema, que vem sofrendo com o impacto de uma crescente antropização. Isso tem determinado a eliminação de importantes setores da fauna e flora do local, que é, conforme todo ecossistema de manguezal, definido como uma Área de Preservação Permanente (APP) pela Resolução nº 303 de 20 de março de 2002 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) que estabelece os parâmetros, definições e limites referentes às APPs.

Dados da FAO (2007) mostram que a vegetação do manguezal é composta por poucas espécies. Todas com adaptações estruturais e fisiológicas para sobreviver nesse ambiente de solo pouco compactado, pouco oxigenado e freqüentemente inundado pelas marés. Portanto, a caracterização estrutural dessa vegetação é uma ferramenta valiosa na identificação das respostas desse ecossistema aos processos de alteração do meio ambiente, auxiliando dessa forma, estudos que objetivam a conservação desse ecossistema. Park e colaboradores (1998) afirmam que, a conservação de recursos genéticos vegetais dos biomas tropicais e a proteção de espécies frente à iminente extinção são questões prioritárias para a biologia do desenvolvimento e da conservação.

Sobre a conservação de recursos genéticos vegetais, destaca-se uma questão que afeta de diferentes maneiras os seres vivos, o aumento da radiação ultravioleta (UV) devido à destruição da camada de ozônio (O₃). Apesar da flutuação natural da incidência da radiação UV na superfície da Terra devido às mudanças na posição do sol, altitude,

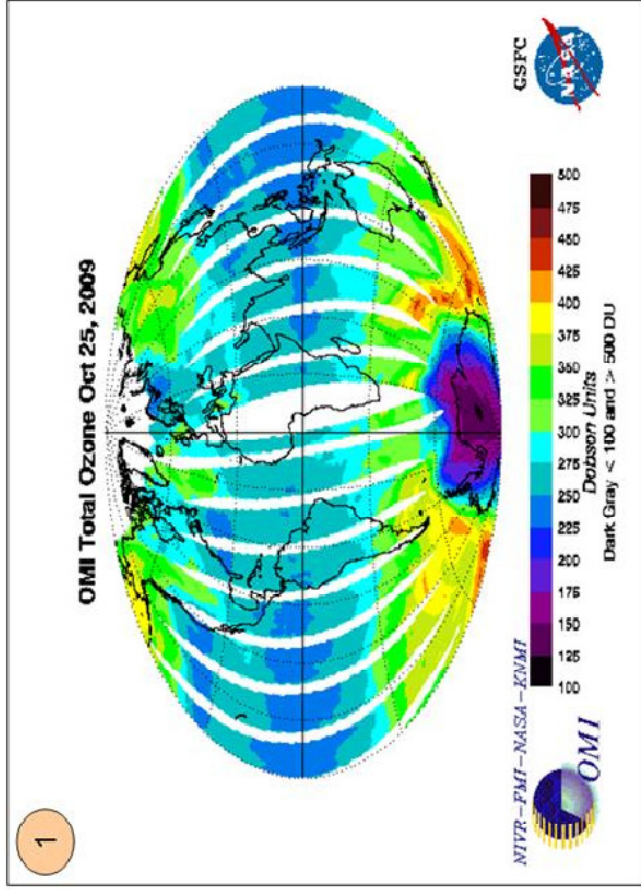
cobertura de nuvens e turbidez atmosférica (Hilal *et al.*, 2004), nos últimos anos, a quantidade de radiação ultravioleta que atinge a superfície terrestre tem aumentado consideravelmente, devido à redução na espessura da camada de ozônio tanto no hemisfério sul como no hemisfério norte (Figura 1).

Segundo o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE, http://www.inpe.br/antartica/noticia_pan.html, site consultado em 23/10/2009) o buraco na camada de ozônio em 2006 bateu novo recorde, alcançando 29,5 milhões de km² de extensão superando a marca registrada no ano 2000 de 29,4 milhões de km², ano considerado por muitos cientistas como o ápice do fenômeno. Isto mostra que a quantidade de gás CFC (Cloro Flúor Carboneto) presente na alta atmosfera ainda é muito grande e deve persistir por várias dezenas de anos, influenciando na composição da camada de ozônio e, possivelmente, provocando diversas alterações morfofisiológicas nos seres vivos, principalmente nos vegetais, como destacam diversos autores (Döhler *et al.*, 1989; Wilhelm *et al.*, 1997; Sullivan & Teramura, 1989; Tevini & Teramura, 1989; Whelan & Glaser, 1997; Kulandaivelu & Daniell, 1989; Nogués & Baker, 1995).

A camada de ozônio é a única proteção natural da Terra contra a radiação UV, que é historicamente dividida em três bandas (Falkowski & Raven, 1997) com base em seus efeitos biológicos: UV A (320-400nm), UV B (280-320nm) e UV C (200-280nm). Dessas, a radiação ultravioleta B (RUV B) é aquela que tem mais efeitos negativos, diretos e indiretos sobre as plantas, tanto nos seus processos fisiológicos e bioquímicos quanto na morfologia, incluindo danos ao DNA, proteínas e membranas, alterações na transpiração, nos pigmentos relacionados à fotossíntese e à proteção contra a RUV B, e mudanças na anatomia e no crescimento vegetal (Tevini & Teramura, 1989; Greenberg *et al.*, 1989; Rozema *et al.*, 1997; Hilal *et al.*, 2004; Ranjbarfordoei *et al.*, 2009). Entretanto, as pesquisas nessa área se concentram em angiospermas de interesse agrônômico, havendo poucos estudos sobre a influência da RUV B no desenvolvimento e na fisiologia de pteridófitas (Kato, 1964; Raghavan, 1989; Jayakumar *et al.*, 2002; Björn, 2007).

Figura 1. Radiação solar visível e ultravioleta obtida pelo Instrumento de Monitoramento de Ozônio (OMI) por meio de varredura de imagens hiperespectrais, oferecendo um mapa da quantidade de ozônio na atmosfera. Destaca-se a baixa concentração de ozônio na região Antártica (cores: preta, violeta e azulescuro).

Fonte: http://www.nasa.gov/vision/earth/environment/ozone_resource_page.htm, acessado em 23/10/2009.



1.2 ASPECTOS FISIOLÓGICOS

As pteridófitas são traqueófitas sem sementes, que tipicamente crescem nos solos ou nas árvores. Elas se caracterizam pela marcada alternância de fases no seu ciclo de vida, sendo a esporofítica a fase duradoura e a gametofítica, a efêmera. Ambas são plantas de vida-livre, sendo que a primeira representa a fase ou geração diplóide, que se reproduz por meio de esporos e a última, a fase ou geração haplóide, que se reproduz por meio de gametas (Raghavan, 1989).

Diversos autores (Miller, 1968; Pérez-García & Riba, 1982; Whittier & Moyroud, 1993; Fernández *et al.*, 1996, 1997; Ranal, 1999; Nondorf *et al.*, 2003) pesquisaram as exigências edáficas necessárias ao crescimento de pteridófitas. Por exemplo: Carlson (1979) conduziu um estudo comparativo do hábitat de dez espécies de *Dryopteris* (Adans.) T. Moore de acordo com o pH, reunindo-as em quatro grupos: espécies típicas de solos de pH ácido, espécies de solos de pH ácido a neutro, espécies de solos de pH neutro e espécies de solos de pH neutro a básico, havendo um maior número de espécies desse gênero que preferem solos com pH acidificado. Randi & Felipe (1988a-e) conduziram diversos trabalhos com *Cyathea delgadii* Sternb. avaliando efeitos como armazenamento, temperatura, luz e compostos de reserva na germinação dessa espécie ameaçada de extinção. E, por fim, Raghavan (1989) fez uma revisão dos fatores que afetam a fisiologia da germinação do esporo em várias espécies de pteridófitas destacando a importância da luz, água, temperatura e de hormônios vegetais nesse processo.

Dessa forma, no estudo de germinação de pteridófitas, bem como no desenvolvimento gametofítico e esporofítico das mesmas, os nutrientes minerais, a luz, a temperatura e o pH são fatores fortemente implicados no conhecimento de suas características reprodutivas tendo como objetivo sua conservação e manejo.

Acrostichum L. (“giant leather fern”) é reconhecido por suas folhas pinadas de 2-4 m de altura, com nervuras reticuladas e esporângios que recobrem toda a superfície abaxial das pinas (Moran, 1995). O gênero é o único que cresce tipicamente em ambientes salobres ou salinos que cercam as costas (Hietz, 2010).

Existem somente duas espécies desse gênero nos Neotrópicos: *Acrostichum aureum* L. e *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch.. Ambas são citadas para Santa Catarina (Reitz, 1961; Souza *et al.*, 1991;

Souza *et al.*, 1994). Essas espécies diferem entre si principalmente pela quantidade de pares de pinas por fronde, de 10-30 pares em *A. aureum* e de 30-60 pares em *A. danaeifolium*. Além disso, geralmente, *A. aureum* possui de 1-7 pares de pinas apicais férteis; enquanto que em *A. danaeifolium* todos os pares de pinas são férteis.

O estudo dos aspectos ecofisiológicos de *A. danaeifolium*, espécie distribuída pelos trópicos e subtropicais do Novo Mundo (Lloyd & Gregg, 1975) e membro característico das comunidades de manguezal (Tryon & Tryon, 1982; Moran, 1995), mostra-se de suma importância para o conhecimento e para a conservação da espécie e de seu hábitat.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos de diferentes tratamentos sobre a germinação dos esporos e o efeito de radiação ultravioleta B (RUV B) no desenvolvimento gametofítico e na taxa fotossintética de esporófitos jovens de *A. danaeifolium*.

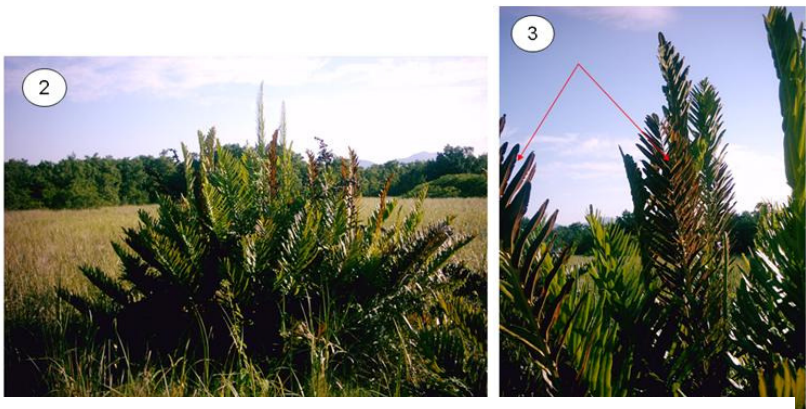
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Analisar a morfologia de esporos de *A. danaeifolium*;
- ▶ Determinar a porcentagem de germinação de esporos de *A. danaeifolium* em diferentes condições de cultivo com variações no pH, na temperatura e na salinidade;
- ▶ Determinar a porcentagem de germinação de esporos de *A. danaeifolium* submetidos à radiação ultravioleta B (RUV B);
- ▶ Analisar o desenvolvimento inicial dos gametófitos de *A. danaeifolium* submetidos a doses diárias de radiação UV B utilizando a microscopia confocal de fluorescência por varredura a laser (CLSM) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- ▶ Avaliar a eficiência fotossintética de esporófitos jovens de *A. danaeifolium* submetidos à radiação UV B utilizando o fluorímetro de pulso modulado - PAM;
- ▶ Determinar o perfil carotenóico e fenólico, além da dosagem de clorofilas presentes em gametófitos de *A. danaeifolium*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ESPÉCIE ESTUDADA

A espécie *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch (Figuras 2 e 3) é conhecida popularmente como samambaia do mangue (“giant leather fern”) pertence à Divisão Tracheophyta, Subdivisão Euphyllophytina, Infradivisão Moniliformopses (Kenrick & Crane, 1997), Classe Polypodiopsida, ordem Polypodiales, família Pteridaceae (Smith et al., 2006).



Figuras 2-3. *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch. Manguezal do Itacorubi.

2. Hábito geral.

3. Detalhe das pinas férteis (setas vermelhas).

3.2 LOCAL DE COLETA

Fronde férteis de *A. danaeifolium* foram coletadas na área de preservação permanente (APP) do manguezal do Itacorubi situado na região centro-oeste da Ilha de Santa Catarina. Criado pelo Decreto Municipal 1529/2002, o manguezal do Itacorubi possui uma área de 150 hectares, com coordenadas 27° 34' 14" – 27° 35' 31" Sul e 48° 30' 07" - 48° 31' 33" Oeste (Soriano-Sierra, 1993). Foram realizadas quatro coletas, em diversos pontos próximos a região da passarela sobre a Avenida da Saúde, em diferentes estações do ano (Figura 4).

Figura 4. Imagem do Manguezal do Itacorubi (área em vermelho). Fonte: Google Earth (Data da imagem 07/11/2009). Setas amarelas indicam locais de coleta



3.3 ACONDICIONAMENTOS DE ESPOROS

Depois de coletadas, as frondes férteis de *A. danaeifolium* foram colocadas sobre papel de filtro à temperatura ambiente para induzir deiscência e liberação de esporos. Esses foram separados dos esporângios pela filtragem em papel de entretela (ou papel de lente). Os esporos obtidos foram armazenados em frascos de vidro a $7 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA DE ESPOROS

Pequena porção de esporos armazenados sob refrigeração foi colocada sobre lâmina de vidro com uma gota de água e recoberta com lamínula. O material foi fotografado em microscópio óptico (Leica, DM 2500) com câmera fotográfica digital (Leica, DFC 295) acoplada.

Para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram preparadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Os esporos foram colocados sobre suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face e cobertas com 30nm de ouro, em metalizador (Leica, modelo EMSCD 500). A análise e documentação foram efetivadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM – 6390 LV), também pertencente ao LCME.

3.5 ESTERILIZAÇÃO E GERMINAÇÃO DE ESPOROS

Esporos de *A. danaeifolium* foram esterilizados superficialmente pela lavagem em solução de hipoclorito de sódio comercial a 5 % e uma gota de detergente líquido comercial, durante 15 minutos; em seguida, enxaguados em água destilada esterilizada em autoclave e filtrados a vácuo sobre papel de filtro (Randi & Crozier, 1991).

Para os diferentes testes de germinação, os esporos esterilizados foram inoculados em quatro frascos erlenmeyers ou em frascos béquer (somente para o experimento com RUV B) contendo 20 mL de solução nutritiva de Mohr (1956) modificada por Dyer (1979), acrescida de Benlate[®] a 0,1 % para evitar contaminação por fungos (Quadro 01).

Quadro 01. Composição química do meio de Dyer (1979).

| Compostos Químicos | Quantidade |
|---|------------|
| Sulfato de Magnésio..... | 510 mg/L |
| Nitrato de Potássio..... | 120 mg/L |
| Nitrato de Cálcio..... | 1440 mg/L |
| Fosfato de Potássio Dibásico..... | 250 mg/L |
| Solução de FeSO ₄ .7H ₂ O e NaEDTA..... | 1 ml/L |
| Água destilada até completar 1 (um) litro. | |
| Preparação: misturam-se todos os ingredientes. | |
| Solução de FeSO ₄ .7H ₂ O e NaEDTA: | |
| NaEDTA..... | 33,2 g/L |
| Hidróxido de Sódio..... | 3,65 g/L |
| Sulfato de Ferro | 25 g/L |
| Água destilada até completar 1 (um) litro | |
| Preparação: Misturam-se todos os ingredientes | |

A solução nutritiva foi previamente esterilizada em autoclave por 20 min a uma temperatura de 120 °C. Aproximadamente 10 mg de esporos foram inoculados em cada frasco com auxílio de espátula. Os erlenmeyers, e também os béqueres, foram tampados com filme de polipropileno de uso doméstico, fixos por elásticos e transferidos para sala de cultivo, com fotoperíodo de 12h de radiação fotossinteticamente ativa ($27\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), a uma temperatura de $25^\circ \pm 2^\circ \text{C}$. A radiação fotossinteticamente ativa (RFA ou PAR) foi provida por duas lâmpadas fluorescentes brancas (Philips, TLD 30W/75), com fotoperíodo de 12 h, dispostas horizontalmente 30 cm acima da amostra. A densidade de fluxo de fótons obtida pelo quantômetro LICOR (Li-cor light meter 250, United States of America, USA) munido de sensor PAR (400 a 700 nm) foi de aproximadamente $30 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

A germinação foi acompanhada em intervalos de sete dias, sendo que para cada dia de avaliação foram preparadas quatro lâminas (réplicas), com 100 esporos por lâmina, em microscópio binocular (Leica, DM 2500). Consideraram-se apenas as porcentagens de esporos germinados, que apresentaram protrusão de rizóide, e não se levou em consideração os esporos viáveis (totalmente preenchidos com substâncias de reserva

de coloração amarela, mas sem protusão de rizóide) e/ou inviáveis (sem substâncias de reserva).

3.6 EFEITO DE PH, TEMPERATURAS, SALINIDADE E RUV B NA GERMINAÇÃO

O efeito de pH foi analisado em câmara de germinação regulada para 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h de PAR. Os pHs do meio de Dyer foram ajustados com auxílio de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e de hidróxido de sódio (NaOH) para os seguintes valores: 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

Analisou-se também o efeito de diferentes temperaturas na germinação de esporos de *A. danaeifolium*. Foram realizados quatro tratamentos: 15, 20, 25 e 30 °C.

O efeito da salinidade foi avaliado por meio de duas metodologias diferentes:

a) Os esporos foram inoculados em meio de Dyer, autoclavado por 20 min a 120 °C, acrescido de NaCl nas concentrações de 0 %; 0,98 % (30% da salinidade da água do mar); 1,96 % (60% da salinidade da água do mar) e 3,26 % (100% da salinidade da água do mar) conforme Pangua *et al.* (2009).

b) Os esporos foram inoculados em água do mar, coletada na praia da Joaquina (Florianópolis, SC), a salinidade da água do mar foi medida com o auxílio de um salinômetro manual de precisão 0 a 100 ‰ (BIOBRIX, 211) pertencente ao Laboratório de Ficologia (LAFIC). A água do mar, com salinidade de 35 ‰, foi autoclavada por 20 min a 120 °C e diluída com água destilada autoclavada nas seguintes concentrações: 25 %, 50 % e 100 %.

Foram realizados dois controles: água destilada (0 %) e meio de Dyer. Os experimentos foram conduzidos em câmara de germinação a 25 °C e fotoperíodo de 12h de PAR.

Para o estudo do efeito de RUV B na germinação, esporos esterilizados, conforme descrito no item 3.5, foram inoculados em frascos béquer. Os frascos foram tampados com filme de polipropileno, fixos por elásticos e transferidos para sala de cultivo a 25 °C e 12h de luz PAR, sendo uma parte dos esporos, aproximadamente 10 mg de esporos por béquer, exposta à RUV B.

A RUV B foi suprida por duas lâmpadas (Philips, Ultraviolet-B, TL 20 W/12RS, K4, Holland) que emitem juntas aproximadamente 28 μ moles de fótons $m^{-2} \cdot s^{-1}$ (6,45 $W \cdot m^{-2}$) montadas horizontalmente e colocadas 30 cm acima das amostras.

Os esporos foram expostos à radiação UV B (RUV B), durante 30 min por dia, no período correspondente ao de maior irradiação no dia (considerando um dia de outono), ou seja, de 12 h as 12 h e 30 min (Jayakumar *et al.*, 2002). A irradiância na superfície da amostra foi de aproximadamente $16 \mu\text{moles de fótons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ que correspondem a $3,80 \text{ W.m}^{-2}$ obtidos com radiômetro (IL 1400A - International Light, Newburyport, MA, USA). Os esporos foram mantidos nessas condições por 14 dias, e a porcentagem de germinação foi medida no dia 7 e no dia 14.

3.7 ANÁLISE MORFOANATÔMICA DO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE GAMETÓFITOS DE *A. danaeifolium* SOB RUV B

3.7.1 Análise sob microscopia confocal

Os esporos inoculados em frascos béquer foram submetidos a doses diárias de 30 min de RUV B por um mês. Nesse período o desenvolvimento inicial dos gametófitos, oriundos dos esporos tratados e do controle, foi acompanhado em microscópio confocal de varredura a laser (Leica, DMI 6000 B) pertencente ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME). As lâminas foram montadas no próprio LCME e preparadas conforme o seguinte cronograma de análise: 1º, 4º, 5º, 6º, 7º, 11º, 15º, 19º, 25º e 32º dias. A excitação foi feita pelo uso de três tipos de lasers: azul com emissão entre λ 413 a 452 nm; verde com emissão entre λ 505 a 562 nm e vermelho com emissão entre λ 628 a 708 nm (λ = comprimento de onda).

3.7.2 Análise sob microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O desenvolvimento inicial dos gametófitos submetidos ou não à RUV B foi analisado também em nível ultraestrutural. Gametófitos com 34 dias de exposição à RUV B e os controles foram fixados em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7 por 9 h, sob refrigeração. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min (2.000 rpm) e o pellet formado incluído em ágar (2 %, 60 °C). Após a fixação e inclusão em ágar, o material foi lavado por 3 vezes (30 min cada lavagem) no mesmo tampão e pós- fixado em tetróxido de ósmio (OsO_4) 1 % em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7 durante 5 h, em

temperatura ambiente. Após serem lavados novamente no mesmo tampão, os gametófitos foram desidratados em uma série de concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100 %), por 30 minutos em cada concentração, sendo a solução de acetona 100 % trocada duas vezes. Em seguida, o material foi infiltrado lentamente em séries graduais de acetona 100 % - resina Spurr (Spurr, 1969) em uma seqüência de sete etapas de 12 h cada, com acetona 100 % + resina: 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, e duas vezes em resina pura. Por fim, o material foi polimerizado em moldes horizontais em estufa a 70 °C, por 24 h no Laboratório de Anatomia Vegetal do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da UFSC. As secções ultrafinas (60 nm) foram feitas com ultramicrotomo (RMC, Power Tome XL) acoplado à navalha de diamante e as grades com as secções foram contrastadas em acetato de uranila 1 % e citrato de chumbo 1 % de acordo com Reynolds (1963). As amostras foram processadas e observadas no LCME, em seguida, fotografadas no microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1011). Destaca-se que os gametófitos utilizados na análise foram coletados na superfície do meio de cultura líquido (meio Dyer) e, portanto, não estavam sob sombreamento.

3.8 CURVAS RÁPIDAS DE LUZ (RLC) ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* EM GAMETÓFITOS JOVENS

Esporos esterilizados foram inoculados em frascos béquer e mantidos sob PAR de 30 $\mu\text{moles de fótons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e, submetidos a doses diárias (30 min) de RUV B de 16 $\mu\text{moles de fótons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Após 30 dias em meio de cultivo líquido, os gametófitos filamentosos obtidos a partir desses esporos iniciais, foram transferidos para bandejas de polipropileno transparente com tampa, contendo substrato de manguê previamente esterilizado em autoclave (por 60 min a uma temperatura de 120 °C). As bandejas com os gametófitos permaneceram em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 h de PAR (30 $\mu\text{moles de fótons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a 25 ± 2 °C por três meses. Os gametófitos sob tratamento permaneceram sob as mesmas condições, no entanto, com doses diárias (30min) de RUV B (16 $\mu\text{moles de fótons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). O desempenho fotossintético de gametófitos jovens foi medido com o auxílio de um fluorímetro de pulso com amplitude modulada (Diving PAM, underwater fluorometer; Walz, Effeltrich, Germany). Para ambos os tratamentos, os gametófitos jovens foram previamente adaptados por 30

minutos no escuro. Usando a opção “Rapid Light Curve” (RLC), as curvas de luz foram obtidas com a aplicação de uma série de oito pulsos de luz saturante (LS), cada um deles seguidos de uma exposição de luz actínica (LA) crescente ($2 - 2000 \mu\text{moles de f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

As RLC permitem a obten\u00e7\u00e3o de v\u00e1rios par\u00e2metros importantes para avalia\u00e7\u00e3o do aparato fotossint\u00e9tico. (1) O rendimento qu\u00e2ntico efetivo do fotossistema II (Φ_{PSII}), dado pela rela\u00e7\u00e3o $\Delta F/F_m$, em que: $\Delta F = F_m - F_t$; onde F_m \u00e9 a fluoresc\u00eancia m\u00e1xima de uma amostra iluminada por LA e F_t \u00e9 a fluoresc\u00eancia transit\u00f3ria (Schreiber *et al.*, 1994); (2) taxa de transporte de el\u00e9trons (ETR) entre o fotossistema II (PSII) e o fotossistema I (PSI). A ETR pode ser estimada a partir da equa\u00e7\u00e3o: $\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} \times \text{PAR} \times 0,5 \times 0,84$. Onde 0,5 \u00e9 referente ao fato dos f\u00f3tons incidentes serem distribu\u00eddos entre o PSII e o PSI (White & Critchley 1999; Jones *et al.*, 1999) e 0,84 \u00e9 um fator baseado na m\u00e9dia de luz que \u00e9 realmente absorvida pelas plantas terr\u00edcolas (Schreiber *et al.*, 1994).

3.9 EXTRA\u00c7\u00c3O E QUANTIFICA\u00c7\u00c3O DE CLOROFILAS, CAROTEN\u00d3IDES E COMPOSTOS FEN\u00d3LICOS TOTAIS EM GAMET\u00d3FITOS

3.9.1 Extra\u00e7\u00e3o e quantifica\u00e7\u00e3o de clorofilas:

Esporos esterilizados e inoculados conforme descrito no item 3.8, permaneceram por 35 dias em meio de cultivo l\u00edquido. Os gamet\u00f3fitos filamentosos obtidos a partir desses esporos iniciais foram secos a v\u00e1cuo e armazenados em nitrog\u00eanio l\u00edquido (N_2 liq). Essas amostras foram pesadas e, de sua massa total (aproximadamente 1,5 g), separaram-se: 300 mg para dosagem de clorofila, 300 mg para a extra\u00e7\u00e3o e quantifica\u00e7\u00e3o de caroten\u00f3ides e 300 mg para an\u00e1lise de compostos fen\u00f3licos totais.

A extra\u00e7\u00e3o de clorofila foi feita utilizando-se, para 100 mg de gamet\u00f3fitos, 2 mL de dimetil-sulf\u00f3xido (DMSO) seguido de macera\u00e7\u00e3o em N_2 liq. O material foi incubado em estufa a 65°C por 30 min e, em seguida, centrifugado. O volume foi completado para 1 mL e o material resultante, submetido espectrofotometria UV – Vis (Hitachi U – 1800). A quantifica\u00e7\u00e3o de clorofilas *a* e *b* ($\mu\text{g/mL}$) foi obtida segundo metodologia proposta por Wellburn (1994) onde:

Cl *a* (concentra\u00e7\u00e3o de clorofila *a*) = (12,19 x A665) – (3,45 x A649) e
Cl *b* (concentra\u00e7\u00e3o de clorofila *b*) = (21,99 x A649) – (5,32 x A665),

em que A665 é a absorvância no comprimento de onda (λ) 665 e A649 é a absorvância no $\lambda = 649$.

3.9.2 Extração e quantificação de carotenóides:

As amostras de gametófitos submetidos à RUV B e a PAR foram misturadas, delicadamente, a 4,0 mL de solução hexano:acetona (1:1), contendo 1,0 mg de BHT (butil-hidroxi-tolueno). Em seguida, as amostras foram incubadas (30 min em câmara escura), centrifugadas (3000 rpm por 5 min) e o solvente evaporado sob fluxo de N₂ gasoso. O extrato recuperado foi ressuspense em 3,0 mL de hexano e, submetido à espectrofotometria UV – Vis (Hitachi U – 1800) para determinação do teor de carotenóides totais ($\lambda = 450$ nm). A quantificação dos carotenóides totais utilizou curva padrão externa de β -caroteno (Sigma, 0,5 a 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ $r^2 = 0,99$; $Y = 0,167X$). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em μg de carotenóides por g de tecido fresco.

Para a detecção de carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), alíquotas de 10,0 μL de cada amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC – 10A), equipado com pré-coluna (Vydac 218GK54,5 μm) e coluna de fase reversa C18 (Vydac 201TP54, 25 cm x 4,6 mm) e detector espectrofotométrico UV – Vis operando em 450 nm. A eluição utilizou metanol: acetonitrila (90:10, v/v) como fase móvel, fluxo de 1mL/min. A identificação dos compostos de interesse foi realizada através de comparação com os tempos de retenção dos compostos padrões (luteína, zeaxantina, cis e trans - β – caroteno, Sigma), sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos carotenóides foi feita utilizando-se curva padrão externa de luteína (2,5 a 50,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ $r^2 = 0,99$; $Y = 7044X$) e β – caroteno (0,01 a 5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ $r^2 = 0,99$, $Y = 1019X$) e considerou a área dos picos de interesse para efeito dos cálculos de concentração, sendo que os valores apresentados correspondem à média de três injeções por amostra.

3.9.3 Extração e quantificação de compostos fenólicos totais:

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais utilizou metodologia descrita por Rhandir *et al.* (2002). Às amostras de

gametófitos submetidos à RUV B foram adicionados 5,0 mL de metanol acidificado (HCl 1 %), em seguida, incubado em banho de gelo por 30 min. O extrato metanólico obtido foi filtrado a vácuo, 1 mL de extrato foi coletado e adicionado de 5 mL de metanol 95 % (v/v). Essa solução foi agitada em vórtex por 30 segundos aproximadamente e, em seguida, transferiu-se 1 mL da mesma para outro tubo de ensaio em que se adicionou 1 mL de etanol 95 %, 5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Essa solução obtida foi agitada em vórtex e deixada em repouso por 5 min. Logo depois, adicionou-se 1 mL de carbonato de cálcio 5 % (Na_2CO_3) a solução, a qual foi deixada em repouso por 1 h. Em seguida procedeu-se a leitura a absorvância ($\lambda=725\text{nm}$) das amostras em espectrofotômetro UV – Vis (Hitachi U – 1800) e para determinação do perfil espectral de varredura a leitura da absorvância foi realizada entre 600 a 1000 nm. A quantificação dos compostos fenólicos totais utilizou curva padrão de ácido gálico (50 a 800 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ $r^2 = 0,99$; $Y = 0,0001X$). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em μg de compostos fenólicos por g de tecido fresco.

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados de germinação foram expressos como porcentagem e para cada dia de avaliação foram calculados: média, variância e desvio padrão. Os resultados foram analisados pelos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (D_{max}) e de Bartlett (X^2) (quando se compararam mais de dois tratamentos), para verificação da homogeneidade das variâncias. Sempre que se constatou que os dados não seguiam a distribuição normal ou não mostravam variâncias homogêneas, estes foram transformados em valor angular ($\arcseno \times \sqrt{\%}$) e novamente submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade das variâncias. A análise de variância (Multifactor ANOVA) foi seguida do teste de comparação de médias quando se compararam mais de dois tratamentos (Tukey 5%) quando os dados apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas. O teste “t” foi utilizado para se comparar dois tratamentos entre si. No caso de os dados não apresentarem normalidade ou homogeneidade de variâncias mesmo após a transformação angular, a análise de variância foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (H) seguido de teste de Dunn (Santana & Ranal, 2004; Zar, 1996). Os resultados foram analisados pelos softwares Excel e BioEstat.

Para comparar RLCs quantitativamente, usando estatística paramétrica, alguns parâmetros descritivos foram utilizados: Eficiência fotossintética (α), Taxa fotossintética máxima (ETRmax) e fotoinibição ou fotoproteção (β). Esses parâmetros foram calculados pela equação de Platt (Platt *et al.* 1980) usando software Origin v. 5.0.

4. RESULTADOS

4.1 ESTRUTURA DOS ESPOROS

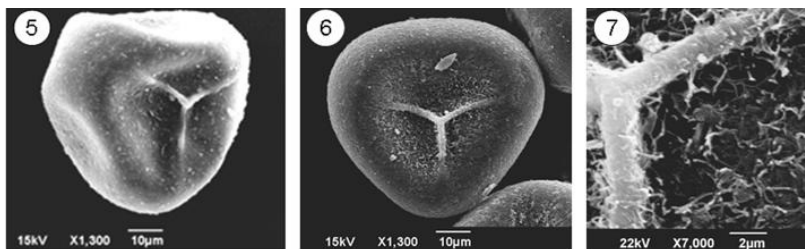
Os esporos de *A. danaeifolium* são tetraédrico-globosos, triletes, com aproximadamente 60 μm de diâmetro, apresentando parede externa ornamentada com depósitos de ceras epicuticulares (Figuras 5 - 7).

Figuras 5-7. Esporos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch sob Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

5. Vista geral do esporo (Barra: 10 μm)

6. Região central do esporo em detalhe (Barra: 10 μm)

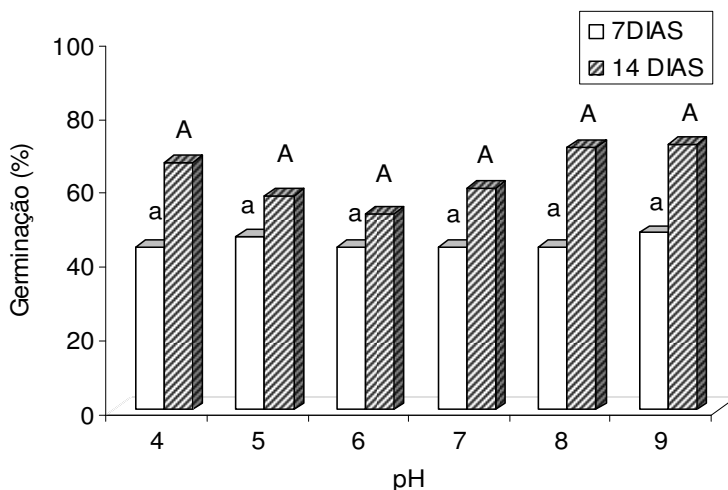
7. Detalhe da superfície do esporo mostrando ornamentações epicuticulares (Barra: 2 μm).



4.2 EFEITO DE DIFERENTES PHs, TEMPERATURAS E SALINIDADE NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS

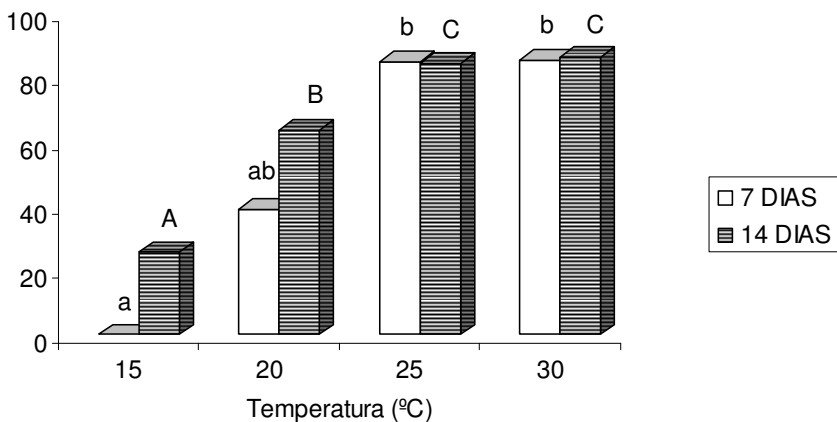
De acordo com a análise do efeito de diferentes pHs na germinação de *A. danaeifolium*, pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos tanto aos 7, quanto aos 14 dias de cultivo (Figura 8).

Figura 8. Germinação de esporos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch em diferentes pHs após 7 e 14 dias de cultivo. Letras minúsculas comparam o efeito de pHs aos 7 dias de cultivo e letras maiúsculas, aos 14 dias de cultivo. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.



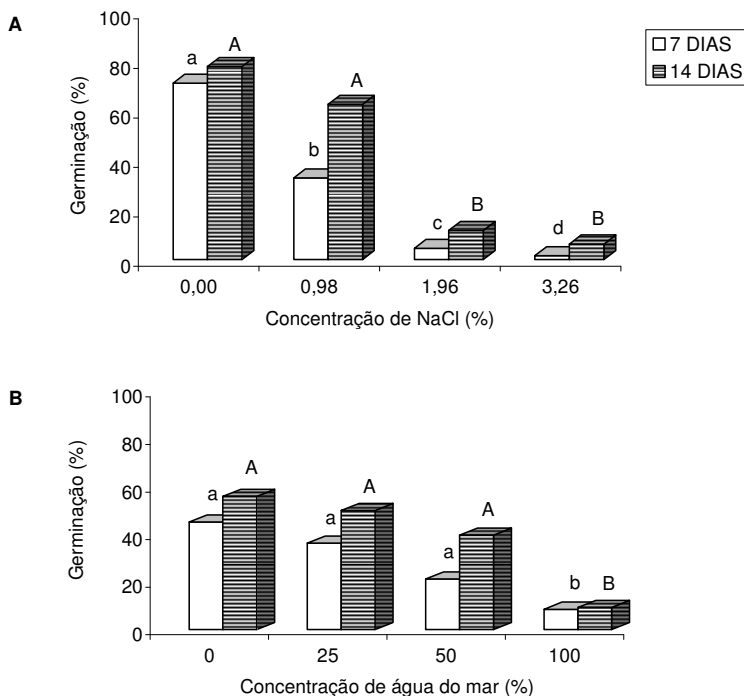
Os resultados referentes ao efeito de diferentes temperaturas na germinação de *A. danaeifolium* (Figura 9) mostram que tanto aos 7, quanto aos 14 dias de cultivo ocorreu a máxima germinação a 25 e 30 °C e que, nas temperaturas de 15 e 20 °C ocorreu, respectivamente, uma inibição e um retardo na germinação.

Figura 9. Germinação de esporos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch em diferentes temperaturas após 7 e 14 dias de cultivo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey. Letras minúsculas comparam o efeito de temperaturas aos 7 dias de cultivo e letras maiúsculas aos 14 dias de cultivo.



Com relação ao efeito da salinidade na germinação de *A. daneifolium* pode-se observar que, tanto no tratamento com NaCl (Figura 10 A) quanto no tratamento com água do mar (Figura 10 B) houve uma diminuição na taxa de germinação aos 7 e aos 14 dias de cultivo com o aumento de salinidade. Destaca-se que aos 14 dias de cultivo em meio Dyer acrescido de NaCl, não observou-se diferença estatisticamente significativa entre o controle e o tratamento 0,98%, e, entre os tratamentos 1,96% e 3,26% de salinidade.

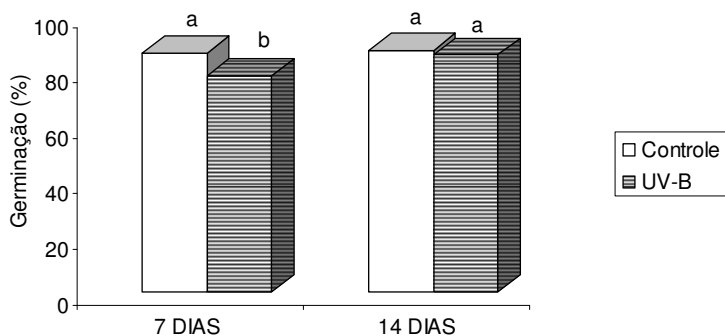
Figura 10 (A-B). Germinação de esporos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch em diferentes salinidades. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey. Letras minúsculas correspondem às análises estatísticas após 7 dias de cultivo e letras maiúsculas, após 14 dias de cultivo.



4.3. EFEITO DA RUV B NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE GAMETÓFITOS ANALISADOS SOB MICROSCOPIA CONFOCAL

Houve um retardo na germinação de esporos de *A. danaeifolium* submetidos à RUV B, após 7 dias de cultivo, porém essa diferença desapareceu após 14 dias de cultivo (Figura 11).

Figura 11. Germinação de esporos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch sob luz PAR (controle) e RUV B. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey

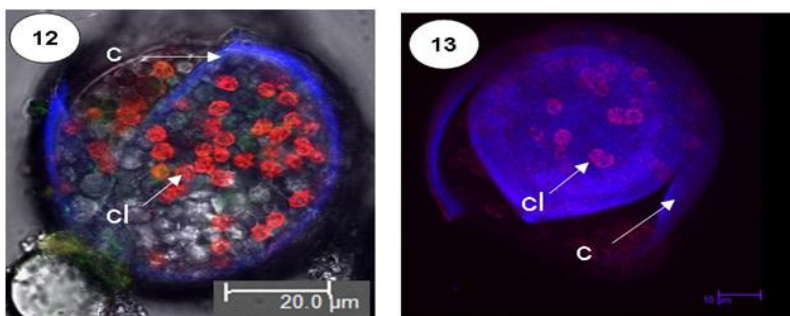


Por meio do uso de microscopia confocal de fluorescência por varredura a laser (CSLM), após quatro dias de cultivo de esporos sob luz PAR, constatou-se autofluorescência azul no perisporo do esporo, bem como autofluorescência vermelha e verde nos cloroplastos; o rizóide não mostrou autofluorescência (Figura 12). Nos esporos submetidos à RUV B, as fotomicrografias, evidenciam autofluorescência de cor azul no perisporo do esporo e de cor vermelha nos cloroplastos (Figura 13).

Figuras 12-13. Esporos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch em início de germinação, com quatro dias de cultivo, apresentando autofluorescência azul no perisporo (c) e autofluorescência vermelha nos cloroplastos (cl).

12. Controle sob luz PAR. Barra: 20 μm ;

13. Esporo sob RUV B. Barra: 10 μm .



Após 11 dias de cultivo, não houve diferença na morfologia e nos padrões de autofluorescência entre os gametófitos que foram cultivados em sala de cultivo sob luz PAR (Figura 14 a-c) e gametófitos irradiados com RUV B (Figura 15 a-c). Os gametófitos são filamentosos com 6 a 8 células e apresentam de um a dois rizóides. A autofluorescência azul concentra-se no perisporo dos esporos (c) e as células protaliais mostram abundância de cloroplastos (cl) que apresentam autofluorescência verde (Figuras 14b e 15b) e vermelha (Figuras 14c e 15c).

Figura 14a-c. Gametófitos filamentosos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch aos 11 dias de cultivo sob luz PAR. Destacam-se a autofluorescência azul do perisporo (14a) e, nos cloroplastos, autofluorescência verde (14b) e vermelha (14c). c = perisporo; cl = cloroplastos em células protaliais; r = rizóide. Barra: 50 μ m.

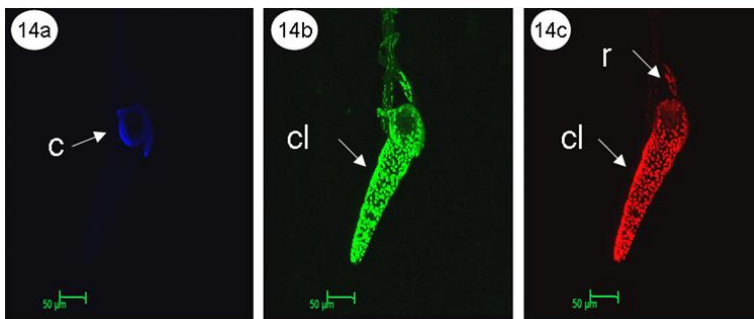
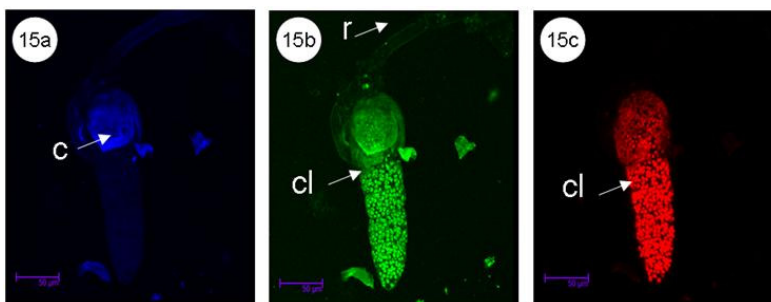


Figura 15a-c. Gametófitos filamentosos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch com 11 dias de cultivo sob RUV B. Destacam-se a autofluorescência azul do perisporo (15a) e, nos cloroplastos, autofluorescência verde (15b) e vermelha (15c). c = perisporo; cl = cloroplastos em células protaliais; r = rizóide. Barra: 50 μ m.



Após 15 dias de cultivo sob luz PAR, o gametófito apresenta de 25 a 30 células e possui uma forma espatulada (Figura 16 a-c). A autofluorescência azul aparece no perisporo do esporo (c) e nos rizóides (r) e a autofluorescência verde e vermelha, nos cloroplastos (cl) e um pouco menos nos rizóides. Já os gametófitos submetidos à RUV B (Figura 17 a-c) são menores, possuindo de 18 a 23 células e apresentam-se em início de fase espatulada, já mostrando divisões longitudinais. Entretanto, mantiveram o mesmo padrão de autofluorescência dos gametófitos controle, e não houve diferença no padrão de autofluorescência em relação aos gametófitos com 11 dias de cultivo.

Figura 16a-c. Gametófitos espatulados de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch com 15 dias de cultivo sob luz PAR. Destacam-se: autofluorescência azul no perisporo do esporo ainda presente e também nos rizóides (16a) e autofluorescência verde (16b) e vermelha (16c) nos cloroplastos. c = perisporo; cl = cloroplastos em células protaliais; r = rizóide. Barra = 20 μ m.

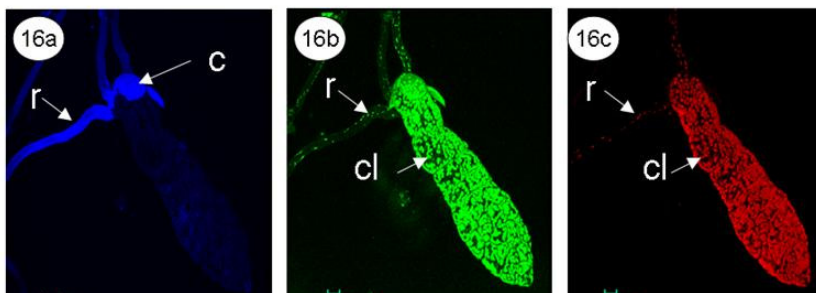
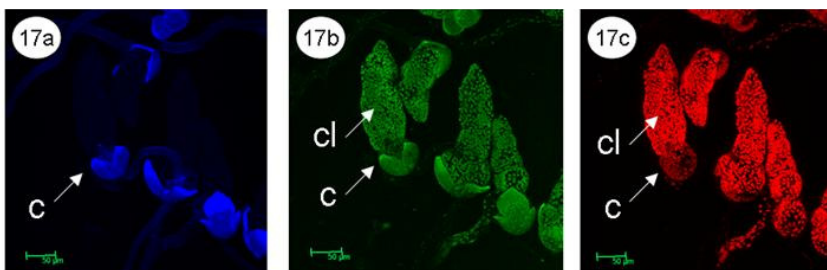


Figura 17a-c. Gametófitos espatulados de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch com 15 dias de cultivo sob RUV B. Destacam-se: a autofluorescência azul no perisporo do esporo (17a), e nos cloroplastos, as autofluorescências verde (17b) e vermelha (17c).

c = perisporo; cl = cloroplastos em células protaliais. Barra = 50 μ m.



Após 25 dias de cultivo observam-se pequenas alterações na forma do gametófito com maior expansão lateral e um pequeno aumento no comprimento nos gametófitos cultivados sob PAR (Figura 18 a-c) e RUV B (Figura 19 a-c) em relação aos protalos com 15 dias de cultivo em ambos os tratamentos. Não foi observada nenhuma alteração no padrão de autofluorescência.

Figura 18a-c. Gametófitos espatulados de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch com 25 dias de cultivo sob PAR. Destacam-se: a autofluorescência azul no perisporo do esporo e também nos rizóides (18a), e nos cloroplastos, as autofluorescências verde (18b) e vermelha (18c). c = perisporo; cl = cloroplastos em células protaliais; r = rizóide. Barra = 50 μ m.

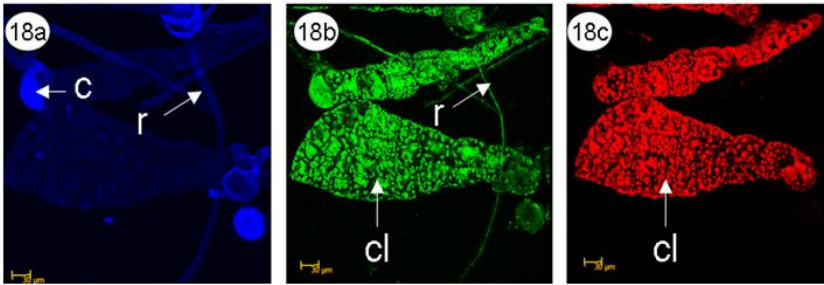
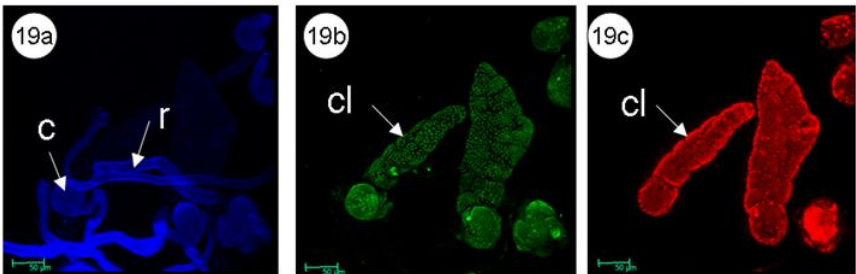


Figura 19a-c. Gametófitos espatulados de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch com 25 dias de cultivo sob RUV B. Destacam-se: a autofluorescência azul no perisporo do esporo e também nos rizóides (19a), e nos cloroplastos, as autofluorescências verde (19b) e vermelha (19c). c = perisporo; cl = cloroplastos em células protaliais; r = rizóide. Barra = 50 μ m.



Após 32 dias de cultivo observaram-se diferenças morfológicas entre os protalos que cresceram sob PAR (Figura 20 a-c) e os tratados com RUV B (Figura 21 a-c). Esses últimos mostraram retardo no desenvolvimento e a presença de ramificações não observadas nos primeiros. Observaram-se também diferenças no padrão de autofluorescência entre os protalos com 32 dias de cultivo e os protalos com 25 dias de cultivo crescidos sob PAR. A autofluorescência azul do perisporo não estava presente nos protalos com 32 dias, embora ainda se pudesse observar a autofluorescência vermelha e verde (menos intensa) nos cloroplastos.

Figura 20a-c. Gametófitos espatulados de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch com 32 dias de cultivo sob luz PAR. Observa-se autofluorescência vermelha nos cloroplastos das células protaliais.

cp = célula protalial; r = rizóide.

Barra = 50 μ m (20a). Barra = 100 μ m (20b e 20c).

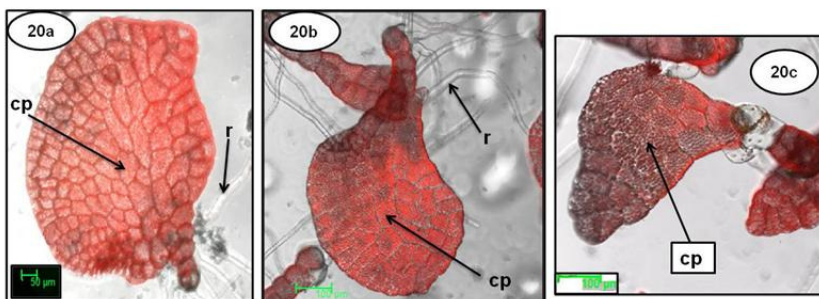
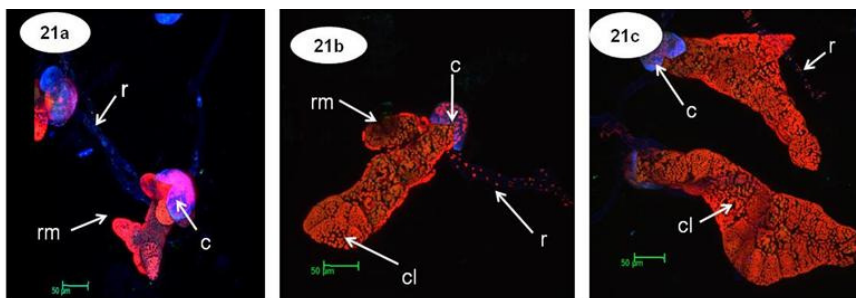


Figura 21a-c. Gametófitos espatulados de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch com 32 dias de cultivo sob RUV B. Destaca-se a fluorescência azul no perisporo do esporo e também nos rizóides (21a), e nos cloroplastos, a fluorescência vermelha (21b e 21c). c = perisporo; cl = cloroplastos em células protaliais; r = rizóide; rm = ramificação.

Barra = 50 μ m.



4.4 ULTRAESTRUTURA DE GAMETÓFITOS JOVENS CULTIVADOS SOB PAR E RUV B

As células protonemais de gametófitos de *A. danaeifolium* cultivados sob PAR apresentam um grande vacúolo central, cloroplastos alongados e parede celular espessa (Figura 22a, 22b); os cloroplastos apresentam sistema de membranas formado por tilacóides alongados, que mais se assemelham aos tilacóides de estroma (Figura 22c, 22d).

Destaca-se que o núcleo celular é grande e que os cloroplastos apresentam grãos de amido (Figura 23a). Podem-se observar também, pequenos vacúolos globosos, entre o vacúolo central e o citoplasma, e vacúolos periféricos circundando os cloroplastos (Figura 23a, 23b). Mitocôndrias ovaladas e, provavelmente, peroxissomos sem a presença de estruturas cristalinas, apresentaram-se conspícuos, ocorrendo entre os cloroplastos ou, entre vacúolo e cloroplastos (Figura 23b, 23c). Observou-se a presença de plastoglóbulos nos cloroplastos (Figura 22a, 23d).

As células protonemais de gametófitos que receberam RUV B apresentaram um grande vacúolo central e vacúolos periféricos que podem ser pequenos e globulares, ou de maiores dimensões (Figura 24a). Os cloroplastos são mais ovóides com grandes grãos de amido (Figura 24a) e um sistema de membranas internas formado por conjuntos de pilhas de tilacóides (grana) mais curtos e aparentemente em maior proporção (Figura 24b, 24c). Além disso, a presença de grandes grãos de amido no estroma torna os cloroplastos intumescidos (Figura 24d). Observou-se uma mitocôndria em forma de sino, entre dois cloroplastos e plastoglóbulos aparentemente menores no estroma (Figura 24b).

O núcleo dessas células é grande (Figura 25a) e apresenta, provavelmente, compostos fenólicos em seu interior (Figura 25b). Algumas mitocôndrias esféricas (Figura 25b) e, prováveis peroxissomos (sem a presença de estruturas cristalinas) também foram observados (Figura 25c, 25d).

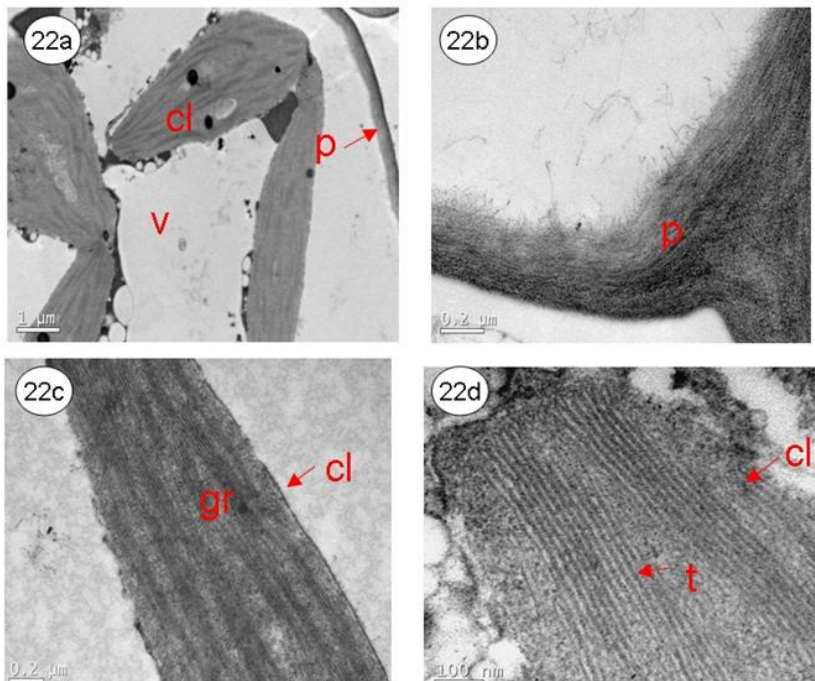


Figura 22. Gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch cultivados sob PAR durante 34 dias, analisados sob MET.

22a. Parte de uma célula (Barra = 1 µm).

22b. Detalhe da parede celular (Barra = 0,2 µm).

22c. Parte de um cloroplasto (Barra = 0,2 µm).

22d. Detalhes do sistema de membranas internas do cloroplasto (Barra = 100 nm).

cl = cloroplasto, gr = granum, p = parede celular, t = tilacóide, v = vacúolo.

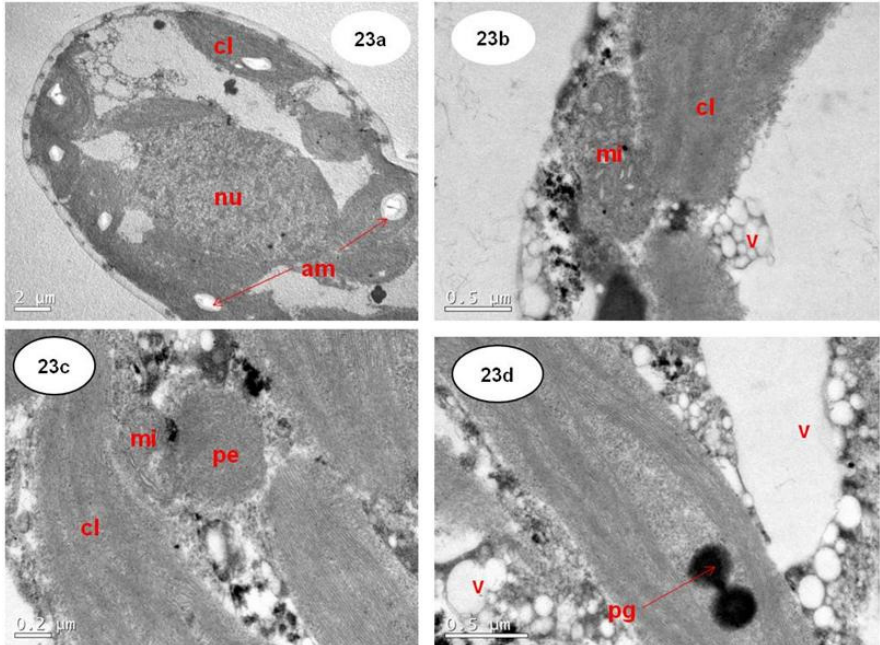


Figura 23. Células protaliais do gametófito de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch cultivados sob PAR após 34 dias, analisados sob MET.

23a. Vista de uma célula (Barra 2 μm)

23b. Detalhes de organelas celulares (Barra = 0,5 μm).

23c. Detalhes de organelas celulares (Barra 0,2 μm).

23d. Detalhe de um cloroplasto com plastoglóbulo (Barra = 0,5 μm).

am = grão de amido, cl = cloroplasto, mi = mitocôndria, nu = núcleo, pe = peroxissomo, pg = plastoglóbulo, v = vacúolo.

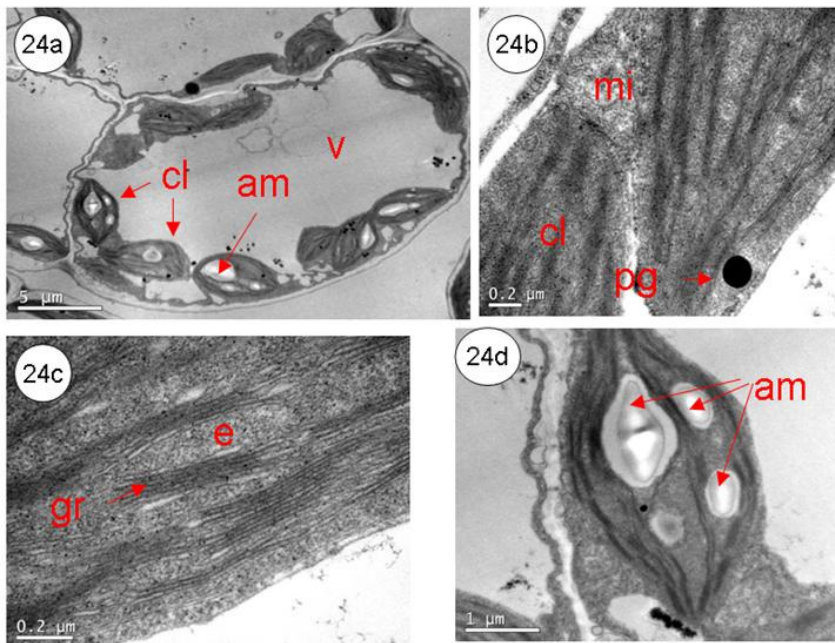


Figura 24. Célula protalial do gametófito de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch cultivado sob RUV B após 34 dias, analisados sob MET.

24a. Vista de uma célula protalial (Barra = 5 μm).

24b. Detalhes de organelas celulares (Barra = 0,2 μm).

24c. Detalhe do sistema de membranas internas de um cloroplasto (Barra 0,2 μm).

24d. Vista de um cloroplasto com grãos de amido (Barra = 1 μm).

am = grãos de amido, cl = cloroplasto, e = estroma do cloroplasto; gr = granum, mi = mitocôndria, pg = plastoglobulo, v = vacúolo.

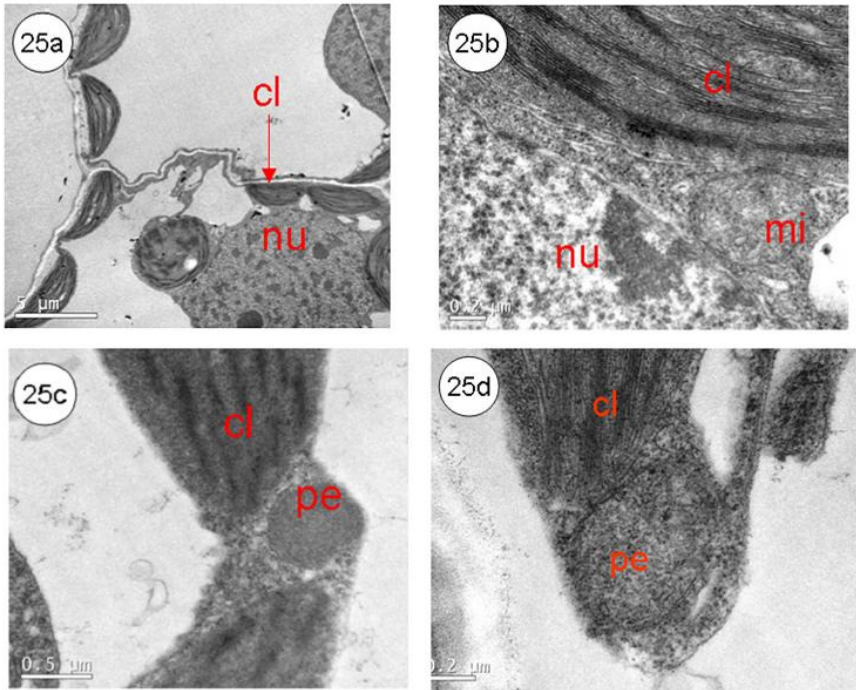


Figura 25. Célula protalial do gametófito de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch cultivados sob RUV B após 34 dias, analisados sob MET.

25a. Detalhes de células (Barra = 5 µm).

25b. Detalhes de organelas celulares (Barra = 0,2 µm)

25c. Detalhe de organelas celulares (Barra 0,5 µm)

25d. Detalhe de organelas celulares (Barra 0,5 µm)

cl = cloroplasto, mi = mitocôndria, nu = núcleo, pe = peroxissomo.

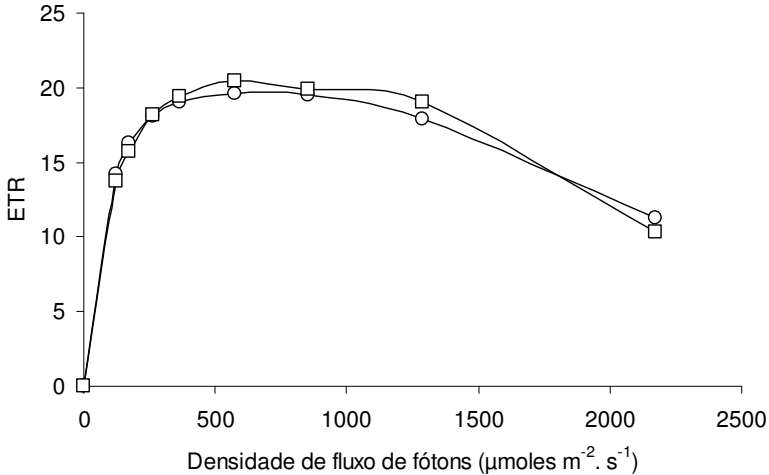
4.5 ANÁLISE DOS PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS E DA TAXA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS (ETR) PELA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* EM GAMETÓFITOS JOVENS

A análise da supressão da fluorescência da clorofila *a* realizada com fluorímetro de pulso modulado PAM, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros fotossintéticos analisados: α (eficiência fotossintética), β (fotoproteção), ETR_{max} (taxa máxima de transporte de elétrons) e E_k (irradiância mínima saturante) em gametófitos cultivados sob PAR ou RUV B (Tabela 1). Esse resultado também pode ser observado na curvas de transporte de elétrons (Figura 26).

Tabela 1. Análise dos parâmetros fotossintéticos em gametófitos de *A. danaeifolium* Langsd. & Fisch cultivados sob PAR e RUV B.

| | PAR | RUV B |
|-------------|--------------------|--------------------|
| | Média \pm SD | Média \pm SD |
| α | 0,16 \pm 0,01 a | 0,14 \pm 0,01 a |
| β | 0,09 \pm 0,003 a | 0,09 \pm 0,005 a |
| ETR_{max} | 24,0 \pm 2,0 a | 25,0 \pm 1,0 a |
| E_k | 250,0 \pm 13,0 a | 238,0 \pm 21,0 a |

Figura 26. Curvas de transporte de elétrons (ETR) em gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch cultivados sob PAR (círculos) e sob RUV B (quadrados).



4.6 ANÁLISE DE CLOROFILAS, CAROTENÓIDES E COMPOSTOS FENÓLICOS EM GAMETÓFITOS JOVENS CULTIVADOS SOB PAR E RUV B

A figura 27 mostra a sobreposição dos espectros de absorvância de extratos de clorofilas cultivados sob PAR e RUV B. Observa-se que entre 650 - 700 nm houve um aumento de absorvância para o extrato de gametófitos cultivados sob PAR. O nível de clorofila *a* foi de fato maior em gametófitos cultivados sob PAR e menor nos cultivados sob RUV B (Figura 28A). Por outro lado, houve um aumento nos níveis de clorofila *b*, nos gametófitos cultivados sob RUV B em relação aos cultivados sob PAR (Figura 28B). Quando foram comparados os níveis de clorofila *a* e *b*, nos dois tratamentos (Figura 29), observou-se que os níveis de clorofila *a* foram maiores que os de clorofila *b*, nos gametófitos cultivados sob PAR. Já, a razão clorofila *a/b* foi praticamente o dobro em gametófitos cultivados sob PAR (Figura 30).

Figura 27. Espectro de absorção de clorofilas totais de gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch cultivados sob PAR (RFA) e RUV B.

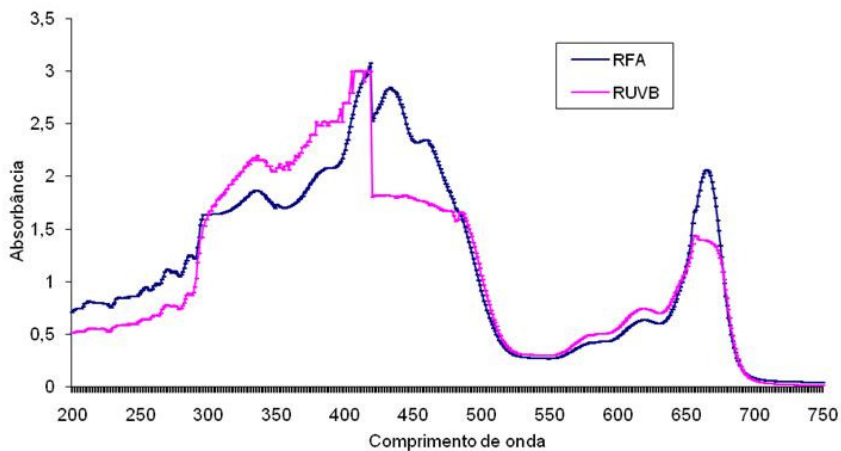


Figura 28. Concentração de clorofilas *a* (28A) e *b* (28B) em gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch cultivados sob PAR (RFA) e RUV B. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos pelo teste “t” a 5 % de probabilidade.

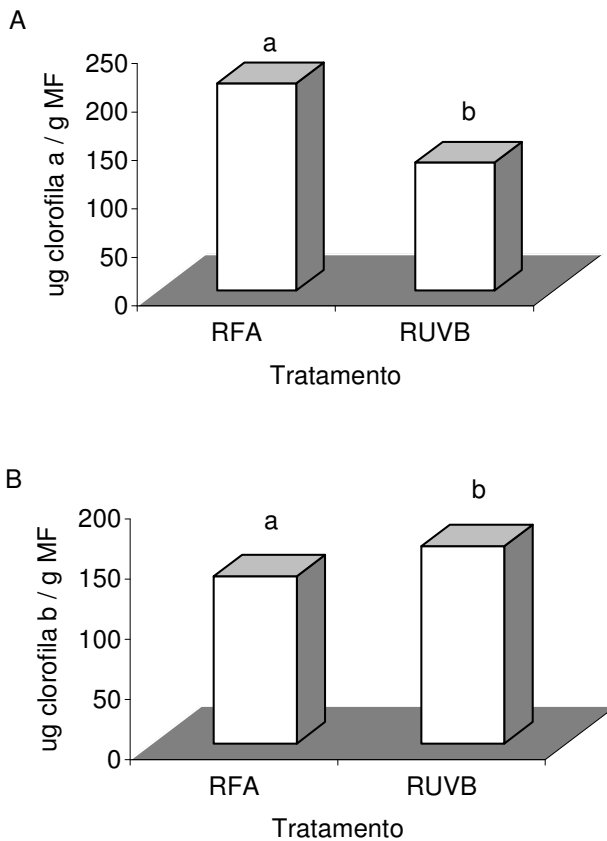


Figura 29. Concentração de clorofilas *a* e *b* em gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch cultivados sob PAR (RFA) e sob RUV B. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos pelos testes de Kruskal-Wallis (PAR = RFA) e “t” a 5 % de probabilidade (RUV B).

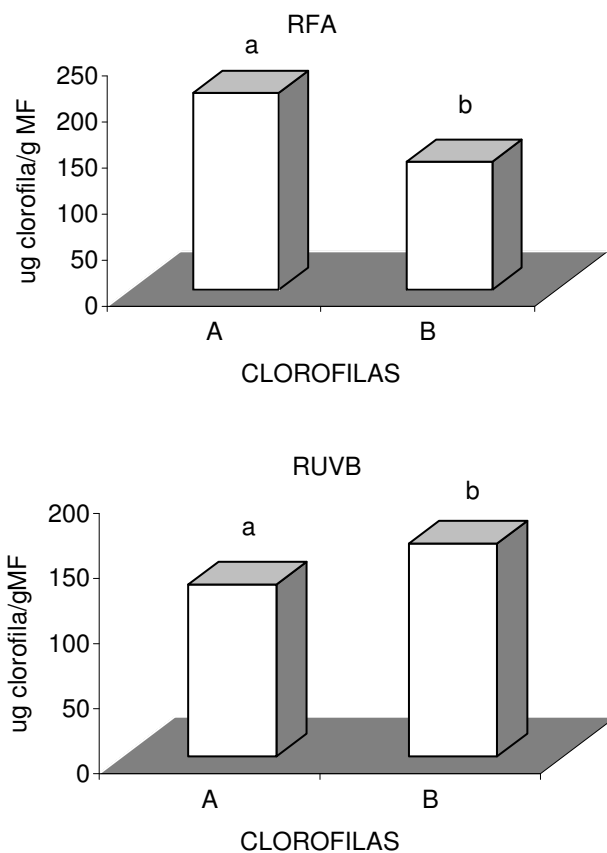
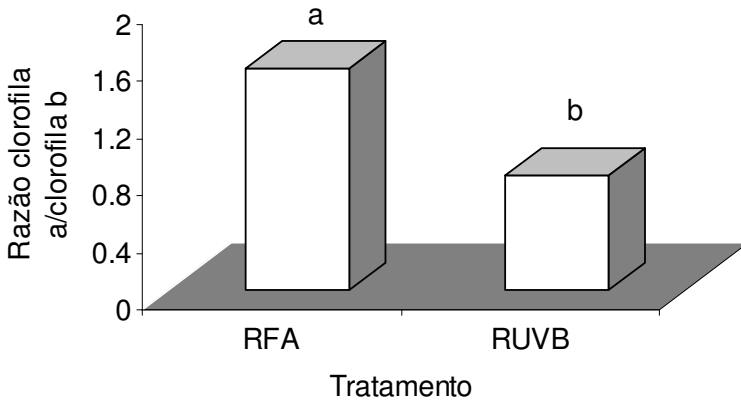


Figura 30. Razão clorofila *a/b* em gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch cultivados sob PAR (RFA) e sob RUV B. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos pelo teste “t” a 5 % de probabilidade.



Com relação à análise de carotenóides (Figura 31), não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois tratamentos. O carotenóide mais abundante nos dois tratamentos foi a zeaxantina, seguida de luteína e trans- β -caroteno e, o carotenóide menos abundante dentre os quatro analisados foi o α -caroteno (Tabela 2).

Houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações (Tabela 3) de compostos fenólicos totais entre os tratamentos, sendo maiores em gametófitos cultivados sob RUV B (Figuras 32 e 33).

Figura 31. Espectro de absorção de carotenóides de extratos de gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch cultivados sob PAR (RFA) e RUV B.

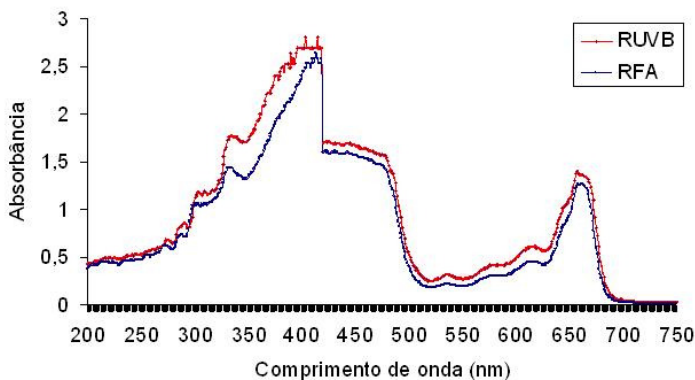


Figura 32. Espectro de absorção de compostos fenólicos totais de extratos de gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch cultivados sob PAR (RFA) e RUV B.

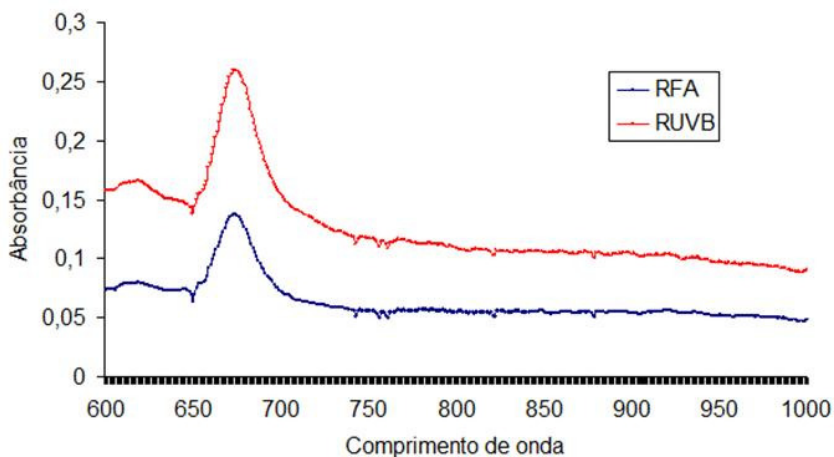


Figura 33. Compostos fenólicos totais em extratos de gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch crescidos sob PAR (RFA) e RUV B. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Kruskal –Wallis, seguido do teste de Dunn a 5% de probabilidade.

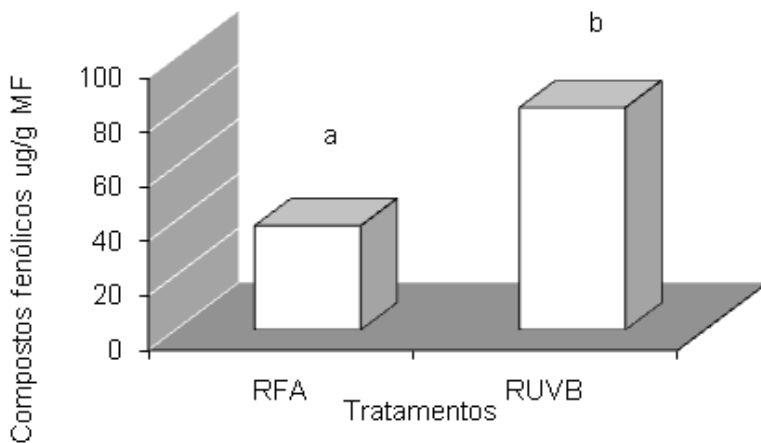


Tabela 2. Concentração de carotenóides ($\mu\text{g g MF}^{-1}$) determinada por CLAE (HPLC) para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT) de gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch cultivados sob PAR e PAR+RUV B. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções (10 μL) \pm desvio padrão. Letras minúsculas indicam diferenças ao nível de 5% de probabilidade pelo teste “t”.

| Carotenóide | Tempo de retenção (min) | PAR | | PAR+RUV B | |
|--------------------------|-------------------------|----------|--------------------------------------|-----------|--------------------------------------|
| | | Área | Concentração $\mu\text{g g MF}^{-1}$ | Área | Concentração $\mu\text{g g MF}^{-1}$ |
| Luteína | 3,9 | 151464,0 | 220,50 a \pm 3,32 | 138133,5 | 196,90 b \pm 1,92 |
| Zeaxantina | 4,4 | 265396,5 | 382,50 a \pm 0,93 | 271826,0 | 378,20 b \pm 1,27 |
| α -caroteno | 9,6 | 5780,0 | 8,30 a \pm 0,71 | 5885,0 | 8,40 a \pm 0,38 |
| Trans- β -caroteno | 10,4 | 13360,0 | 15,40 a \pm 6,69 | 16720,0 | 23,30 b \pm 0,25 |

Tabela 3. Concentração de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g MF}^{-1}$) determinada por espectrofotometria de UV – Vis de gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch cultivados sob PAR e PAR+RUV B. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão (triplicata). Letras minúsculas indicam diferenças ao nível de 5% de probabilidade pelo teste “t”.

| | PAR | PAR+RUV B |
|--|----------------------|-----------------------|
| Concentração de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g MF}^{-1}$) | 567,00 a \pm 57,74 | 1200,0 b \pm 360,56 |

5. DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA DE ESPOROS EM MEV

A análise estrutural dos esporos de *A. danaeifolium* contribuiu para a caracterização dessa espécie típica dos manguezais das regiões tropicais e subtropicais (Tryon & Tryon, 1982; Moran, 1995), que ocorre também no litoral de Santa Catarina (Reitz, 1961; Souza *et al.*, 1991; Souza *et al.*, 1994). Os resultados referentes à morfologia externa dos esporos de *A. danaeifolium*, obtidos nessa análise, confirmam ainda as observações apresentadas por Lloyd & Gregg (1975) e Lorschetter *et al.* (2001) que os caracterizam como tetraédricos de perispofo tuberculado com ornamentações densamente distribuídas. Os esporos não clorofilados de pteridófitas são estruturas relativamente resistentes às condições extremas e permanecem viáveis por longos períodos (Raghavan, 1989). Destacam-se ainda como uma maneira de dispersão das pteridófitas (Contreras-Duarte *et al.*, 2006) e possuem características úteis na identificação de espécies, como a aparência e as incrustações presentes no perispofo.

5.2 EFEITO DE DIFERENTES PHS, TEMPERATURAS E SALINIDADE NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS

Segundo Lloyd & Klekowski Jr. (1970), a base da reprodução de qualquer pteridófitas está na capacidade de germinação de seus esporos e na competitividade dos gametófitos resultantes. Além da competição por espaço e nutrientes, existem fatores intrínsecos como mudanças citológicas e bioquímicas (Raghavan, 1989) e extrínsecos, como: as condições do meio ambiente, incluindo pH do solo, temperatura, salinidade, umidade, luz e competidores; que podem afetar o desenvolvimento do gametófito (Lloyd & Klekowski Jr., 1970).

Estudos do efeito de pH na germinação de esporos de pteridófitas leptosporangiadas têm mostrado que a melhor germinação ocorre em pH ligeiramente ácido ou neutro (Miller, 1968). Porém, há variações nas respostas de esporos às condições fortemente ácidas. Em algumas espécies há uma baixa porcentagem de germinação (Mohr, 1956) ou não há germinação (Hevly, 1963).

Em outras espécies, moderados níveis de germinação ocorrem, mas o desenvolvimento gametofítico é limitado (Courbet, 1955; Otto *et al.*, 1984). Esporos de espécies terrestres de Ophioglossaceae, por exemplo, respondem ao pH do meio nutritivo similarmente aquelas pteridófitas leptosporangiadas que germinam melhor em um pH ligeiramente ácido (Whittier, 1981). Já para esporos de *Pleopeltis lepidopteris* (Langsd. & Fisch.) de la Sota = *Polypodium lepidopteris* Kunze, em que foram testados os efeitos de várias concentrações de pH, foi observado que, aos 7 dias de cultivo, houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ligeiramente ácidos, mas após 28 dias não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Viviani & Randi, 2008). Os solos salinos, como os do manguezal, são geralmente básicos e a sua acidificação ocorre, principalmente, pela dissociação do ácido carbônico (H_2CO_3) que se acumula no solo como produto da respiração e da fermentação (Larcher, 1986). Os processos bioquímicos e fisiológicos são profundamente influenciados pela concentração de CO_2 atmosférico (Lucht *et al.*, 2006). A análise dos resultados referentes ao estudo de diferentes pHs na germinação de *A. danaeifolium* mostram uma grande plasticidade dessa espécie em relação ao fator estudado e, que alterações na concentração de CO_2 nos solos dos manguezais, poderiam não influenciar a germinação de esporos.

A temperatura é um dos fatores que determinam o estabelecimento das espécies vegetais no meio ambiente e temperaturas amenas, segundo Towill (1978), são necessárias para induzir a germinação dos esporos da maioria das pteridófitas. Pérez-García & Riba (1982) realizaram estudos com espécies de Cyatheaceae e Dicksoniaceae e observaram que temperaturas acima de 25 °C reduzem a porcentagem de germinação de todas as espécies, sendo o ótimo entre 18 a 25 °C. Segundo Rana (1999), para espécies de pteridófitas de floresta mesofítica semidecídua do estado de São Paulo, a germinação foi semelhante em todas as temperaturas testadas; a maior germinabilidade foi observada novamente entre temperaturas de 18 e 25 °C para esporos de espécies da família Polypodiaceae. Para esporos de *Adiantopsis radiata* (L.) Fée (Pteridaceae) e *Polypodium pleopeltifolium* Raddi (Polypodiaceae), as maiores porcentagens de germinação foram encontradas entre 21 e 29 °C. Brum & Randi (2002) observaram que as maiores porcentagens de germinação de esporos de *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae) foram encontradas

em temperaturas de 15, 20 e 25 °C e a germinação foi parcialmente inibida a 30 °C. Viviani & Randi (2008) testaram o efeito das temperaturas de 20, 25 e 30 °C na germinação de esporos *Pleopeltis lepidopteris*, sendo que a germinação desta espécie também foi inibida a 30 °C. Os esporos de *A. danaeifolium* mostram um comportamento um pouco diferente da maioria das espécies citadas, uma vez que a temperatura de 30 °C não inibiu sua germinação sendo que possivelmente, em seu ambiente, a germinação de seus esporos seja promovida durante os meses em que as temperaturas ambientes sejam maiores, como nos meses de primavera e verão.

De acordo com Lugo *et al.* (1981), a salinidade é o principal fator estressante e regulador do desenvolvimento e da produtividade nos manguezais. Medina *et al.* (1990) afirmam que as pteridófitas não crescem em solos onde a salinidade excede 50 partes por mil e estão ausentes em manguezais de costas áridas onde a alta salinidade predomina. Segundo Hietz (2010), os manguezais podem ser considerados ambientes xéricos apesar de estarem frequentemente inundados. Isso ocorre porque, extrair água de água salobra com baixo potencial osmótico é fisiologicamente similar a extraí-la de um solo seco, como o de uma savana. Li & Ong (1997) analisaram o efeito de salinidade na ultra-estrutura de gametófitos de *Acrostichum aureum* L. e descreveram os cloroplastos cultivados em meio sem adição de NaCl como sendo cloroplastos normais, contendo estruturas de membranas de grana e estroma, grãos de amido e plastoglôbulos; as mitocôndrias apresentaram vários formatos: arredondas, ovaladas, em forma de ferradura, anel, sino ou amebóides. Por outro lado, relataram que os cloroplastos de gametófitos cultivados em meio contendo 1,0% de NaCl, mostraram menores pilhas de tilacóides e grandes espaços entre as membranas. Além da redução das taxas de fotossíntese, as mitocôndrias desses gametófitos apresentaram apenas a forma arredondada.

Neste trabalho, para esporos de *A. danaeifolium*, observou-se uma diminuição na porcentagem de germinação com o aumento da salinidade. Pode-se sugerir que modificações nos padrões de chuvas, com aumento da duração de períodos de menor pluviosidade, podem interferir na germinação dessa espécie. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Lloyd & Buckley (1986) que verificaram o efeito de concentrações crescentes de NaCl (0 a 3,0 %) na germinação de esporos de *A. aureum* e *A. danaeifolium* de populações da Jamaica e Flórida

(EUA). Os autores observaram severa redução da germinação e do desenvolvimento gametofítico. Sharpe (2010) analisou, durante aproximadamente três anos, o crescimento de plantas de *A. danaeifolium* no manguezal da Reserva Nacional de Pesquisas Estuarinas da Baía de Jobos, em Porto Rico, antes e após o aumento da salinidade provocado pelo Furacão Georges, em 1998, e observou que sob condições adversas de hiper-salinidade as plantas mantiveram o número total de folhas por planta, bem como a taxa de produção de folhas, mas produziram folhas mais curtas. As observações mais notáveis, segundo a autora, foram o aumento da mortalidade e a diminuição do tamanho das plantas após o distúrbio. Por outro lado, o aumento da fertilidade e da produção de biomassa foram respostas positivas mais significantes. Após o furacão, a produção de biomassa diminuiu nos primeiros oito meses, mas em dois anos superou os níveis pré-furacão. Sharpe (2010) comenta ainda que a importância econômica dos manguezais intactos nas regiões costeiras está crescendo e que os esforços para o reflorestamento de áreas fortemente prejudicadas por alterações climáticas ou geológicas, como as afetadas pelo tsunami do Oceano Índico (Check, 2005), serão beneficiados com a geração de conhecimentos sobre padrões de crescimento dos elementos que compõem o ecossistema dos manguezais, incluindo as pteridófitas.

5.3 EFEITO DA RUV B NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE GAMETÓFITOS ANALISADOS SOB MICROSCOPIA CONFOCAL

A RUV B representa um fator de estresse ambiental para as plantas, estando intimamente relacionada com alterações no crescimento e desenvolvimento vegetal (Rozema *et al.*, 1997; Laakso *et al.*, 2000; Jayakumar *et al.*, 2002). Essa radiação afeta a morfologia, anatomia, bioquímica e fisiologia das plantas em diferentes níveis que incluem: redução de área foliar; aumento de espessura de parênquima paliçádico e espaços intercelulares; aumento do comprimento celular e número de células no parênquima paliçádico e no mesofilo, alterações na estrutura de cloroplastos, como aumento de pilhas de tilacóides e dilatação dos tilacóides. Além de alterações no metabolismo celular, tais como deterioração da função fotossintética; aumento da capacidade

antioxidante e acumulação de compostos fenólicos (Hilal *et al.*, 2004). No atual trabalho, foi analisado o efeito da RUV B na germinação de esporos de *A. danaeifolium* e constatou-se um retardo da germinação, porém não foi observada inibição da germinação para esporos submetidos a essa radiação.

A introdução da microscopia digital de alta resolução, que inclui a microscopia confocal por varredura a laser associado ou não ao emprego de fluoróforos, levou a grandes avanços na pesquisa de organismos vivos. Essa combinação de princípios da óptica e da quimiluminescência tornou finalmente possível visualizar vários tipos de células vivas e medir fenômenos biológicos em tempo e espaço reais (Fonte: <http://www.ifi.unicamp.br>, acessado em 23/10/2009) gerando informações espaciais e estruturais em 3D mais dinâmicas do que as obtidas pela microscopia convencional de duas dimensões (Buda *et al.*, 2009; Omasa *et al.*, 2009). As imagens de gametófitos vivos de *A. danaeifolium* feitas ao microscópio confocal de varredura a laser, mostraram que os padrões de autofluorescência foram semelhantes para gametófitos submetidos aos dois tratamentos, PAR e RUV B. O fenômeno da autofluorescência foi observado também em *Equisetum arvense* L. (Equisetopsida, Equisetaceae) pelo uso de microscópio confocal, durante a germinação de microesporos e o desenvolvimento inicial dos gametófitos. Os microesporos mostraram autofluorescência azul no perisporo e autofluorescência verde e vermelha nos cloroplastos (Roshchina *et al.*, 2004). Em trabalho anterior, Roshchina e colaboradores (2002) associaram a cor vermelha a presença de clorofila e azulenos e, as cores azul e verde a presença de fenóis, terpenóides e azulenos. O mesmo padrão de autofluorescência foi encontrado para esporos e gametófitos de *A. danaeifolium*, entretanto os compostos químicos presentes nos esporos não foram detalhados nesse trabalho.

Os dados mais antigos encontrados na literatura, sobre o efeito da radiação ultravioleta (RUV) no crescimento de gametófitos de pteridófitas, datam de 1964, quando Kato analisou os efeitos dessa radiação (253 nm) na diferenciação e crescimento de *Pteris vittata*, *Osmunda japonica* e *Dryopteris varia*. Segundo a autora, os efeitos gerais induzidos pela RUV incluem reversão da polaridade do protonema e modificação do desenvolvimento do eixo, bem como o intumescimento de rizóides e células protaliais e o aparecimento de protonemas rizoidais. O efeito de RUV B sobre o crescimento, também foi verificado em plantas de *Jaborosa magellanica*

(Griseb.) Dusén (Solanaceae) que ocorrem na região da Patagônia Chilena. Essas plantas foram submetidas às exposições diárias de 9 h de RUV B, durante 51 dias, e foi observada severa redução da área foliar, além de danos ao DNA (Cuadra *et al.*, 2004). Boeger & Poulson (2006) relatam que plântulas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae), expostas a este tipo de radiação, apresentaram menor área foliar e massa fresca e seca, além de uma maior espessura foliar.

Nesse trabalho, os gametófitos de *A. danaeifolium* irradiados com RUV B mostraram retardo no crescimento, bem como a presença de algumas ramificações e intumescimentos que não foram observadas nos gametófitos que cresceram sob PAR. A análise morfológica dos gametófitos de *A. danaeifolium*, crescidos sob PAR, corrobora, em alguns aspectos, com o que foi observado por Lloyd & Gregg (1975) para a mesma espécie crescida em ágar. Os autores destacam a forma irregular do protalo, fato também observado nesse trabalho, embora tenha havido diferenças temporais em relação à maturidade sexual, posto que não fosse possível observar estruturas reprodutivas nos gametófitos (submetidos ou não a RUV B) mesmo após 34 dias de cultivo, enquanto os autores encontraram diferenças sexuais aos 23 dias de cultivo.

5.4 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE GAMETÓFITOS JOVENS CULTIVADOS SOB PAR E RUV B

Neste trabalho, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi outro recurso utilizado para a exploração de possíveis alterações ultraestruturais decorrentes da exposição diária de gametófitos de *A. danaeifolium* à RUV B e suas possíveis implicações frente ao aumento da falha da camada de ozônio principalmente na região sul do país. Há poucos estudos sobre MET para gametófitos de pteridófitas. Makgomol & Sheffield (2001) observaram que os gametófitos filamentosos de *Trichomanes speciosum* Willd (Hymenophyllaceae, Polypodiopsida) continham numerosos cloroplastos pequenos, esféricos ou ovóides, com grandes grãos de amido, granum com 11 tilacóides em média e um núcleo grande. Esse núcleo é semelhante ao encontrado neste trabalho em células de gametófitos de *A. danaeifolium* cultivados, tanto em PAR quanto em RUV B.

Comparando-se os gametófitos de *A. danaeifolium* cultivados sob PAR com os gametófitos irradiados com RUV B, constatou-se que os cloroplastos de gametófitos cultivados sob PAR são bastante alongados, mostraram alguns grãos de amido e plastoglóbulos; com tilacóides de grana bastante alongados, assemelhando-se mais aos tilacóides de estroma, enquanto que os cloroplastos de gametófitos irradiados com RUV B mostraram-se intumescidos, com maior depósito de grãos de amido, presença de plastoglóbulos aparentemente menores, mas em maior número e sistema granal aparentemente mais desenvolvido. Destaca-se que, de acordo com Austin e colaboradores (2006), plastoglóbulos são partículas de lipoproteína localizadas dentro dos cloroplastos e, o incremento em seu número, está relacionado com o aumento do estresse oxidativo no aparato fotossintético. Os autores afirmam que os plastoglóbulos têm por função a biossíntese de corpos lipídicos e são subcompartimentos dos tilacóides, armazenando substâncias como carotenóides, plastoquinonas e tocoferol (vitamina E), geralmente associadas à proteção do aparato fotossintético contra radicais livres.

O efeito de RUV também foi estudado na ultraestrutura de quatro espécies de algas vermelhas por Poppe e colaboradores (2003). Os resultados desse estudo mostraram que os cloroplastos das algas vermelhas são sensíveis à RUV. Os autores observaram rompimento de tilacóides e a formação de vesículas contendo ficobilissomos. Hilal *et al.* (2004) estudaram o efeito de exposições de RUV B sobre cotilédones de *Chenopodium quinoa* Willd (Amaranthaceae) e observaram que, nos cloroplastos expostos a uma dose única de RUV B, a organização foi semelhante ao controle, mas duas doses induziram um notável aumento na taxa 'tilacóides grana'/ 'tilacóides de lamela', além da dilatação dos espaços entre os tilacóides de estroma. Três doses de RUV B causaram um forte dano no sistema lamelar e uma diminuição nos tilacóides de grana. Para *A. danaeifolium*, houve um aumento das pilhas de granum em gametófitos cultivados sob RUV B.

Qian & Qing (2009) analisaram a influência do cloreto de lantânio (LaCl₃) na ultraestrutura de cloroplastos de células do mesofilo de soja (*Glycine max* (L.) Merrill – Fabaceae) submetidas a estresse por RUV B. Os autores observaram que, nas plantas controle, os cloroplastos apresentaram-se elípticos, de estrutura lamelar e membranas internas intactas com tilacóides de granum e de estroma organizados. Os cloroplastos de folhas irradiadas com

RUV B mostraram danos nas membranas, com tilacóides de estroma intumescidos e escuros, e com maior quantidade de amido e plastoglóbulos. Eles ainda concluíram que a destruição causada pela RUV B na estrutura do cloroplasto pode ser revertida ou mitigada pelo LaCl_3 . Haja vista que tilacóides desorganizados e enegrecidos, de plantas submetidas à baixa intensidade de RUV B, tornaram-se ordenados e claros após a aplicação do composto químico. Sarghein *et al.* (2010) analisaram o efeito de RUV A e RUV C em células de plântulas de *Capsicum longum* A.DC. (Solanaceae) e constataram que os tilacóides de cloroplastos tornaram-se dilatados. Os autores notaram também que, a exposição à RUV causou a formação de cristais de catalase nos peroxissomos, indicando reação ao estresse oxidativo. O aumento dos grãos de amido foi observado nos cloroplastos de células de gametófitos de *A. danaeifolium*. No entanto, não houve danos ao sistema de membranas dos cloroplastos e, nem cristais de catalase nos peroxissomos observados.

5.5 ANÁLISE DOS PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS E DA TAXA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS (ETR) PELA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* EM GAMETÓFITOS JOVENS

A medição de fluorescência da clorofila *a* do fotossistema II (PSII) tornou-se um método útil para a determinação dos mecanismos da fotossíntese e do estudo de diferentes condições ambientais nas reações fotossintéticas (White & Critchley, 1999). A energia luminosa (éxcitons) absorvida pelo complexo antena (LHCII) nos cloroplastos excita a clorofila do centro de reação do PSII. Uma vez excitada, essa molécula libera energia e emite fluorescência. A variação na intensidade da emissão da fluorescência (quenching ou supressão da fluorescência) é decorrente de dois caminhos possíveis da energia liberada: 1) A maior parte dessa energia é usada no transporte de elétrons (via fotoquímica – qP). Assim, em plantas adaptadas ao escuro com as quinonas A (QA) e B (QB) oxidadas, o quenching de fluorescência é rápido e a via fotoquímica tem o seu máximo de eficiência quântica (F_v/F_m , em que: $F_v = F_m - F_o$, F_m é a fluorescência máxima da clorofila *a* e F_o é a fluorescência mínima, em plantas adaptadas ao escuro). No entanto, quando ocorre a saturação dessa

via, as quinonas (QA e QB) próximas aos centros de reação fecham (ficam reduzidas) e o transporte de elétrons é então diminuído. 2) nesse estado, o excesso de energia proveniente da relaxação das clorofilas dos centros de reação, pode ser dissipado na forma de calor pela ação de carotenóides do LHCII (via não fotoquímica – NPQ). Assim, plantas com uma pré-história de luz apresentam uma variação no quenching fluorescente, reflexo da eficiência fotossintética efetiva (ΦPSII). A supressão de fluorescência é medida por meio de fluorímetro de pulso modulado - PAM. Esses equipamentos medem a fluorescência com base na cinética de relaxamento. Essa técnica também permite o cálculo de uma taxa de transporte de elétrons (ETR) do PSII (White & Critchley, 1999). A ETR está intimamente relacionada à atividade fotossintética mensurada pela evolução de O₂ e absorção de CO₂ (Beer *et al.*, 1998; Beer *et al.*, 2001).

Haapala *et al.* (2010), analisaram o efeito da exposição à RUV B de alta intensidade (46% maior que a do ambiente) aplicada durante 3 anos, sobre o crescimento de duas espécies que ocorrem em turfeiras boreais: *Eriophorum russeolum* Fr. ex Hartm. (Cyperaceae) e *Warnstorfia exannulata* Loeske (Bryophyta, Amblystegiaceae). Os autores observaram que a exposição à RUV B não causou nenhum efeito sobre a taxa de assimilação de CO₂ nas duas espécies, nem afetou a estrutura das organelas celulares. Esses autores sugerem que em um ecossistema natural, exposições de longa duração, mesmo em níveis razoavelmente elevados de RUV B, talvez não prejudiquem a fotossíntese de plantas de turfeiras.

No entanto, em plantas de *Pisum sativum* L. (Fabaceae) que foram expostas à RUV B observaram-se danos ao aparato fotossintético, uma conseqüente redução das taxas fotossintéticas e diminuição da evolução de O₂. A capacidade de transporte de elétrons do PSII também foi sensível à RUV B. O mesmo não ocorreu com a capacidade do doador de elétrons ao PSI, com relação ao restauro do transporte de elétrons do material irradiado com RUV B. Isso sugere que a inibição causada por esta radiação foi mais estreitamente associada ao PSII do que ao PSI (Brandle *et al.*, 1977). Em *Azolla microphylla* Kaulf. (Polypodiopsida, Salviniaceae), uma pteridófita aquática, irradiações com RUV B intermitentes durante 12 dias, causaram redução na atividade do PSII, mostrando que essa espécie também é sensível à RUV B (Jayakumar *et al.*, 2002).

As curvas rápidas de luz (RLC) fornecem informações detalhadas sobre as características de saturação do transporte de elétrons bem como o desempenho total da fotossíntese de uma planta. Os pontos cardinais derivados de uma curva rápida de luz (α , E_k , ETR_{Max} , β) descrevem a capacidade fotossintética foliar e suas adaptações às alterações ambientais, conforme comentam Ralph & Gademann (2005). A subida da curva na região limitada pela luz (α) é proporcional à eficiência de captura da luz, a eficiência quântica (Schreiber, 2004). A irradiância mínima saturante (E_k) é determinada pela interceptação de α com a taxa máxima de fotossíntese (ETR_{max}) (Sakshaug *et al.*, 1997). E_k está relacionada com a supressão de fluorescência, onde a qP domina abaixo de E_k enquanto a NPQ domina acima de E_k (Henley, 1993). Sob irradiância moderada, a capacidade de transporte de elétrons limita a fotossíntese e a curva atinge um patamar, quando então ocorre a ETR_{max} (Schreiber, 2004). O parâmetro β caracteriza o ângulo de declínio do PSII, também chamado de fotoinibição nas tradicionais curvas de luz, considerada também como fotoproteção em equipamentos que expõem os organismos a curtos períodos de luz (Ralph & Gademann, 2005).

No presente trabalho, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros fotossintéticos α , β e ETR_{max} , bem como nas ETRs; para gametófitos de *A. danaeifolium* cultivados sob PAR e RUV B. A manutenção do desempenho fotossintético nos gametófitos de *A. danaeifolium* submetidos à RUV B pode estar relacionada ao aumento da clorofila *b* ou a queda na razão clorofila *alb*.

5.6 ANÁLISE DE CLOROFILAS, CAROTENÓIDES E COMPOSTOS FENÓLICOS EM GAMETÓFITOS JOVENS CULTIVADOS SOB PAR E RUV B

Um estudo sobre o efeito de RUV B realizado com dois cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) mostrou que os níveis de clorofila, proteínas solúveis, conteúdo de rubisco e a taxa de fotossíntese não foram significativamente alterados pelos níveis ambientais de RUV B (Pinto *et al.*, 1999). Entretanto, em folhas de *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae) doses suplementares de RUV B, durante quatro dias, reduziram significativamente o crescimento e

os níveis de pigmentos fotossintetizantes. Porém, os níveis de antocianinas e flavonóides (compostos fenólicos) aumentaram significativamente. Os autores comentaram ainda que essas variações no metabolismo e alguns parâmetros bioquímicos podem representar uma resposta alternativa da planta frente esse tipo de radiação (Balakrishnan *et al.*, 2005). Hilal *et al.* (2004), acrescentam que diferentes espécies apresentam distintos graus de atenuação à RUV B, dependendo da composição de pigmentos e da intensidade e período de exposição a essa radiação. Jayakumar e colaboradores (2002) afirmam ainda que em *Azolla microphylla* Kaulf. (Polyodiopsida, Salviniaceae), uma samambaia aquática, irradiações intermitentes de RUV B, durante 12 dias, causaram redução nos níveis de clorofilas e de carotenóides.

Os carotenóides constituem uma classe de pigmentos lipossolúveis que inclui os carotenos como: α e β -carotenos e as xantofilas como: luteína e zeaxantina. Atuam como pigmentos acessórios na fotossíntese e são encontrados nos cloroplastos e cromoplastos das plantas (Raven *et al.*, 2001). Associados a mecanismos de fotoproteção, eles agem como “seqüestradores” do excesso de energia absorvida pelas clorofilas, protegendo o fotossistema, principalmente o PSII, de danos causados por radicais livres (Falkowski & Raven, 1997). O β -caroteno é conhecido como um pigmento com alto poder fotoprotetor (Demming-Adams, 1990) que confere as plantas uma maior capacidade para aclimação fotossintética sob condições ambientais extremas (Gómez-Pinchetti *et al.*, 1992). Sabe-se ainda que o β -caroteno, a luteína e zeaxantina são fotoprotetores e estão envolvidos na dissipação térmica do excesso de energia (García-Plazaola *et al.*, 2003). Apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos realizados nesse trabalho com relação à análise de carotenóides, pode-se destacar a presença de zeaxantina, luteína e β -caroteno em ambos os tratamentos para gametófitos de *A. danaeifolium*.

Os compostos fenólicos também são largamente presentes na natureza. Possuem atividade antioxidante e a sua formação é acelerada pela luz (Sellappan *et al.*, 2002). Cuadra *et al.* (1997) observaram aumentos nos níveis de compostos fenólicos totais, dentre eles os flavonóides, após uma dose de RUV B. Tratamentos de baixa intensidade de RUV B ($1,60 \text{ mW}^{-2}$) em plantas de *Gnaphalium luteo-album* L. (Asteraceae) causaram aumento de alongamento de caule, aumentos nos níveis de clorofilas *a* e *b*, nos

níveis de carotenóides e também nos níveis de compostos fenólicos vacuolares. Porém, os maiores aumentos foram observados nos níveis de clorofila *b* (49,65 %) e clorofila *a* (37,41 %). Segundo Temura (1983), os compostos fenólicos são protetores comuns contra a RUV B nas plantas superiores e, dependendo da espécie de planta, os níveis de clorofilas podem aumentar ou diminuir em resposta à RUV B. Em folhas de *Canavalia ensiformis* L., a RUV B causou uma redução na taxa clorofila *alb*. Isto pode ocorrer devido à redução de síntese ou aumento da degradação de clorofila *a* em comparação à clorofila *b* (Choi & Roh, 2003). O mesmo foi observado para *Jaborosa magellanica* (Griseb.) Dusen (Solanaceae) e *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb (Rosaceae) que apresentaram aumento nos pigmentos que absorvem RUV B, como flavonóides e antocianinas (Ranjbarfordoei *et al.*, 2009). Essas respostas podem ser consideradas como estratégia da planta para proteger o aparato fotossintético contra a radiação nociva. Boeger & Poulson (2006) relatam que folhas de plântulas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae), tratadas com RUV B, apresentaram maior concentração de clorofila total e de compostos fenólicos do que as folhas não tratadas com RUV B. Resultado semelhante foi encontrado neste trabalho para os gametófitos de *A. danaeifolium* submetidos à RUV B, que apresentaram variação na concentração de clorofila. Além disso, o cultivo dos gametófitos sob RUV B elevou a concentração de compostos fenólicos totais, o que deve ter minimizado os efeitos nocivos dessa radiação.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ausência de dados ecológicos sobre a fase gametofítica de pteridófitas tem deixado lacunas importantes sobre essa fase do ciclo de vida. Além disso, as pteridófitas estão associadas a ecossistemas que são particularmente sensíveis a degradação, alguns dos quais são considerados habitats de alta prioridade de conservação como, por exemplo, os manguezais.

Esse Bioma é quase exclusivamente tropical e intolerante às temperaturas muito frias. Apesar dessa vulnerabilidade, são ecossistemas dinâmicos de suma importância ecológica e geomorfológica. A sua vegetação consiste de poucas espécies e, por isso, a caracterização estrutural dessa vegetação é uma ferramenta valiosa na identificação das respostas desse ecossistema aos processos de alteração do meio ambiente, auxiliando estudos que objetivam a conservação dos manguezais.

Atualmente, a quantidade de gás CFC presente na alta atmosfera é muito grande e, segundo pesquisas recentes do INPE, essa situação deve persistir por várias dezenas de anos contribuindo para o aumento do buraco na camada de ozônio. Com isso, a quantidade de RUV B que chega a superfície da Terra tem aumentado e, esta exposição, pode provocar diversas alterações morfofisiológicas nos seres vivos, principalmente nos vegetais.

Acrostichum danaeifolium é uma espécie distribuída pelos trópicos e subtropicais do Novo Mundo e membro característico das comunidades de manguezal, presente também em manguezais de Santa Catarina. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo abrangente sobre a germinação de esporos e o desenvolvimento gametofítico inicial dessa espécie. Analisando o efeito de diferentes tratamentos sobre a germinação dos esporos e o efeito da RUV B no desenvolvimento gametofítico e na taxa fotossintética de esporófitos jovens de *A. danaeifolium*. Pode-se observar que os gametófitos são sensíveis ao aumento de RUV B mostrando mudanças ultraestruturais e mecanismos de fotoproteção do aparato fotossintético contra essa radiação.

7. BIBLIOGRAFIA

Ambrósio, S.T. & Barros, I.C.L. 1997. Pteridófitas de uma área remanescente de Floresta Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 11: 105-113.

Arcand, N.N. & Ranker, T.A. 2008. Conservation Biology. *In: The biology and evolution of ferns and lycophytes*. Cambridge University Press, 468p.

Austin, J.R.; Frost, E.; Vidi, P-A.; Kessler, F.; Staehelin, L.A. 2006. Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *The Plant Cell* 18: 1693-1703.

Balakrishnan, V, Ravindran, K.C, Venkatesan, K.; Karuppusamy, S. 2005. Effect of UV-B supplemental radiation on growth and biochemical characteristics in *Crotalaria juncea* L. seedlings. *Electronic Journal Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 4: 1125-1131.

Barros, I.C.L.; Silva, A.J.R.; Silva, L.L.S. 1989. Levantamento florístico das pteridófitas ocorrentes na Zona das Caatingas do Estado de Pernambuco, Brasil. *Biologica Brasilica* 1: 143-159.

Barros, I.C.L. & Silva, M.B.C. 1996. Taxonomia, padrão de venação e aparelhos estomáticos de *Pteris schwackeana* Christ (Pteridaceae, Pteridophyta). *Broteria* 67: 257-262.

Beer, S.; Vilenkin, B.; Weil, A.; Veste, M.; Susel, L.; Eshel, A. 1998. Measuring photosynthetic rates in seagrasses by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *Marine Ecology Progress Series* 174: 293–300.

Beer, S.; Björk, M.; Gademann, R.; Ralph, P.J. 2001. Measurement of photosynthesis in sea grasses. *In: Short, F.T.; Coles, R. (Eds.). Global Seagrass Research Methods*. Elsevier Publishers, The Netherlands, pp. 183–198.

Björn, L.O. 2007. Stratospheric ozone, ultraviolet radiation, and cryptogams. *Biological conservation* 135: 326-333.

Boeger, M.R.T. & Poulson, M. 2006. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *Acta botânica brasilica* 20: 329-338.

Brade, A.C. 1940. Contribuição para o estudo da Flora Pteridofítica da Serra do Baturité, estado de Ceará. *Rodriguésia* 4: 189-314.

Brandle, J.R.; Campbell, W.F.; Sisson, W.B.; Caldwell, M.M. 1977. Net photosynthesis, electron transport capacity, and ultrastructure of *Pisum sativum* L. exposed to ultraviolet-B radiation. *Plant Physiology* 60, 165-169.

Brum, F. R. & Randi, A. M. 2002. High irradiance and temperature inhibit the germination of spores of the fern *Rumohra adiantiformis* (Forst.) Ching (Dryopteridaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 25: 391-396.

Buda, G.J.; Isaacson, T.; Matas, A.J.; Paolillo D.J.; Rose, J.K.C. 2009. Three-dimensional imaging of plant cuticle architecture using confocal scanning laser microscopy. *The Plant Journal* 60: 378-385.

Carlson, T.J. 1979. The comparative ecology and frequencies of interspecific hybridization of Michigan wood-ferns. *Michigan Botanist* 18: 47-56.

Check, E. 2005. Natural disasters: Roots of recovery. *Nature* 438: 910-911.

Choi, B.Y. & Roh, K.S. 2003. UV-B Radiation affects chlorophyll and activation of RUBISCO by rubisco activase in *Canavalia ensiformis* L. leaves. *Journal of Plant Biology* 46: 117-121.

Contreras-Duarte, A.R.; Ángel, R.G.B.; Bulla, L.C.J. 2006. Atlas de las esporas de pteridófitos de Chipaque (Cundinamarca, Colombia). *Caldasia* 28: 327-357.

Courbet, H. 1955. Influence de la concentration ionique du milieu sur la germination des spores et la croissance des prothalles de

Filicales en culture aseptique. Comptes rendus de l'Académie des Sciences 241: 441-443.

Cuadra, P.; Harborne, J.B.; Waterman, P.G. 1997. Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. *Phytochemistry* 45: 1377-1383.

Cuadra, P.; Herrera, R.; Fajardo, V. 2004. Effects of UV-B radiation on the Patagonian *Jaborosa magellanica* Brisben. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 76: 61-68.

Demming-Adams, B. 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1020: 1-24.

Döhler, G.; Alt, M.-R.; Moyses, A. 1989. Assimilation of ¹⁵N-ammonia during irradiance with ultraviolet-B and monochromatic light by *Thalassiosira rotula*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 308: 513-518.

Dyer, A.F. 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. *In: The experimental biology of ferns*. Academic Press, London. pp.253-305.

Falkowski, P.G. & Raven, J.A. 1997. *Aquatic photosynthesis*. Blackwell Science, 375p.

FAO 2007. *The world's mangroves, 1980-2005: a thematic study prepared in the framework of the global forest resources assessment 2005*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 89p.

Fernandez, H.; Bertrand, A.M.; Sanchez-Tames, R. 1996. Influence of tissue culture conditions on apogamy in *Dryopteris affinis* sp. *affinis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45: 93-97.

Fernández, H.; Bertrand, A.M.; Sánchez-Tamés, R. 1997. Gemmation in cultured gametophytes of *Osmunda regalis*. *Plant Cell Reports* 16: 358-362.

Froidefond, J.M. & Soriano-Sierra, E.J. 1996. Sensoriamento remoto sobre ecossistemas de manguezal da Ilha de Santa Catarina, Brasil. I: Adequação da técnica. Anais VIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. INPE, Salvador. pp.157-163.

García-Plazaola, J.I.; Hernández, A.; Olano, J.M.; Becerril, J.M. 2003. The operation of the lutein epoxide cycle correlates with energy dissipation. *Functional Plant Biology* 30: 319-324.

GEO Brasil 2002: Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil, IBAMA. Brasília: Ed. IBAMA, 2002.

Goméz-Pinchetti, J.L. ; Ramazanov, Z. ; Fontes, A. ; García-Reina, G. 1992. Photosynthetic characteristics of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Dunaliellales) in relation to β -carotene content. *Journal of Applied Phycology* 4 : 11-15.

Greenberg, B.M.; Gaba, V.; Canaani, O.; Malkin, S.; Mattoo, A.K.; Edelman, M. 1989. Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction center protein in the visible and UV spectral regions. *Proceedings of National Academy of Sciences* 86: 6617-6620.

Haapala, J.K.; Mörsky, S.K.; Saarnio, S.; Suokanerva, H.; Kyrö, E.; Silvola, J. Holopainen, T. 2010. Long-term effects of elevated UV-B radiation on photosynthesis and ultrastructure of *Eriophorum russeolum* and *Warnstorfia exannulata*. *Science of the Total Environment* 409: 370-377.

Henley, W.J., 1993. Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. *Journal of Phycology* 29: 729–739.

Hevly, R.H. 1963. Adaptations of Cheilanthoid ferns to desert environments. *Journal of the Arizona Academy of Science* 2: 164-175.

Hietz, P. 2010. Fern adaptations to xeric environments. In: *Fern ecology*. Cambridge University Press. 444p.

Hilal, M.; Parrado, M.F.; Rosa, M.; Gallardo, M.; Orce, L.; Massa, E.M.; González, J.A.; Prado, F.E. 2004. Epidermal lignin deposition in Quinoa cotyledons in response to UV-B Radiation. *Photochemistry and Photobiology* 79: 205–210.

Hogarth, P. J. 1999. *The biology of mangroves*. New York, Oxford University Press. 228p.

Jayakumar, M.; Eyini, M.; Lingakumar, K.; Kulandaivelu, G. 2002. Effects of enhanced ultraviolet-B (280-320 nm) radiation on growth and photosynthetic activities in aquatic fern *Azolla microphylla* Kaulf. *Photosynthetica* 40: 85-89.

Jones, R.J.; Kildea, T.; Hoegh-Guldberg, O. 1999. PAM chlorophyll fluorometry: a new in situ technique for stress assessment in scleractinian corals, used to examine the effects of cyanide from cyanide fishing. *Marine Pollution Bulletin* 38: 864-874.

Kato, Y. 1964. Consequences of ultraviolet radiation on the differentiation and growth of fern gametophytes. *New phytologist* 63: 21-27.

Kenrick, P. & Crane, P.R. 1997. The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389: 33-39.

Kulandaivelu, G. & Daniell, H. 1989. Dichlorophenyl dimethylurea (DCMU) induced increase in chlorophyll *a* fluorescence intensity – an index of photosynthetic oxygen evolution in leaves, chloroplasts and algae. *Physiologia Plantarum* 48: 385-388.

Laakso, K.; Sullivan, J.H.; Huttunen, S. 2000. The effects of UV-B radiation on epidermal anatomy in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell and Environment* 23: 461–472.

Labiak, P.H. & Prado, J. 1998. Pteridófitas epífitas da Reserva Volta Velha, Itapoá, Santa Catarina, Brasil. *Boletim do Instituto de Botânica* 11: 1-79.

Larcher, W. 1986. *Ecofisiologia vegetal*. EPU, São Paulo. 320p.

- Li, X.-P & Ong, B.-L. 1997. Ultrastructural changes in gametophytes of *Acrostichum aureum* L. cultured in different sodium chloride concentrations. *Biologia plantarum* 39: 607-614.
- Lloyd, R.M. & Buckley, D.P. 1986. Effects of salinity on gametophyte growth of *Acrostichum aureum* and *A. danaeifolium*. *Fern Gazete* 13: 97-102.
- Lloyd, R.M. & Klekowski Jr., E.J. 1970. Spore germination and viability in pteridophyta: evolutionary significance of chlorophyllous spores. *Biotropica* 2: 129-137.
- Lloyd, R.M. & Gregg, T.Lee. 1975. Reproductive biology and gametophyte morphology of *Acrostichum danaeifolium* from Mexico. *American Fern Journal* 65:105-120.
- Lorscheitter, M.L.; Ashraf, A.R.; Windisch, P.G.; Mosbrugger, V. 2001. Pteridophytes spores of Rio Grande do Sul flora, Brazil. Part III. *Palaeontographica. Abteilung B. Paläophytologie, Stuttgart*, v. 260, n. 1-6, p. 1- 165.
- Lucht, W.; Schaphoff, S.; Erbrecht, T.; Heyder, U.; Cramer, W. 2006. Terrestrial vegetation redistribution and carbon balance under climate change. *Carbon Balance and Management* 1:6.
- Lugo, A.E; Cintron, G.; Goenaga, C. 1981. Mangrove ecosystems under stress. Stress effects on natural ecosystems. Wiley, New York, pp. 129-153.
- Makgomol, K. & Sheffield, E. 2001. Gametophyte morphology and ultrastructure of the extremely deep shade fern, *Trichomanes speciosum*. *New Phytologist* 151: 243–255.
- Medina, E.; Cuevas, E.; Popp, M.; Lugo, A.E. 1990. Soil salinity, sun exposure, and growth of *Acrostichum aureum*, the mangrove fern. *Botanical Gazette* 151: 41-49.
- Millër, J. H. 1968. Fern gametophytes as experimental material. *Botanical Review* 34: 361-440.

Mohr, H. 1956. Die Abhängigkeit des Protonemawachstums und der Protonemapolarität bei Farnen von Licht. *Planta* 47: 127-158.

Moran, R.C. 1995. *Acrostichum*. In: Moran, R.C. & Riba, R. (eds.). Psilotaceae a Salviniaceae vol. 1. In: Davidse, G.; S. Sousa, M & Knapp, S. (eds.). Flora Mesoamericana. Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp. 105-106.

Nogués, S. & Baker, N.R. 1995. Evaluation of the role of damage to photosystem II in the inhibition of CO₂ assimilation in pea leaves on exposure to UV-B radiation. *Plant, Cell & Environment* 18: 781-787.

Nondorf, S.L.; Dooley, M.A.; Palmieri, M.; Swatzell, L.J. 2003. The effects of pH, temperature, light intensity, light quality, and moisture levels on spore germination in *Cheilanthes feei* of Southeast Missouri. *American Fern Journal* 93: 56-69.

Omasa, K.; Konishi, A.; Tamura, H.; Hosoi, F. 2009. 3D Confocal Laser Scanning Microscopy for the analysis of chlorophyll fluorescence parameters of chloroplasts in intact leaf tissues. *Plant Cell Physiology* 50: 90-105.

Otto, E. T.; Crow, J. H & Kirby, E. G. 1984. Effects of acidic growth conditions on spore germination and reproductive development in *Dryopteris marginalis* (L.). *Annals of Botany* 53: 439-442.

Page, C.N. 1979. The diversity of ferns. An ecological perspective. In: Dyer, A.F. (ed.) *The experimental biology of ferns*. Academic Press, London. pp. 10-56.

Pangua, E.; Belmonte, R.; Pajarón, S. 2009. Germination and reproductive biology in salty conditions of *Asplenium marinum* (Aspleniaceae), a European coastal fern. *Flora – Morphology Distribution Functional Ecology of Plants* 204: 673-684.

Park, Y.S., Barrett, J.D.; Bonga, J.M. 1998. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 34: 231-239.

- Peres, M.T.L.P.; Silva, L.B.; Faccenda, O.; Hess, S.C. 2004. Potencial alelopático de espécies de Pteridaceae (Pteridophyta). *Acta Botanica Brasilica* 18: 723-730.
- Pérez-García, B. & Riba, R. 1982. Germinacion de esporas de *Cyatheaceae* bajo diversas temperaturas. *Biotropica* 14: 281-287.
- Pinto, M.E.; Casati, P.; Hsu, T-P.; Ku, M.S.B.; Edwards, G.E. 1999. Effects of UV-B radiation on growth, photosynthesis, UV-B-absorbing compounds and NADP-malic enzyme in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under different nitrogen conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 48: 200-209.
- Platt, T., Gallegos, C.L., Harrison, W.G. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *Journal of Marine Research* 38: 687-701.
- Poppe, F.; Schimdt, R.A.M.; Hanelt, D.; Wiencke, C. 2003. pEffects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. *Phycological Research* 51: 11-19.
- Prado, J. 2010. *Pteridaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB091794>).
- Qian, P. & Qing, Z. 2009. Influence of lanthanum on chloroplast ultrastructure of soybean leaves under ultraviolet-B stress. *Journal of Rare Earths* 27: 304-307.
- Raghavan, V. 1989. Developmental biology of fern gametophytes. Cambridge University Press, New York. 376p.
- Ralph, P.J. & Gademann, R. 2005. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic Botany* 82: 222-237.
- Ranal, M.A. 1999. Effects of temperature on spore germination in some fern species from semideciduous mesophytic forest. *American Fern Journal* 89:149-158.

Randhir, R.; Shetty, P.; Shetty, K. 2002. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry* 37: 1247-1256.

Randi, A.M. & Crozier, A. 1991. Gibberellins, indole-3-acetic acid and the germination of spores of the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. *Revista Brasileira de Botânica* 14: 67-72.

Randi, A.M. & Felipe, G.M. 1988a. Efeitos da temperatura durante a pré e pós-indução e do período de armazenamento na germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. *Hoehnea* 15: 10-19.

Randi, A.M. & Felipe, G.M. 1988b. Germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb. sob luz azul e aplicações longas de vermelho. *Revista Brasileira de Biologia* 48: 979-984.

Randi, A.M. & Felipe, G.M. 1988c. Efeito do armazenamento de esporos, da aplicação de DCMU e da pré-embrição em PEG na germinação de *Cyathea delgadii* Sternb. *Ciência e Cultura* 40: 484-489.

Randi, A.M. & Felipe, G.M. 1988d. Lipid content during germination of spores of the fern *Cyathea delgadii* Sternb. *Revista Brasileira de Botânica* 11: 37-39.

Randi, A.M. & Felipe, G.M. 1988e. Effect of red light and far-red on the germination of spores of *Cyathea delgadii* Sternb. *Revista Brasileira de Botânica* 11: 41-45.

Ranjbarfordoei, A.; van Damme, P.; Samson, R. 2009. Elevated ultraviolet-B radiation influences photosynthetic pigments and soluble carbohydrates of sweet almond *Prunus dulcis* (Miller) D. Webb. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 8: 1077-1084.

Rathinasabapathi, B. 2006. Ferns represent an untapped biodiversity for improving crops for environmental stress tolerance. *New Phytologist* 172: 385-390.

Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. 2001. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan. 906pp.

- Reitz, R. 1961. Vegetação da zona marítima de Santa Catarina. *Sellowia* 13: 17-115.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208-212.
- Roshchina, V.V.; Melnikova, E.V.; Yashin, V.A.; Karnaukhov, V.N. 2002. Autofluorescence of intact spores studied by of horsetail *Equisetum arvense* L. during development. *Biophysics* 47: 318-324.
- Roshchina, V.V.; Yashin, V.A.; Kononov, A.V. 2004. Autofluorescence of plant microspores studied by confocal microscopy and microspectrofluorimetry. *Journal of Fluorescence* 14: 745-750.
- Ross, M. 1996. Mapping the world's pteridophyte diversity – systematics and floras. In: Camus, J.M.; Gibby, M. & Johns, R.J. (eds.) *Pteridology in Perspective*. Royal Botanic Garden, Kew. 700p.
- Rozema, J.; Staaij, J. van de; Björn, L.O.; Caldwell, M. 1997. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends in Ecology and Evolution* 12: 22-28.
- Sakshaug, E.; Bricaud, A.; Dandonneau, Y.; Falkowski, P.G.; Kiefer, D.A.; Legendre, L.; Morel, A.; Parslow, J.; Takahshi, M. 1997. Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. *Journal of Plankton Research* 19: 1637–1670.
- Santana, D.G. & Ranal, M. A. 2004. Análise da germinação. Um enfoque estatístico. Editora UnB, Brasília. 248p.
- Sarghein, S. H.; Carapetian, J.; Khara, J. 2010. The effects of UV radiation on some structural and ultrastructural parameters in pepper (*Capsicum longum* A.DC.) *Turkish Journal of Biology* 35: 69-77.

Sellappan, S.; Akoh, C.C.; Krewer, G. 2002. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2432-2438.

Schaeffer-Novelli, Y (ed.). 1995. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. *Caribbean Ecological Research*, São Paulo. 64p.

Schreiber, U.; Bilger, W.; Neubauer C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze E-D and Caldwell MM (eds). *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer, Berlin. pp 49–70.

Schreiber, U. 2004. Pulse-amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method. In: Papageorgiou, G. and Govindjee (Eds.) *Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis*. Advances in photosynthesis and respiration series. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Sharpe, J.M. (2010). Responses of the mangrove fern *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch. (Pteridaceae, Pteridophyta) to disturbances resulting from increased soil salinity and Hurricane Georges at the Jobos Bay National Estuarine Research Reserve, Puerto Rico. *Wetlands Ecology and Management* 18: 57-68.

Smith, A.R. 1972. Comparison of fern and flowering plant distributions with some evolutionary interpretations for ferns. *Biotropica* 4: 4-9.

Smith, A.R.; Pryer, K.M.; Schettelpelz, E.; Korall, P.; Schneider H.; Wolf, P.G. 2006. A classification for extant ferns. *Taxon* 55: 705-731.

Soriano-Sierra, E. J. 1993. Caracterização ecológica dos biótopos e sua ocupação pelas comunidades vegetais no manguezal do Itacorubi (Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil). *Trab. Concurso Público Professor Adjunto UFSC*. 124p.

Souza, M.L.D'El R.; Falkenberg, D.B. de; Amaral, L. da G.; Fronza, M.; Araújo, A.C.; Sá, M.R.de. 1991. Vegetação do Pontal da Daniela, Florianópolis, SC, Brasil. I. Levantamento Florístico e Mapa Fitogeográfico. *Insula* 21: 87-117.

Souza, M.L.D'El R.; Falkenberg, D.B. de; Amaral, L. da G.; Fronza, M. 1994. Fitossociologia do manguezal do rio Tavares (ilha de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil). *Insula* 23: 99-119.

Spurr, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of ultrastructure Research* 26: 31-43.

Sullivan, J.H. & Teramura, A.H. 1989. The effects of ultraviolet-B radiation on lobelley pine: I. Growth, photosynthesis and pigment production in greenhouse-grown seedlings. *Physiologia Plantarum* 77: 202-207.

Temura, A.H. 1983. Effects of ultraviolet-B radiation on the growth and yield of crop plants. *Physiologia Plantarum* 58:415-427.

Tevini, M. & Teramura, A.H. 1989. UV-B effects in terrestrial plants. *Photochemistry and Photobiology* 50: 479-487.

Towill, L.R. 1978. Temperature and photocontrol of *Onoclea* spore germination. *Plant Physiology* 62:116-119.

Tryon, R. 1972. Endemic areas and geographical speciation in tropical american ferns. *Biotropica* 4: 121-131.

Tryon, R.M. & Tryon, A.F. 1982. Ferns and allied plants, with special reference to tropical America. Springer Verlag, New York. 857p.

Viviane, D. & Randi, A.M. 2008. Effects of pH, temperature and light on spore germination and growth analysis of young sporophytes of *Polypodium lepdopteris* (Pteridophyta, Polypodiaceae). *Rodriguésia* 59: 751-760.

Walker, L.R. & Sharpe, J.M. 2010. Ferns, disturbance and succession. In: Fern ecology. Cambridge University Press, 444p.

Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307 – 313.

Whelan, J. & Glaser, E. 1997. Protein import into plant mitochondria. *Plant Molecular Biology* 33: 771-789.

White, A.J. & Critchley, C. 1999. Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research* 59: 63–72.

Whittier, D.P. & Moyroud, R. 1993. The promotion of spore germination and gametophyte development in *Ophioglossum palmatum* by low pH. *American Fern Journal* 83: 41-46.

Whittier, D.P. 1981. Spore germination and young gametophyte development of *Botrychium* and *Ophioglossum* in axenic culture. *American Fern Journal* 71: 13-19.

Wilhelm, C.; Bida, J.; Domin, A.; Hilse, C.; Kaiser, B.; Kesselmeier, B.; Lohr, M.; Muller, A.M. 1997. Interaction between global climate change and the physiological responses of algae. *Photosynthetica* 33: 491-503.

Windisch, P.G. 1990. Pteridófitas da região norte-ocidental do estado de São Paulo: guia para estudo e excursão. UNESP, São José do Rio Preto. 108p.

Xavier, S.R. da S. & Barros, I.C.L. 2003. Pteridófitas ocorrentes em fragmentos de Floresta Serrana no estado de Pernambuco, Brasil. *Rodriguésia* 54: 13-21.

Zar, J. H. 1996. *Biostatistical Analysis*, 3 ed. Prentice Hall, New Jersey. 662p.

8. SITES CONSULTADOS

1. <http://www.nybg.org/bsci/herb/ferns.html>, acessado em 13/08/2008.
2. <http://www.agrorede.org.br/ceca/ucs/app.html>, acessado em 13/08/2008.
3. http://www.inpe.br/antartica/noticia_pan.html, acessado em 23/10/2009.
4. http://www.nasa.gov/vision/earth/environment/ozone_resource_page.html, acessado em 23/10/2009.
5. <http://www.ifi.unicamp.br>, acessado em 23/10/2009.

