

Ana Paula Lorenzen Voytena

**ESTUDOS MORFOFISIOLÓGICOS DE UMA  
SAMAMBAIA EPÍFITA DA MATA ATLÂNTICA  
TOLERANTE À DESSECAÇÃO - *Pleopeltis pleopeltifolia*  
(Raddi) Alston (POLYPODIACEAE)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Áurea Maria Randi  
Coorientadora: Profa. Dra. Marisa Santos

Florianópolis

2012

Voytena, Ana Paula Lorenzen  
ESTUDOS MORFOFISIOLÓGICOS DE UMA SAMAMBAIA EPÍFITA DA  
MATA ATLÂNTICA TOLERANTE À DESSECAÇÃO - *Pleopeltis*  
*pleopeltifolia* (Raddi) Alston (POLYPODIACEAE) [dissertação]  
/ Ana Paula Lorenzen Voytena ; orientadora, Áurea Maria  
Randi ; co-orientadora, Marisa Santos. - Florianópolis, SC,  
2012.

89 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Biologia Vegetal. 2. Samambaias. 3. Tolerância à  
dessecação. 4. Pigmentos fotossintéticos. 5. Taxa de  
transporte de elétrons (ETR). I. Randi, Áurea Maria. II.  
Santos, Marisa. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. IV.  
Titulo.

Ana Paula Lorenzen Voytena

**ESTUDOS MORFOFISIOLÓGICOS DA SAMAMBAIA  
EPÍFITA DA MATA ATLÂNTICA TOLERANTE À  
DESSECAÇÃO - *Pleopeltis pleopeltifolia* (RADDI) ALSTON  
(POLYPODIACEAE)**

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 29 de junho de 2012.

---

Dra. Maria Alice Neves

Coordenadora do Programa

Banca Examinadora

---

Dra. Áurea Maria Randi (Orientadora)

---

Dra. Marisa Santos (Coorientadora)

---

Dr. Moacir A. Torres (UDESC/CAV)

---

Dra. Rosete Pescador (UFSC/CCA)

---

Dra. Ana Cláudia Rodrigues (UFSC/CCB)

“Dedico este trabalho ao meu querido pai, Moacir Voytena (*in memoriam*)”.

## **Agradecimentos**

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Departamento de Botânica, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal (PPGBVE) pelo mestrado oferecido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro fornecido sob forma de bolsa. Ao projeto “Rede de Epífitas” (PNADB-CAPES) pela possibilidade de conhecer pesquisadores de diferentes instituições brasileiras, pela experiência adquirida em diferentes cursos oferecidos e pelo auxílio financeiro dado ao projeto desenvolvido.

Aos meus pais, Marisa e Moacir Voytena. Pela enorme dedicação, amor e carinho com que sempre cuidaram de mim. Em especial ao meu pai, que mesmo não estando mais aqui, estará eternamente presente no meu coração, nos meus pensamentos e na minha vida.

Ao meu namorado, Bruno Minardi, por todo apoio durante os momentos difíceis que passei durante o mestrado, pelo companheirismo e parceria durante toda esta trajetória.

À Profa. Dra. Áurea Maria Randi, pela orientação, pela amizade, pelos ensinamentos, pela confiança, pelo seu enorme carinho, por todos os momentos ótimos que passamos juntas.

À Profa. Dra. Marisa Santos, pela coorientação, pelo seu interesse e prontidão em sempre auxiliar no desenvolvimento do trabalho, por todas as sugestões e ensinamentos.

À Profa. Dra. Maria Terezinha Paulilo, por todas as festinhas que alegravam nossos dias!

Ao Prof. Dr. Moacir A. Torres, pelas conversas, ensinamentos de bioquímica e auxílio nas análises de fotossíntese.

Ao Prof. Dr. Paulo A. Horta pela disponibilização do seu laboratório para a realização das nossas pesquisas.

Aos meus queridos amigos do Departamento de Botânica, por todos os bons momentos que passamos juntos, sempre com muita diversão! Em especial ao Robson, Jeovane, Elise, Kátia, Thaise, Tassi, Grazi, Felipe, Valduga, Tito, Leandro, Vivian, Pati, Gabi, Carlos por todas as festinhas, sushis, lanches, hot-dogs, cafés e etc.! Também agradeço a Chirle pela ajuda na microscopia de fluorescência.

Aos amigos do Lafic (micro e macroalgas), em especial à Cintia Martins, pela sua prontidão em sempre ajudar, pelas tardes ouvindo Itapema FM; ao Eduardo Bastos, pois sem ele meus gráficos simplesmente não existiriam!!!

Obrigada a todos!!!

## Resumo

*Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston (Polypodiopsida, Polypodiaceae) é uma samambaia endêmica do Brasil, pertencente ao bioma Mata Atlântica. Este trabalho teve como objetivos avaliar a desidratação, reidratação e conteúdo relativo de água (CRA) de frondes, bem como verificar as alterações morfofisiológicas e bioquímicas relacionadas ao estado de hidratação de esporófitos de *P. pleopeltifolia*. Esporófitos adultos (=férteis) foram coletados na Unidade de Conservação Ambiental Desterro (UCAD), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, sendo submetidos a diferentes tratamentos de desidratação (0, 5, 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia). Partindo de um CRA inicial médio de 85,83%, os esporófitos apresentaram um declínio notável no conteúdo de água, quando mantidos sem irrigação, além do evidente murchamento e enrolamento foliar. Em apenas cinco dias, ocorreu uma redução de 83,1% no conteúdo de água, passando para um CRA médio de 14,5%. Após este período inicial, as plantas passaram para um estado estável de seca sendo mantida uma média de 12,9% de CRA aos dez dias de desidratação e 9,6% aos quinze dias. Durante o tratamento de reidratação, as plantas reidrataram totalmente, ocorrendo um aumento de 87,8% no conteúdo de água, sendo que as frondes recuperaram sua morfologia original, como a observada em frondes hidratadas. Durante os cinco dias iniciais dos tratamentos de desidratação, ocorreram decréscimos tanto nos conteúdos de clorofila *a* e clorofila *b*, bem como, no conteúdo de clorofilas totais. O conteúdo de carotenoides também diminuiu durante a dessecação. Entre o quinto e o décimo quinto dia de dessecação, ocorreram pequenas variações no CRA e durante este período os conteúdos de clorofilas e carotenoides das frondes também não foram alterados. Na reidratação, ocorreu uma recuperação parcial no conteúdo de clorofilas e carotenoides, atingindo 158% e 305% de aumento, respectivamente, em relação aos quinze dias de tratamento de desidratação, em apenas um dia, sugerindo a síntese



*de novo* destes pigmentos. As plantas submetidas aos cinco dias de desidratação, quando comparadas às plantas hidratadas, não apresentaram diferenças nos parâmetros fotossintéticos analisados:  $E_{\text{optimum}}$  (irradiância ótima),  $P_{\text{max}}$  (taxa de transporte de elétrons máxima) e Alfa  $\alpha$  (eficiência fotossintética). Já as plantas submetidas aos dez e quinze dias de desidratação tiveram reduções, tanto nos valores de  $P_{\text{max}}$  bem como no  $\alpha$ , atingindo zero em todos estes parâmetros nos quinze dias de desidratação. A  $E_{\text{optimum}}$  foi diferente apenas nas plantas submetidas aos quinze dias de desidratação, atingindo valor nulo. A partir dos dez dias de desidratação, decaimentos notáveis na inclinação ( $\alpha$ ) das curvas rápidas de luz, bem como na amplitude das mesmas foram perceptíveis, sendo que não foi possível a detecção da fluorescência da clorofila *a* nos indivíduos submetidos aos quinze dias de desidratação, gerando uma taxa de transporte de elétrons (ETR) nula. O conteúdo de prolina em frondes não foi alterado durante a desidratação, sugerindo que este aminoácido não atua como soluto compatível na espécie em tratamentos de estresse hídrico. Contudo, um incremento na concentração de açúcares é perceptível nos dez primeiros dias de tratamento de seca, sendo que em apenas cinco dias de desidratação ocorreu um aumento de 204% neste conteúdo, em relação às plantas hidratadas. Na reidratação, ocorreu um decréscimo no nível de açúcares, voltando aos valores próximos aos encontrados em folhas hidratadas. Os dados obtidos sugerem a atuação dos açúcares como solutos compatíveis, podendo favorecer um possível ajustamento osmótico para a espécie em situações de dessecação, além da possibilidade de vitrificação.

Palavras-chave: *Pleopeltis pleopeltifolia*, conteúdo relativo de água (CRA), pigmentos, curvas rápidas de luz (RLC's), prolina, açúcares solúveis totais.

## Abstract

*Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston (Polypodiopsida, Polypodiaceae) is a species endemic to Brazil, belonging to the phytogeographical area of the Atlantic Forest. This study aimed to evaluate the dehydration, rehydration and relative water content (RWC) of fronds as well as check morphophysiological and biochemical changes related to the hydration status of sporophytes of *P. pleopeltifolia*. Adult sporophytes (=fertile) of species were collected in the Environmental Desterro Park (UCAD), located in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. Sporophytes were subjected to different dehydration processes (0, 5, 10 and 15 days) and rehydration (1 day). Starting from an initial RWC average of 85.83%, the sporophytes showed a sharp decline in water content when kept without irrigation, besides the obvious wilting and leaf rolling. In five days, there was a significant reduction of 83.1% in the water content, passing to an average RWC of 14.5%. After this initial period, the plants passed to a stable state of dehydration maintaining an average of 12.9% of RWC after ten days of dehydration and 9.6% after fifteen days. During rehydration treatment, plants rehydrated completely, showing an increase of 87.8% in water content, and fronds regained their original morphology, as seen in hydrated plants. During the five initial days of dehydration treatment, there were decreases both in the level of chlorophyll *a* and chlorophyll *b*, as well as the total chlorophyll level. The carotenoids level decreased during the drying processes. Between the fifth and fifteenth days of desiccation, there were small variations in the RWC and during this period the contents of chlorophylls and carotenoids of the fronds were not changed. On rehydration, the content of chlorophylls and carotenoids was partly recovered, reaching an increase of 158% and 305%, respectively, in relation to the fifteen days of dehydration treatment. These recoveries suggest *de novo* synthesis of these pigments. Plants subjected to five days of dehydration when compared to hydrated plants

showed no significant differences in photosynthetic parameters analyzed:  $E_{\text{optimum}}$  (optimal irradiance),  $P_{\text{max}}$  (electron transport rate maxima) and Alfa  $\alpha$  (photosynthetic efficiency). Plants after ten and fifteen days of dehydration had significant reductions in both  $P_{\text{max}}$  and  $\alpha$ , reaching zero in all these parameters within fifteen days of dehydration. The  $E_{\text{optimum}}$  differed significantly only in plants subjected to fifteen days of dehydration, reaching zero. After ten days of dehydration, notable decays in inclination ( $\alpha$ ) of rapid light curves as well as the amplitude of the same were noticeable; it was not possible to detect the chlorophyll fluorescence after fifteenth day dehydration and consequently the electron transport rate (ETR) was zero. The water stress treatments didn't significantly affect the proline content in fronds, suggesting that this amino acid doesn't act as a compatible solute in this species. However, a significant increase in sugar concentration in fronds was noticeable in the first ten days of treatment, and in only five days of dehydration, there was an increase of 204% in sugar level. The data obtained suggest the action of the sugars as compatible solutes, which may favor a possible osmotic adjustment for the species in case of desiccation, and the possibility of vitrification.

Keywords: *Pleopeltis pleopeltifolia*, relative water content (RWC), pigments, rapid light curves (RLC's), proline, total soluble sugars.

## Lista de figuras

Figura 1 - Fronde fértil de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston [imagem online - Paulo Schwirkowski (FloraRS)]. Disponível em [http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=6527](http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=6527) [Acessado 20 dezembro 2011].....- 30 -

Figura 2 – *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston. Microscopia eletrônica de varredura. 1. Aspecto geral de esporos no interior de microesporângio aberto. 2. Vista proximal do esporo monoete, face convexa e forma elipsoidal, com cicatriz (seta preta) saliente no centro. Depósitos irregulares (seta branca) na superfície do perisporo. 3. Vista distal do esporo com superfície côncava. Barras – 1. 20 µm; 2-3. 10 µm.....- 43 -

Figura 3 - Secções transversais de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston, em microscopia óptica convencional (1-4 e 7-8) e de fluorescência (5-6 e 9). 1, 3. Aspecto geral da raque. 2. Lâmina foliar destacando os tecidos do mesofilo, delimitados por epiderme uniestratificada. 3, 4 e 6. Tecidos adaxiais da raque. Note em 3 a diferença dos diâmetros do lume celular, confirmando tratar-se de fibras. 5. (Filtro triplo - excitação: 330 – 385 nm, 460 – 490 nm, 510 – 550 nm; emissão: 420 nm, 520 nm, 590 nm) e 6. (Filtro azul - excitação: 330 – 385 nm; emissão: 420 nm) Fluorescência evidenciando os cloroplastos (vermelho) e lignina e cutina (verde/azul). Em 5. a endoderme, conspícua devido à fluorescência da suberina, contornando o meristelo. 7. Bordo da fronde com tecido de sustentação, subepidérmico. 8 e 9. (Filtro azul - excitação: 330 – 385 nm; emissão: 420 nm) Detalhe do meristelo, envolvido por endoderme (cabeça de seta) e estrato de células com espessamento em “U”.

Em 8., note periciclo uni ou biestratificado e xilema em forma de “V” (metaxilema central - \*; protoxilema nas extremidades – seta). Em 9. destaca-se a fluorescência das estrias de Caspary na endoderme. Legenda: Bu - bainha de células com espessamento em “U”; Ct - cutícula; En - endoderme; Ep - epiderme; Fab - face abaxial; Fad – face adaxial; Fi – fibras; Fl - floema; Me - meristelo; Pcl - parênquima clorofilado; Pe - parênquima esponjoso; Pr – periciclo; Ptp - parênquima tendendo ao paliádico.....- 49 -

Figura 4 - Vistas frontais da superfície epidérmica de fronde de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston, em microscopia eletrônica de varredura (1, 3, 4 e 6) e microscopia óptica (2 e 5). 1, 2. Face adaxial, note células com paredes anticlinais sinuosas e periclinais (1) convexas (cabeça de seta); destituída de estômatos. 3. Face abaxial, paredes celulares anticlinais sinuosas e periclinais convexas (cabeça de seta); estômatos (seta) presentes. 4. Detalhe de estômato, note poro em fenda (seta). 5. Face abaxial, poro estomático parecendo mais amplo decorrente do plano de observação, interno à superfície cuticular (4. mostra vista mais superficial, indicando que há presença de um átrio externo, entre poro e ostíolo, característica xeromorfa). 6. Superfície abaxial evidenciando os tricomas em forma de escamas, note a forma alongada a partir da base (seta) e bordas com projeções (cabeça de seta). Barras – 1. 100µm; 2. 25 µm; 3. 50 µm; 4. 10 µm; 5. 25 µm; 6. 200 µm. ....- 50 -

Figura 5 - Alterações na porcentagem de peso de massa fresca de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston imersas em água destilada por um período de 20 horas sob irradiância RFA 20 µmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, temperatura de 25 ± 2 °C. Os valores representam médias para n = 5.....- 52 -

Figura 6 - Conteúdo relativo de água (CRA) de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston submetidas aos tratamentos de desidratação (0, 5 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia). Os valores são médias para n = 5. Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes (ANOVA seguida por teste de Tukey  $p > 0,05$ ). Barras representam o desvio padrão.- 56

Figura 7 – Indivíduos de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston.  
1. Planta hidratada (Conteúdo relativo de água médio - 85,83%) 2.  
Planta desidratada (Conteúdo relativo de água médio - 9,6%)- 57 -

Figura 8 - Conteúdo de clorofilas *a* e *b* de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston submetidas aos tratamentos de desidratação (0, 5, 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia). Os valores são médias para n=3. Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes (ANOVA seguida por teste de Tukey  $p > 0,05$ ). Barras representam o desvio padrão.....- 60 -

Figura 9 - Conteúdo de clorofilas totais de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston submetidas aos tratamentos de desidratação (0, 5, 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia). Os valores são médias para n=3. Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes ANOVA seguida por teste de Tukey  $p > 0,05$ ). Barras representam o desvio padrão.....- 60 -

Figura 10 - Razão do conteúdo de clorofilas *a* e *b* de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston submetidas aos tratamentos de desidratação (0, 5, 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia). Os valores são médias para n=3. Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes (Kruskal-Wallis

seguido por teste de Dunn  $p > 0,05$ ). Barras representam o desvio padrão. ....- 61 -

Figura 11 - Conteúdo de carotenoides de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston submetidas aos tratamentos de desidratação (0, 5, 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia). Os valores são médias para  $n=3$ . Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes (ANOVA seguida por teste de Tukey  $p > 0,05$ ). Barras representam o desvio padrão.....- 61 -

Figura 12 - Curva Rápida de Luz (RLC) Fotossíntese (ETR) versus Irradiância (E) de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston sob diferentes tratamentos: (♦) 0 dias, (■) 5 dias, (▲) 10 dias, (●) 15 dias de desidratação e (x) 1 dia de reidratação. Os valores são médias para  $n = 3$ . Barras representam o desvio padrão.....- 66 -

Figura 13 - Conteúdo de prolina de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston submetidas aos tratamentos de desidratação (0, 5, 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia). Os valores são médias para  $n = 3$ . Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes (ANOVA seguida por teste de Tukey  $p > 0,05$ ). Barras representam o desvio padrão.....- 68 -

Figura 14 – Curva padrão de glicose. ....- 71 -

Figura 15 - Conteúdo de açúcares solúveis totais de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston submetidas aos tratamentos de desidratação (0, 5, 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia). Os valores são médias para  $n = 3$ . Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes (ANOVA seguida por teste de Tukey  $p > 0,05$ ). Barras representam o desvio padrão.- 71

-

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Parâmetros da Curva Rápida de Luz (RLC) plotadas com ETR (P) *versus* irradiância (E) em esporófitos de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston, sob diferentes tratamentos de desidratação (0, 5, 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia), utilizando o modelo de curva *Waiting-in-line*. Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes (ANOVA seguido por teste de Tukey  $p > 0,05$ ). Média  $\pm$  DP (n = 3). .....- 65 -



## Lista de abreviaturas e siglas

- $\alpha$  – Eficiência da fotossíntese
- $A$  - Constante de escalonamento para a altura da curva de fotossíntese
- ANOVA – Análise de variância
- Chl  $a$  – Clorofila  $a$
- Chl  $a^*$  - Estado energizado da clorofila  $a$  (singleto 1)
- Chl  $b$  – Clorofila  $b$
- CRA – Conteúdo relativo de água
- DP – Desvio padrão
- $E$  – Irradiância
- $E_{\text{optimum}}$  – Irradiância ótima
- ETR – Taxa de transporte de elétrons
- Fig. - Figura
- $k_w$  - Constante de escalonamento para o eixo X em curva de fotossíntese
- LA - Luz actínica
- LS - Luz saturante
- MCA – Metanol, clorofórmio e água
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura

- MF - Massa fresca
- MS – Massa seca
- MT - Massa túrgida
- P – Medida da fotossíntese
- PAM - Fluorometria de Amplitude Modulada
- PEG – Polietilenoglicol
- $P_{\max}$  – Taxa de transporte de elétrons máxima
- PSI – Fotossistema I
- PSII – Fotossistema II
- $\Phi$ PSII - Rendimento quântico efetivo do Fotossistema II
- RFA – Radiação fotossinteticamente ativa
- RLC - Curva Rápida de Luz
- $T_g$  - Temperatura de transição do estado vítreo para líquido
- $T_m$  - Temperatura de transição de fase de membrana
- $T_{\text{opt}}$  – Tempo ideal de embebição
- UCAD - Unidade de Conservação Ambiental Desterro
- UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

## Sumário

Agradecimentos .....	I
Resumo .....	III
Abstract.....	V
Lista de figuras .....	VII
Lista de abreviaturas e siglas .....	XII
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA... - 17 -	
2. OBJETIVOS..... - 32 -	
2.1    Objetivo geral.....- 32 -	
2.2    Objetivos específicos .....	- 32 -
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	- 33 -
3.1    Local de coleta .....	- 33 -
3.2    Espécie estudada .....	- 33 -
3.3    Acondicionamento de esporos .....	- 33 -
3.4    Análise estrutural de esporos e frondes.....	- 34 -
3.5    Análise ultraestrutural de esporos e frondes.....	- 35 -

3.6	Determinação da curva de absorção de água.....	- 36 -
3.7	Desidratação, reidratação e determinação do conteúdo relativo de água (CRA).....	- 36 -
3.8	Determinação do conteúdo de clorofilas e carotenoides-	37 -
3.9	Avaliação da taxa de transporte de elétrons de esporófitos .....	- 38 -
3.10	Determinação do conteúdo de prolina.....	- 39 -
3.11	Determinação do conteúdo de açúcares solúveis totais. -	40 -
3.12	Análise estatística dos dados .....	- 41 -
4.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>- 42 -</b>
4.1	Ultraestrutura de esporos.....	- 42 -
4.2	Morfoanatomia de fronde de esporófitos .....	- 43 -
4.3	Curva de absorção de água.....	- 51 -
4.4	Desidratação, reidratação e conteúdo relativo de água (CRA) -	53 -
4.6	Taxa de transporte de elétrons (ETR) de esporófitos-	62 -
4.7	Conteúdo de prolina .....	- 66 -
4.8	Conteúdo de açúcares.....	- 69 -

5. CONCLUSÕES.....	- 72 -
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	- 73 -

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No mundo, ocorrem cerca de 13.600 espécies de licófitas e samambaias, sendo que desse montante, 12.240 espécies são samambaias com maior diversidade concentrada nas regiões tropicais montanhosas (Moran 2008). No Brasil ocorrem 1.176 espécies, sendo 123 licófitas e 1.053 samambaias, das quais 450 (38,2%) espécies desse total são endêmicas do Brasil. O Domínio fitogeográfico brasileiro com o maior número de espécies é a Mata Atlântica, com 834 espécies de samambaias e licófitas (Forzza *et al.* 2010). Tryon & Tryon (1982) estimaram a ocorrência de cerca de 600 espécies de samambaias e licófitas no leste do Brasil, concentradas principalmente na região da Mata Atlântica, sendo os gêneros mais diversos: *Cyathea*, *Lindsaea*, *Elaphoglossum*, *Dryopteris*, *Asplenium* e a família Polypodiaceae como um todo.

Muitas espécies são cosmopolitas, vivendo preferencialmente nas regiões tropicais do mundo, em locais úmidos e sombreados das matas. As samambaias apresentam ampla distribuição nos ecossistemas, em uma grande variedade de ambientes, sendo que a existência de uma grande variedade de samambaias permite ao grupo desempenhar um importante papel ecológico, em um amplo espectro de comunidades vegetais, onde sua diversidade de estruturas e habitats só tem paralelo com as angiospermas (Page 1979). As samambaias podem variar consideravelmente do ponto de vista morfológico, desde plantas muito pequenas, com um ou dois centímetros de comprimento, até plantas com porte arbórescente, atingindo entre cinco e sete metros de altura, com um caule pronunciado (Tryon & Tryon 1982). Cada uma destas situações específicas requer características morfológicas, anatômicas e fisiológicas adequadas que possibilitem a sobrevivência em diferentes condições ambientais (Windisch 1992).

As samambaias são plantas vasculares sem sementes, que possuem ciclo de vida com alternância de gerações. Uma delas é

caracterizada pela fase gametofítica, haploide, na qual ocorrem trocas gênicas entre os organismos. É geralmente efêmera, com duração de alguns dias ou semanas, possui pequeno porte (alguns milímetros ou centímetros de comprimento), não possui tecido vascular para condução de água e nutrientes e geralmente cresce prostrada, aderida aos substratos (rochas, cascas de árvores, solo, folhas, etc.). A outra fase do ciclo de vida, que é muito mais conspícua, é a fase esporofítica. Ao contrário da fase gametofítica, esta é perene, chegando a durar vários anos de vida, muito mais complexa em sua constituição, com número diploide de cromossomos, dotada de tecido vascular e formando raízes, caule e folhas verdadeiros (Raghavan 1989).

Estudos filogenéticos recentes revelaram uma dicotomia basal dentro do grupo das plantas vasculares, separando-as em duas linhagens evolutivas distintas: Lycophyta (menos de 1% das plantas vasculares existentes) e Euphyllophyta (Smith *et al.* 2006). As Euphyllophyta compreendem dois grandes clados: as Spermatophyta, que incluem as plantas com sementes, com cerca de 260.000 espécies e as Monilophyta, que incluem *Equisetum* L., *Psilotum* Sw. e todas as samambaias eusporangiadas e leptosporangiadas, com cerca de 9.000 espécies. Do ponto de vista evolutivo, o termo Pteridophyta não reflete uma classificação adequada para estas plantas, tendo em vista que os novos termos empregados especificam grupos monofiléticos (Pryer *et al.* 2004; Smith *et al.* 2006). Segundo Smith *et al.* (2006), o termo Monilophyta não foi validamente publicado e, portanto, não deve ser usado com sua raiz latina, mantendo a denominação de samambaias. O táxon Polypodiopsida inclui o grupo das samambaias leptosporangiadas, o maior dentre as monilófitas atuais, com mais de 11.000 espécies distribuídas em várias famílias e que compreende a maioria das plantas que são vulgarmente chamadas de samambaias ou fetos (Pryer *et al.* 2004; Smith *et al.* 2006).

Page (1979) distingue cinco ambientes principais onde as samambaias são encontradas: méxico tropical, epifítico xérico tropical, terrestre xérico tropical, alpino tropical e temperado.

Dentre cada um desses ambientes principais um número de habitats são distinguidos, sendo esta classificação limitada na medida em que alguns locais não são facilmente atribuídos e muitas espécies podem ser encontradas em mais de um habitat.

Madison (1977) definiu as epífitas como plantas que não possuem conexões diretas com o solo, utilizam-se de suporte, mas não dos nutrientes dos forófitos em que se apoiam em algum estágio de sua vida. Uma definição mais ecológica diz que, o epifitismo é uma interação comensal entre plantas na qual uma espécie dependente beneficia-se somente do substrato fornecido pela planta hospedeira, obtendo nutrientes diretamente da umidade atmosférica, sem emitir estruturas haustoriais (Bennett 1986).

A dependência da umidade atmosférica faz com que a flora epifítica tenha seus centros de diversidade em florestas úmidas, sendo que a dinâmica de comunidades nas florestas tropicais é influenciada pela flora epifítica. Sua biomassa fotossintetizante pode se igualar ou até ultrapassar a dos forófitos (Benzing 1990), sendo que a serrapilheira proveniente de epífitas apresenta maior concentração de nutrientes que a produzida por materiais de origem arbórea (Nadkarni & Matelson 1991). O acúmulo de material vegetal cria uma fonte rica em nutrientes disponível para a fauna e a flora acima do solo (Nadkarni 1981). Além de aumentarem a retenção de água (Clark *et al.* 1998), as epífitas umidificam o ambiente, auxiliando em atividades biológicas, como a fixação de nitrogênio nas copas das árvores (Weaver 1972).

O habitat epifítico é um local onde, mesmo em florestas tropicais úmidas, plantas sem contato direto com o solo estão expostas à secas recorrentes, e características xerofíticas estão sendo encontradas e estudadas em diversas epífitas (Hietz 2010). A maioria das epífitas é monocotiledônea (65%), destacando-se Orchidaceae e Bromeliaceae, seguida das Monilophyta (15,4%), com destaque para Polypodiaceae e Dryopteridaceae (Kersten 2010). Enquanto aproximadamente  $\frac{1}{3}$  das samambaias são



classificadas como epífitas, somente uma pequena porção destas podem ser classificadas como xerófitas (Hietz 2010).

Segundo Hietz (2010), a tolerância à dessecação se refere à habilidade para sobreviver a uma perda quase total de água nos tecidos: cerca de 90% do conteúdo de água de uma folha. Neste teor de água, o tecido da planta pode estar em equilíbrio com o ar ambiente, então não há mais perda de água a menos que o ar fique mais seco ou mais quente. Esta enorme redução no conteúdo de água resulta em mudanças na forma da célula, na concentração de solutos e nos estados de hidratação da membrana e de macromoléculas. Poucas plantas são capazes de sobreviver a estas mudanças, levando a um grande estresse ao nível celular. Plantas que sobrevivem a esta extrema perda de água são tolerantes à dessecação, que é, portanto, uma importante estratégia de sobrevivência para muitas samambaias xerófitas (Hietz 2010).

A tolerância é relativamente comum em briófitas e líquens e muito rara em plantas com semente. As samambaias ocupam uma posição intermediária e um bom número de espécies, principalmente de ambientes xéricos, são tolerantes à dessecação. Mesmo sem estudos fisiológicos detalhados para cada espécie, pode ser assumido que a maioria das espécies que dessecam, ficam com folhas enroladas após períodos de seca, e folhas vigorosas após a chuva pertencem a este grupo (Hietz 2010).

Muitas samambaias já foram descritas como tolerantes à dessecação, entretanto pouco tem sido reportado sobre o mecanismo que as mesmas utilizam para sobreviver à dessecação celular (Farrant *et al.* 2009). Como a taxa de dessecação em samambaias é relativamente lenta, é provável que, como em angiospermas, estas dependam mais da acumulação *de novo* para proteção durante a seca, do que da proteção constitutiva juntamente com os reparos associados à desidratação característicos em briófitas (Oliver *et al.* 2000). Uma adaptação observada em muitas samambaias tolerantes à dessecação, mas rara em angiospermas é o enrolamento das folhas, que reduz a área foliar, reduzindo a perda de água e danos causados pela luz. O modo de enrolamento das folhas é predeterminado e espécie

específico (Hietz 2010). Durante períodos de sol, a perda de água pode ser minimizada através do fechamento de estômatos, evitando possíveis danos provocados pela dessecação, entretanto, tecidos clorofilados podem sofrer estresse foto-oxidativo, causado pela produção de espécies reativas de oxigênio no aparato fotossintético. As plantas podem compensar este estresse foto-oxidativo através de sistemas de defesa antioxidantes e fotoprotetores, incluindo carotenoides localizados diretamente nas membranas tilacóides. Em casos de seca contínua, as plantas aumentam a concentração constitutiva de carotenoides de proteção, para fornecer maior proteção. Em casos mais severos, estas substâncias protetoras podem ser degradadas sob estresse e, eventualmente a degradação de pigmentos segue como um resultado do dano oxidativo (Tausz *et al.* 2001).

As plantas tolerantes à dessecação podem ser divididas em dois grupos: homeoclorofiladas e poiquiloclorofiladas (Tuba *et al.* 1998). As homeoclorofiladas preservam o conteúdo de clorofilas durante a dessecação, enquanto que em poiquiloclorofiladas a dessecação resulta na perda de clorofilas e tilacóides, que devem ser resintetizados após reidratação (Gaff 1977; Bewley 1979; Csintalan *et al.* 1996; Tuba *et al.* 1993; Tuba *et al.* 1998). Em relação ao conteúdo de carotenoides, em espécies poiquiloclorofiladas, este pode ser parcialmente (Sherwin & Farrant 1998) ou totalmente degradado durante desidratação (Willigen 2001).

As clorofilas e os carotenoides são pigmentos fotossintéticos orgânicos, encontrados em suas formas ativas nos cloroplastos dos vegetais, capazes de absorver radiação visível do espectro solar (Seiferman-Harms 1987; Taiz & Zeiger 2010). Em plantas superiores, o tecido fotossintético mais ativo é o mesofilo foliar, sendo que suas células possuem grandes quantidades de cloroplastos, os quais contêm pigmentos verdes especializados na absorção de luz, as clorofilas. A clorofila parece verde aos nossos olhos devido ao seu espectro de absorção, que absorve fortemente nas porções azul (aproximadamente 430 nm) e vermelha (aproximadamente 660 nm) do espectro, então, somente uma

parte da luz enriquecida em comprimentos de luz verde (aproximadamente 550 nm) é refletida nos nossos olhos (Taiz & Zeiger 2010). A faixa espectral absorvida para desencadear o processo fotossintético é dependente do pigmento em questão, sendo que a clorofila possui picos de absorção máxima na faixa do azul e vermelho, o mesmo espectro de ação para a fotossíntese (Hall & Rao 1980).

A clorofila *a* está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica, participando do primeiro estágio do processo, que envolve a conversão da energia luminosa em energia química, enquanto que os demais pigmentos fotossintetizantes participam da absorção de luz e da transferência de energia radiante para os centros de reação, sendo chamados de pigmentos acessórios, como as clorofilas *b*, *c*, *d* e os carotenoides (Streit *et al.* 2005). Já os diferentes tipos de carotenoides são encontrados em todos os organismos fotossintetizantes, com picos de absorção na região dos 400 a 500 nm, originando uma coloração alaranjada característica. Estes pigmentos constituem integralmente as membranas dos tilacóides e encontram-se associados aos pigmentos das antenas e dos centros de reação. A radiação luminosa absorvida pelos carotenoides é transferida para as moléculas de clorofila, sendo, portanto chamados de pigmentos acessórios. Além da função como pigmento acessório, os carotenoides desempenham um papel essencial na fotoproteção, liberando o excesso de energia antes que esta possa danificar o organismo (Taiz & Zieger 2010). A combinação das clorofilas (*a* e *b*) e dos carotenoides capacita as plantas a captarem a maior parte da energia luminosa, sendo esta absorção um dos fatores que podem limitar a eficiência fotossintética das plantas, o crescimento e a adaptabilidade a diferentes habitats e ambientes (Engel & Poggiani 1991).

A fluorescência emitida pela clorofila *a* pode ser utilizada como uma ferramenta muito eficiente para a mensuração de diversos parâmetros fotossintéticos, principalmente para realização de análises em condições de estresse natural ou gerado pelo homem (Genty *et al.* 1989). As metodologias atuais para a

realização das medições da emissão de fluorescência da clorofila *a* podem nos fornecer informações rápidas a respeito da taxa transferência de elétrons, bem como a conversão e dissipação da energia luminosa em nível do Fotossistema II, sempre mantendo a integridade do material vegetal utilizado nas análises (Bilger *et al.* 1995).

Os pigmentos fotossintéticos apresentam um papel chave nos processos de fotossíntese, quando as moléculas de clorofila absorvem energia luminosa, elas alteram transitoriamente suas configurações eletrônicas a nível atômico. Estes pigmentos fotossintéticos se alteram do estado basal (Chl *a*) para o estado excitado, o singlete 1 (Chl *a*\*). Este estado excitado possui vida muito curta ( $\approx 10^{-8}$  s) e é muito instável, assim, após receberem a energia dos fótons, estes pigmentos dissipam a energia proveniente da luz através de três vias de dissipação (desexcitação) da Chl *a*\* (Taiz & Zeiger 2010). Em uma folha, a energia da luz absorvida pelas moléculas de clorofila pode seguir três diferentes destinos: ser utilizada para conduzir a fotossíntese (energia fotoquímica), o excesso de energia pode ser dissipado na forma de calor e também pode ser reemitida como fluorescência. Estes três processos ocorrem em competição, de tal forma que qualquer aumento na eficiência de um destes parâmetros resultará em uma diminuição no rendimento dos outros dois. Assim, medindo-se a emissão de fluorescência da clorofila, informações sobre alterações na eficiência fotoquímica e na dissipação de calor podem ser obtidas. Embora a quantidade total de fluorescência da clorofila seja muito pequena (1 ou 2% do total da luz absorvida), as medições podem ser facilmente realizadas. O espectro da fluorescência é diferente do espectro de absorção da luz, onde o pico de emissão de fluorescência possui um comprimento de onda maior do que a luz absorvida. Portanto, o rendimento de fluorescência pode ser quantificado, expondo uma folha à luz de comprimentos de onda definidos, mensurando a quantidade de fluorescência emitida (Maxwell & Johnson 2000). A Fluorometria de Amplitude Modulada, comumente chamada de PAM, é um método que possibilita a realização de medições rápidas e precisas

de diversos parâmetros fotossintéticos (Genty *et al.* 1989; Krause & Weis 1991; Bilger *et al.* 1995; Gloag *et al.* 2007). De acordo com White & Critchley (1999), estudos utilizando Curvas Rápidas de Luz (RLC's) são muito úteis na investigação do aparato fotossintético das plantas. Esta é a única técnica disponível atualmente que pode investigar o estado adaptado ao escuro do aparato fotossintético em exposições crescentes de luz, sempre alterando significativamente as propriedades fotossintéticas e as respostas de fluorescência foliar (White & Critchley 1999). Esta metodologia analisa variações na fluorescência em resposta a pulsos com intensidades crescentes de luz, sendo que a partir desta informação pode-se estimar a taxa de transporte de elétrons (ETR), entre outros parâmetros fotossintéticos (Kooten & Snel 1990; Krause & Weis 1991; Gloag *et al.* 2007; White & Critchley 1999).

A taxa de transporte de elétrons é uma estimativa da fotossíntese bruta e é definida como:  $ETR = \Phi_{PSII} \cdot RFA \cdot (0.5) \cdot (0.84)$ , onde,  $\Phi_{PSII}$  é o rendimento quântico efetivo do Fotossistema II, RFA é a radiação fotossinteticamente ativa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) utilizada, (0,5) é o coeficiente de atribuição entre o PSI/PSII, considerando que 50% dos fótons são absorvidos pelo PSII e (0,84) é a constante de absortância para plantas determinada por Bjorkman & Demmig (1987) e Runcie & Durako (2004), devido ao fato de que nem toda a radiação que chega até as folhas é absorvida pelas moléculas de clorofila, alguns fótons podem ser transmitidos e outros refletidos (Bjorkman & Demmig 1987).

Os valores de ETR, relativo à utilização da constante de absortância 0,84, plotados em Curvas Rápidas de Luz (RLC's) taxa fotossintética (P) *versus* irradiância (E), devem conter parcelas de ETR *versus* irradiância (E) que obedeçam à função exponencial  $Y = x \cdot e^{-x}$  (Ritchie 2008). Este modelo de equação é conhecido como *Waiting-in-Line* (função de densidade probabilística) (Ritchie 2008). O modelo *Waiting-in-line* pode ser utilizado em uma grande variedade de sistemas biológicos em que a taxa inicial é diretamente proporcional à quantidade de

substrato, mas eventualmente pode ocorrer saturação a uma densidade determinada de substrato, podendo ser completamente inibida quando ocorre aumento no substrato (Ritchie 2008). Uma forma adequada para a modelagem da fotossíntese foi descrita por Gloag *et al.* (2007) como:  $P = A \cdot k_w \cdot E \cdot e^{-k_w \cdot E}$ , onde, (P) é medida da fotossíntese como ETR, evolução de O<sup>2</sup> ou absorção de CO<sup>2</sup>, (A) é uma constante de escalonamento para a altura da curva, ( $k_w$ ) é uma constante de escalonamento para o eixo X e (E) é a irradiância ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Mecanismos fisiológicos e bioquímicos da tolerância à dessecação têm sido estudados em vários modelos vegetais. Enquanto espécies diferem em alguns detalhes, os mecanismos básicos incluem a síntese de proteínas e carboidratos para a proteção de membranas e macromoléculas da oxidação e de danos mecânicos, como o encolhimento da célula (Hietz 2010).

O potencial hídrico das plantas pode ser mantido durante períodos de seca através de ajustamento osmótico. O ajustamento osmótico é a capacidade das células vegetais para acumular solutos e utilizá-los para abaixar o potencial hídrico durante períodos de estresse osmótico. O ajustamento envolve um aumento líquido no conteúdo de soluto por células que é independente das alterações de volume resultantes da perda de água, sendo que ocorre através do acúmulo de íons, predominantemente compartimentabilizados em vacúolos. Com isso, é necessário o acúmulo de outros solutos no citoplasma para a manutenção do potencial hídrico em equilíbrio com a célula. Os solutos compatíveis são compostos orgânicos osmoticamente ativos na célula, e não desestabilizam as membranas ou interferem no funcionamento de enzimas. Células vegetais podem manter altas concentrações destes compostos sem efeitos prejudiciais no metabolismo (Taiz & Zeiger 2010). Solutos compatíveis comuns incluem aminoácidos, como a prolina, açúcares, entre outros (Ingram & Bartels 1996; Taiz & Zeiger 2010). O acúmulo destes solutos auxilia na prevenção da desnaturação de proteínas, na preservação da estrutura e atividade de enzimas e na proteção das membranas contra efeitos danosos

provocados por espécies reativas de oxigênio (ROS) (Hare *et al.* 1999).

O aminoácido prolina é de considerável interesse biológico em situações de resistência ao estresse hídrico em plantas, sendo demonstrado seu acúmulo nessas situações e o decaimento rápido de seus níveis após reidratação. A prolina pode atuar como um composto de armazenamento de carbono e nitrogênio, além de participar do ajustamento osmótico, como um soluto compatível, balanceando diferenças de concentração entre o citoplasma e o vacúolo das plantas. Este aminoácido, em solução aquosa, apresenta diversas características não usuais para substâncias com baixo peso molecular, sendo sua solubilidade, densidade e viscosidade características de coloides hidrofílicos (Schobert & Tscheche 1978).

Os açúcares podem proteger as células durante períodos de dessecação severa através da vitrificação, sendo que através deles um líquido supersaturado é produzido com as propriedades de um sólido (Ingram & Bartels 1996). O vidro é um estado sólido termodinamicamente instável com viscosidade extremamente alta (Franks *et al.* 1991). Devido à alta viscosidade do estado vítreo, este previne a cristalização de compostos químicos, fusão entre os sistemas de membrana e alterações conformacionais em proteínas (Hoekstra *et al.* 2001), além de reduzir consideravelmente os índices de reações químicas possivelmente deletérias nas células desidratadas (Buitink *et al.* 1998). Os carboidratos possuem a propensão de formar um estado vítreo por meio de interações através de ligações de hidrogênio, sendo que quanto maior o peso molecular do carboidrato maior a temperatura de transição do estado vítreo para líquido ( $T_g$ ) do citoplasma ao longo de diferentes níveis de água (Hoekstra *et al.* 2001). Uma alta  $T_g$  e baixa temperatura de transição de fase de membrana ( $T_m$ ) são estratégias benéficas que as plantas podem adotar durante a dessecação (Hoekstra & Golovina 1999). Considerando que os açúcares solúveis desempenham papéis importantes no aumento da  $T_g$ , estes fornecem diferentes graus de proteção para células desidratadas (Liu *et al.* 2008). Devido à essencialidade da água na

formação e manutenção da estrutura de bicamada das membranas celulares, a desidratação tem um grande impacto sobre a conformação das membranas. A desidratação leva a um aumento na  $T_m$  e, dependendo dos tipos de fosfolipídios envolvidos, pode evitar a formação de bicamadas (Hoekstra & Golovina 1999). A bicamada de fosfolipídios das membranas é dependente da presença de água para manutenção da sua orientação (hidrofóbico-hidrofílica) (Crowe *et al.* 1992). Em casos de desidratação, há um efeito de empacotamento e aproximação das moléculas da membrana, que leva a um aumento nas interações de Van der Waals entre as cadeias de hidrocarbonetos, passando normalmente da fase cristalina líquida para a fase de gel. Como resultado, ocorre um grande aumento na  $T_m$ , fazendo com que, por exemplo, lipídios estejam na fase de gel em temperatura ambiente, quando poderiam estar na fase cristalina líquida caso estivessem completamente hidratados (Crowe *et al.* 1992). Dissacarídeos e oligossacarídeos, que são abundantes em organismos tolerantes à dessecação, são particularmente efetivos na supressão do aumento da  $T_m$  induzido pela desidratação, através da interação com os grupos polares dos fosfolipídios das membranas. Além disso, eles previnem a fusão de membranas pela formação em tempo útil de uma matriz vítrea, a vitrificação. Ambas as propriedades são cruciais na proteção de lipossomos contra o estresse da desidratação (Hoekstra & Golovina 1999), tendo em vista que, quando estes são submetidos à desidratação, e posterior reidratação, sem a presença de açúcares, como a trealose, há um extravasamento de todos os compostos internalizados (Crowe *et al.* 1992). A  $T_m$  das membranas em organismos desidratados é mais baixa do que membranas isoladas desidratadas, provavelmente devido à interação de açúcares com os grupos polares dos fosfolipídios e a fluidização de compostos nas membranas *in situ*. Diminuições da  $T_m$  *in situ* podem ser benéficas no retardamento ou prevenção de alterações nas camadas das membranas devido à seca e a perda associada de solutos (Hoekstra & Golovina 1999). Segundo os mesmos autores, diminuições na  $T_m$ , interações dos açúcares com os



grupos polares dos fosfolipídios das membranas, bem como a formação de matrizes vítreas são fundamentais para a preservação das membranas em um estado desidratado.

Samambaias desidratadas podem absorver água primeiramente através de suas folhas, tendo em vista que o transporte de água via pecíolo é lento em boas condições de hidratação e o xilema pode estar amplamente bloqueado em folhas dessecadas. Em samambaias que apresentam folhas membranosas com pouca ou nenhuma cutícula, a absorção de água ocorre em poucos minutos, assim como uma rápida retomada na fluorescência da clorofila. Em samambaias tolerantes à dessecação, que apresentam cutícula eficiente, é provável que a absorção de água seja muito mais lenta, mas pode ser auxiliada por tricomas. Os tricomas são muito diversos em forma e função, e vários aspectos dos tricomas de samambaias xerófitas vêm sendo estudados. Muitas possuem uma densa cobertura, principalmente na face abaxial da lâmina foliar, sendo que estes tricomas podem absorvem água, e, assim, plantas dessecadas tornam-se rapidamente hidratadas após serem irrigadas ou umedecidas pela chuva e pelo orvalho, evitando-se, com isso, a necessidade de transporte de água das raízes via pecíolo até a lâmina foliar. Em bromélias epífitas com raízes escassas, tricomas escudos são essenciais para absorção de água pelas folhas e a cobertura é particularmente densa em espécies xerófitas. Existem algumas dúvidas sobre o papel dos tricomas das samambaias na absorção de água, mas eles se assemelham aos tricomas das bromélias. No entanto, a eficiência difere entre os tipos de tricomas e a sua contribuição na captação total de água é desconhecida (Hietz 2010).

Medidas de conteúdo relativo de água (CRA) em folhas são comumente utilizadas para avaliar as condições hídricas de um vegetal, tendo em vista que, o teor de água da folha é um indicador útil do balanço hídrico da planta, uma vez que expressa a quantidade relativa de água presente nos tecidos da planta (Slatyer & Taylor 1960). Medições do teor de água baseadas em massa fresca e seca de um tecido têm sido substituídas, principalmente, por medidas com base na quantidade máxima de

água que um tecido é capaz de reter (Barrs 1968). Essas medições são referidas como conteúdo relativo de água e podem ser expressas por  $CRA (\%) = [(MF-MS) / (MT-MS)] * 100$ , onde MF, MS e MT são, respectivamente, massa fresca, seca e túrgida do tecido (Barrs 1968). Apesar de simples, esta técnica precisa ser ajustada para cada material. Os ajustes relacionam-se principalmente à duração e condições ambientais do período de embebição, necessário para a obtenção da massa túrgida (Yamasaki & Dillenburg 1999).

Dentre as samambaias, *Pleopeltis* é um gênero com cerca de 20 espécies, distribuídas predominantemente na região neotropical, com algumas poucas espécies ocorrendo na África até a Índia e Sri Lanka (Tryon & Tryon 1982). No Brasil, 13 espécies são aceitas, sendo distribuídas nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (Labiak & Hirai 2012). Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Pleopeltis*, podemos citar *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston (Figura 1). É uma espécie endêmica do Brasil, pertencente ao domínio fitogeográfico da Mata Atlântica sendo distribuída nas regiões Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul (Labiak & Hirai 2012). A espécie pertence à família Polypodiaceae, ordem Polypodiales, classe Polypodiopsida segundo a classificação proposta por Smith *et al.* (2006).

Esta samambaia apresenta grande resistência ao estresse de seca (tolerância à dessecação), se mantendo viva por longos períodos de tempo. Uma densa cobertura de tricomas é comum em *Pleopeltis*, *Asplenium*, *Mohria* e vários outros grupos, muitos dos quais também aparentam ser tolerantes à dessecação. Por estas plantas frequentemente sofrerem períodos de seca, é de crítica importância à sua sobrevivência, absorver água rapidamente e restabelecer um estado ativo quando surgem condições favoráveis (Hietz 2010).



**Figura 1** - Fronde fértil de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston [imagem online - Paulo Schwirkowski (FloraRS)]. Disponível em [http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=6527](http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=6527) [Acessado 20 dezembro 2011]

Segundo Tryon & Tryon (1982), o gênero *Pleopeltis* é representado por plantas epífitas ou ocasionalmente rupícolas. As espécies do gênero apresentam caule longo rastejante, delgado, geralmente ramificado, com escamas peltadas a pseudopeltadas. As frondes são monomorfas a levemente dimorfas, agrupadas ou espaçadas entre si. Os soros são arredondados ou alongados, sem indúcio ou protegidos por escamas ao redor, com ou sem paráfises. Os esporos são elipsoidais, monoletes, com cicatriz correspondente a  $\frac{2}{3}$  a  $\frac{3}{4}$  do comprimento do esporo, apresentando superfície verrucosa (Tryon & Tryon 1982).

Devido à grande importância ecológica e escassez de pesquisas relacionadas ao estudo das samambaias epífitas da Mata Atlântica, este trabalho pretende contribuir com conhecimento na área. Várias espécies encontradas com facilidade em ambientes

tropicais, que apresentam estratégias de sobrevivência extremamente interessantes nunca foram estudadas. A fim de melhor caracterizar os mecanismos de tolerância à dessecação em samambaias, realizamos estudos de aspectos anatômicos, bioquímicos e fisiológicos associados à dessecação e reidratação de esporófitos de *Pleopeltis pleopeltifolia*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Analisar aspectos morfofisiológicos da samambaia epífita da Mata Atlântica tolerante à dessecação - *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston.

### **2.2 Objetivos específicos**

Em amostras de *Pleopeltis pleopeltifolia*:

- Analisar a ultraestrutura de esporos;
- Analisar a estrutura e a ultraestrutura de frondes;
- Determinar curva de absorção de água de frondes;
- Avaliar desidratação, reidratação e conteúdo relativo de água de frondes;
- Determinar o conteúdo de clorofilas e carotenoides em frondes;
- Avaliar a taxa de transporte de elétrons de esporófitos;
- Determinar o conteúdo de prolina em frondes;
- Determinar o conteúdo de açúcares solúveis totais em frondes.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de coleta**

Indivíduos de *Pleopeltis pleopeltifolia* foram coletados na Unidade de Conservação Ambiental Desterro (UCAD), pertencente à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A UCAD localiza-se em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, entre as coordenadas geográficas aproximadas de 27°30'48" a 27°32'34" de latitude sul e 48°29'38" a 48°30'42" de longitude oeste. Possui uma área de 491,5 hectares de Floresta Ombrófila Densa, representando 1,1% da superfície da Ilha de Santa Catarina.

#### **3.2 Espécie estudada**

Foram coletados indivíduos adultos (férteis) da espécie *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston (n=50). A espécie pertence à família Polypodiaceae, ordem Polypodiales e classe Polypodiopsida (Smith *et al.* 2006). Os indivíduos de *P. pleopeltifolia* foram transportados para casa de vegetação pertencente ao Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foram mantidos sob condições de luminosidade ambiente, com temperatura variando entre 20 °C – 30 °C, sendo irrigados regularmente. As plantas foram mantidas nestas condições para aclimação por pelo menos seis meses antes de cada experimento. Amostras do material vegetal foram herborizadas e depositadas no Herbário FLOR (UFSC, Florianópolis, SC) sob número 19.703.

#### **3.3 Acondicionamento de esporos**

Após a coleta, frondes férteis de *P. pleopeltifolia* foram colocadas em bandeja plástica sobre papel de filtro à temperatura ambiente para induzir deiscência e liberação dos esporos. Em seguida, foram separados dos esporângios através de filtragem em

papel de entretela e armazenados em frascos de vidro a  $7 \pm 1$  °C (Randi 1987).

### 3.4 Análise estrutural de esporos e frondes

Esporos armazenados em refrigeração a  $7 \pm 1$  °C foram colocadas entre lâmina e lamínula, com água, e analisados em microscópio óptico.

Para análise estrutural das frondes *in vivo*, foram realizadas secções transversais, longitudinais e paradérmicas, à mão livre, com gilete utilizando isopor como material de apoio. Estas secções foram colocadas sobre a lâmina, com água e cobertas com lamínula. Também foram realizados testes histoquímicos, utilizando-se solução de lugol para identificação amido (Jensen 1962), cloreto férrico para compostos fenólicos (Johansen 1940), Sudan IV para substâncias lipofílicas (Gerlach 1984) e floroglucinol acidificado para a lignina (Costa 1982).

A análise estrutural das frondes também foi realizada em amostras fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2, lavadas na mesma solução tampão, e desidratadas em série etílica, sendo conservadas em etanol 70° GL (Ruzin 1999). Algumas amostras foram infiltradas em uma mistura de polietilenoglicol (PEG) 1500 e álcool 70% (1:1) durante 24 horas, em estufa 60 °C. Então, foram novamente incubadas em estufa por 24 horas em PEG 1500 puro. Após este período as amostras foram emblocadas em PEG 1500. Outras amostras foram infiltradas em hidroxietilmetacrilato (*Jung's Histo-resin* – Leica®). Para isto as amostras que estavam conservadas em etanol 70° GL foram desidratadas em série etílica até 96° GL e processadas segundo as técnicas usuais do fabricante, passando por soluções de pré-infiltração e infiltração e após emblocamento foram mantidos em 40 °C, em estufa. As amostras emblocadas em PEG e em historesina foram seccionadas em micrótomo de rotação Leica RM 2125 RT, coradas com Safrablue (Bukatsh 1972) ou Azul de toluidina (O'Brien *et al.* 1965).

As lâminas preparadas com esporos e amostras de frondes foram analisadas em microscópio óptico Leica DM2500, com registros de imagens capturadas com câmera fotográfica digital (Leica DFC295) acoplada.

Para análise estrutural das frondes *in vivo* através de microscopia óptica de fluorescência, foi utilizado o microscópio Olympus BX41 com epifluorescência, sistema de iluminação de vapor de mercúrio (HBO 100) e filtros para visualização da cor azul U-MWU2 (excitação: 330 – 385 nm; emissão: 420 nm), da cor vermelha U-MWG2 (excitação: 510 – 550 nm; emissão: 590 nm), da cor verde U-MWB2 (excitação: 460 – 490 nm; emissão: 520 nm) e filtro triplo (excitação: 330 – 385 nm, 460 – 490 nm, 510 – 550 nm; emissão: 420 nm, 520 nm, 590 nm). As imagens foram capturadas com câmera fotográfica digital QColor 3C (Q-imaging).

### **3.5 Análise ultraestrutural de esporos e frondes**

Esporos armazenados em refrigeração a  $7 \pm 1$  °C foram colados em suporte de alumínio com fita de carbono dupla face.

Amostras das frondes, previamente fixadas, como referido no item 3.4, foram submetidas à desidratação total, em série etílica, e mantidas em éter etílico, por 48 horas, a  $-20$  °C. Após este período, os recipientes com as amostras foram abertos e mantidos em capela de exaustão para favorecer a evaporação total do éter. Então, as amostras foram coladas em suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face.

As preparações contendo esporos e aquelas com amostras de frondes foram metalizadas com 30 nm de ouro em metalizador Baltec, modelo CED 030. A análise e documentação das amostras serão efetivadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL JSM – 6390LV) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC).



### **3.6 Determinação da curva de absorção de água**

Fronde adultas de *P. pleopeltifolia* (n=5), completamente expandidas e de massa semelhante foram cortadas na base da raque e imersas em frascos tipo Becker contendo água destilada. As mesmas foram pesadas em intervalos determinados de tempo por um período de 20 horas, sendo mantidas sob irradiância RFA de 20  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de  $25 \pm 2$  °C. Os resultados obtidos foram ajustados a uma equação exponencial de crescimento ( $R^2$  0,98), utilizando o programa Origin, demonstrando o tempo ideal de embebição ( $T_{\text{opt}}$ ) para determinar o peso de massa túrgida da espécie em estudos de conteúdo relativo de água (CRA).

### **3.7 Desidratação, reidratação e determinação do conteúdo relativo de água (CRA)**

Indivíduos adultos de *P. Pleopeltifolia* (n=30), apresentando de 3-5 frondes, previamente aclimatados em casa de vegetação (conforme item 3.2), foram mantidos sem irrigação durante 0, 5, 10 e 15 dias, sendo utilizado n=6 de indivíduos em todos os tratamentos. A reidratação das frondes dessecadas, após o período máximo de tratamento (15 dias), foi realizada por aspersão, simulando chuva durante 1 dia, sendo também utilizado n=6.

Durante os experimentos, as plantas foram mantidas em estufa com temperatura variando entre 20 °C – 30 °C, umidade relativa entre 50 - 80% e RFA 200  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Parte dos indivíduos submetidos aos diferentes tratamentos foi utilizada para avaliações de conteúdo relativo de água durante o período de restrição hídrica e reidratação, sendo outra parte utilizada para avaliações de eficiência fotossintética e avaliações bioquímicas. Para as análises bioquímicas posteriores, amostras do material fresco de cada tratamento foram pesadas e congeladas em  $\text{N}_2$  líquido imediatamente, sendo mantido um padrão de coleta realizado no fim do período de luz.

Para a determinação do conteúdo relativo de água, após cada tratamento, as frondes (n= 5) foram cortadas na base da raque e imediatamente pesadas para obtenção de peso de massa fresca. Então, foram colocadas em frascos tipo Becker contendo água destilada durante 151 minutos em bancada de laboratório sob irradiância RFA de 20  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de  $25 \pm 2$  °C para mensuração de peso de massa túrgida. Finalmente, as frondes foram secas em estufa à temperatura de 60 °C durante 24 horas para obtenção de peso de massa seca.

O conteúdo relativo de água (CRA) das frondes foi mensurado em cada tratamento, durante o curso de tempo da dessecação e reidratação, sendo calculado de acordo com a equação proposta por Barrs (1968):

$$\text{CRA} = [(\text{MF} - \text{MS}) / (\text{MT} - \text{MS})] * 100,$$

onde MF, MS e MT são massa fresca, seca e túrgida, respectivamente.

### **3.8 Determinação do conteúdo de clorofilas e carotenoides**

Para determinação do conteúdo de clorofilas e carotenoides de esporófitos de *P. pleopeltifolia*, submetidos a diferentes períodos de restrição hídrica e de reidratação, conforme descrito no item 3.7, foram retiradas amostras de 0,2 g de frondes provenientes de cada tratamento. As nervuras e eventuais danos presentes nas frondes foram desprezados, sendo as amostras pesadas e imediatamente congeladas em N<sub>2</sub>. A extração e quantificação dos pigmentos fotossintéticos foram realizadas segundo Lichtenthaler (1987). Para extração, amostras foliares de 0,2 g foram homogeneizadas em 10 ml de solução de acetona 80% (v/v) e, em seguida, os homogeneizados centrifugados durante 8 minutos a 3.500 g. Para quantificação, foram realizadas leituras de absorbância em espectrofotômetro (Biospectro, SP-220), em 470 nm, 646 nm e 663 nm. A partir destas leituras, foram calculados os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, segundo as equações (1), (2) e (3), respectivamente:

$$\text{Clorofila } a = 12,21 * A663 - 2,81 * A646 \text{ (1)}$$

$$\text{Clorofila } b = 20,13 * A646 - 5,03 * A663 \text{ (2)}$$

$$\text{Carotenoides} = (1000 * A470 - 3,27 * Ca - 104 * Cb) / 198 \text{ (3)}$$

Os ensaios foram realizados em triplicatas, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  MS.

### **3.9 Avaliação da taxa de transporte de elétrons de esporófitos**

A detecção da fluorescência da clorofila *a* dos esporófitos de *P. pleopeltifolia* foi mensurada com auxílio de fluorímetro de pulso com amplitude modulada (Diving PAM, Underwater Fluorometer; Walz, Effeltrich, Germany), equipado com fibra óptica de 5,5 mm de diâmetro e díodo azul (470 nm) como fonte de luz. O Diving PAM utiliza grampos magnéticos para fornecer suporte às folhas, posicionado cerca de um 1,0 mm a partir da extremidade do feixe de luz. Os parâmetros do PAM (ETR) foram calculados utilizando o software WINCONTROL (V.3.18) (WALZ, Germany), usando a configuração padrão para curva rápida de luz (RLC) (Walz, Effeltrich, Germany) (Genty *et al.* 1989). O fator padrão de absortância (0,84) e o valor padrão (0,50) para a absorção estimada de luz pelo PSI e PSII foram utilizados para calcular a taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) (Schreiber *et al.* 1995).

Para todos os tratamentos de desidratação e reidratação, aos quais os esporófitos adultos foram submetidos, conforme descrito no item 3.7, os mesmos foram previamente adaptados por 30 minutos ao escuro. Os experimentos foram realizados em triplicatas (n=3), sendo que quatro curvas rápidas de luz foram feitas em amostras independentes de cada um dos tratamentos realizados, totalizando doze curvas por tratamento. 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 ( $0\text{--}2200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  RFA).

Os valores de ETR foram representados como curvas rápidas de luz (RLC's) (P) *versus* (E), onde (P) é a fotossíntese medida como ETR e (E) é a respectiva irradiância utilizada durante os pulsos. Ambos os parâmetros foram plotados em uma equação do tipo *Waiting-in-Line* ( $Y = x \cdot e^{-x}$ ) através de uma macro de Excel (Microsoft Office Excel – 2010) (Ritchie, 2008). O modelo empírico para P (ETR) *versus* E (irradiância) foi inicialmente empregado por Gloag *et al.* (2007), utilizando uma forma adequada para a modelagem da fotossíntese ( $P = A \cdot k_w \cdot E \cdot e^{-k_w \cdot E}$ ). A partir desta equação, foi possível obter a taxa de transporte de elétrons máxima ( $P_{\max}$ ). A  $P_{\max}$  ocorre em um valor de irradiância de  $1/k_w$ , chamado de irradiância ótima ( $E_{\text{optimum}}$ ). Outro parâmetro obtido através da equação da fotossíntese é o Alfa ( $\alpha$ ), que corresponde ao ângulo formado no início da curva rápida de luz ( $\alpha = P_{\max} \cdot e \cdot k_w$ ), é dado como a eficiência no transporte de elétrons (Maxwell & Johnson 2000). Os valores ajustados para constantes (A) e ( $k_w$ ) foram determinados utilizando a equação descrita por Gloag *et al.* (2007).

### 3.10 Determinação do conteúdo de prolina

A extração de prolina foi realizada segundo Bates *et al.* (1973). Amostras de 0,5 g de frondes, provenientes dos tratamentos de restrição hídrica e reidratação, conforme descrito no item 3.7, foram maceradas e homogeneizadas em 10 ml de ácido sulfosalicílico aquoso 3%. Em seguida, os homogeneizados foram filtrados em papel filtro, sendo coletados 2 ml do filtrado e a estes adicionados 2 ml de ninhidrina ácida e 2 ml de ácido acético glacial (Grunden *et al.* 2001). A solução foi mantida a  $100^\circ\text{C}$  durante 1 hora, seguida por banho de gelo. Então foram adicionados 4 ml de tolueno à solução e esta foi mantida sob agitação vigorosa. A fase contendo tolueno foi removida da fase aquosa através de micropipeta e mantida em temperatura

ambiente. Os ensaios foram realizados em triplicatas, a quantificação do material realizada em espectrofotômetro (Biospectro, SP-220), em 515 nm, sendo utilizado o coeficiente de absorção molar para o complexo prolina-ninhidrina  $4.570 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , e os resultados expressos em  $\mu\text{g g}^{-1} \text{ MS}$  (Grunden *et al.* 2001).

### **3.11 Determinação do conteúdo de açúcares solúveis totais**

A extração de açúcares solúveis totais foi realizada segundo Bielecki & Turner (1966). Amostras de 100 mg de frondes, provenientes de cada tratamento de restrição hídrica e reidratação, conforme descrito no item 3.7, foram maceradas e homogeneizadas em 10 ml de MCA (metanol, clorofórmio e água) na proporção 12:5:3 (v/v), respectivamente, seguido por centrifugação a 3500 g por 5 minutos, sendo coletada uma alíquota de 4 ml do sobrenadante. Então, foram adicionados a esta alíquota 1,5 ml de água destilada e 1,0 ml de clorofórmio, sendo o ensaio foi centrifugado a 3500 g por 5 minutos. Alíquotas de 0,5 ml do volume final da fase aquosa foram retiradas e acrescidas de 1,0 ml de antrona (Morris 1948), sendo mantidas a  $100^\circ \text{C}$  durante 3 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicatas, a quantificação do material realizada em espectrofotômetro (Biospectro, SP-220) em 620 nm, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{g g}^{-1} \text{ MS}$

A concentração de açúcares solúveis totais foi obtida a partir de curva padrão de glicose, sendo utilizadas as concentrações: 0, 20, 40, 60, 80 e  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Alíquotas de 0,5 ml destas amostras foram retiradas e adicionadas a 1,0 ml de antrona (Morris 1948), sendo mantidas a  $100^\circ \text{C}$  durante 3 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Biospectro, SP-220) em 620 nm.

### **3.12 Análise estatística dos dados**

Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação de médias (Tukey 5%), quando os dados apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas. No caso de dados que não apresentaram normalidade ou homogeneidade de variâncias, mesmo após transformação angular, a análise de variância foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $H$ ) seguido de teste de Dunn (Zar 1996).

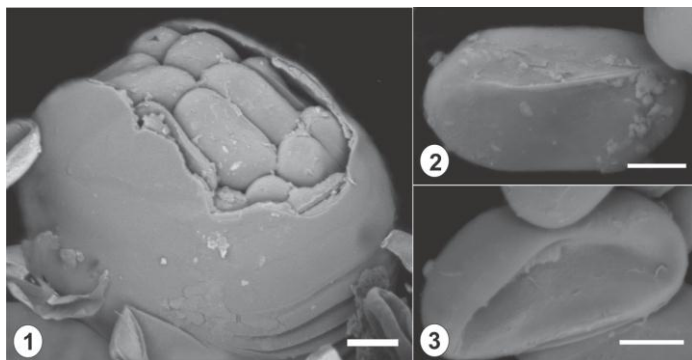
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ultraestrutura de esporos

No interior dos esporângios de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Fig. 1.1) encontram-se esporos do tipo monolete, com forma elipsoidal, com aproximadamente 45  $\mu\text{m}$  de comprimento, mostrando conspícua cicatriz na superfície convexa; quando em vista proximal (Fig. 1.2), a superfície distal é côncava (Fig. 1.3). O tipo monolete também foi registrado para outras espécies do gênero *Pleopeltis*, como em *P. macrocarpa* (Polypodiaceae) (Giudice *et al.* 2004) e em *P. lepidopteris* (Polypodiaceae) (Viviani *et al.* 2009). Erdtman (1952) referiu que a cicatriz que ocorre na superfície convexa do esporo, com aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de comprimento em *P. pleopeltifolia*, é uma característica de esporos monoletes. Esporos monoletes em forma de feijão são comumente encontrados nas ordens mais recentemente derivadas das samambaias, como Polypodiales (Sharpe *et al.* 2010). Em *P. Pleopeltifolia* este aspecto é evidenciado e resulta da concavidade da superfície distal. Os esporos da espécie estudada são de tamanho médio, pois conforme Erdtman (1952), quando apresentam de 25-50  $\mu\text{m}$ , baseado no comprimento do maior eixo do esporo, são considerados de tamanho médio.

O perisporo de *P. pleopeltifolia* tem superfície lisa, embora encontram-se algumas deposições irregulares, tendendo a globulares na superfície proximal (Fig. 1.2). Segundo Tryon & Tryon (1982), os esporos do gênero *Pleopeltis* são geralmente papilados. Os dados para *P. pleopeltifolia* diferem disto, embora Viviani *et al.* (2009) descrevem os esporos de *P. lepidopteris* como apresentando, parcialmente, a superfície do perisporo papilado-granulado, com glóbulos de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro, dispersos ou densamente agrupados. Giudice *et al.* (2004) também não mencionam perisporo papilado em *P. macrocarpa*, citando e ilustrando em eletromicrografias a

presença de glóbulos de tamanhos diferentes na superfície do perisporo, como constatado aqui para *P. pleopeltifolia*.



**Figura 2** – *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston. Microscopia eletrônica de varredura. **1.** Aspecto geral de esporos no interior de microesporângio aberto. **2.** Vista proximal do esporo monolete, face convexa e forma elipsoidal, com cicatriz (seta preta) saliente no centro. Depósitos irregulares (seta branca) na superfície do perisporo. **3.** Vista distal do esporo com superfície côncava. Barras – 1. 20  $\mu\text{m}$ ; 2-3. 10  $\mu\text{m}$ .

## 4.2 Morfoanatomia de fronde de esporófitos

As frondes de *P. pleopeltifolia* são dorsiventrais (Fig. 3.1 e 3.2), com epiderme uniestratificada (Fig. 3.3), mesofilo (Fig. 3.2) constituído por parênquima tendendo ao paliçádico biestratificado, adaxialmente, e parênquima esponjoso, abaxialmente. Parênquimas paliçádico e esponjoso são referidos por Ferrari (2009) para outras espécies de *Pleopeltis*, mas Viviani *et al.* (2009) refere a presença de parênquima tendendo à paliçádico, como na espécie em estudo, por não apresentarem a típica estrutura de células alongadas e justapostas. Entre as samambaias analisadas por Hietz & Briones (1998), pertencentes



aos gêneros *Asplenium*, *Elaphoglossum*, *Polypodium*, *Phlebodium*, *Trichomanes* e *Pleopeltis*, nenhuma apresentou hipoderme ou algum tecido específico para reserva de água. Este fato também foi verificado na espécie em estudo, entretanto as células do clorênquima, bem como as epidérmicas podem conter vacúolos com reserva hídrica, contudo, como não são especializadas nesta função, facilmente perdem água, advindo disto a murcha, mas também podem facilmente reidratar-se. A cutícula, na face adaxial, é conspícua (Fig. 3.3), o que assegura melhor controle no equilíbrio hídrico interno. Ferrari (2009) registrou paredes celulares periclinais espessas na face adaxial de outras duas espécies de *Pleopeltis*, *P. hirsutissima* (Polypodiaceae) e *P. macrocarpa* (Polypodiaceae), que também desempenhariam função similar, porém a presença da cutina torna mais eficiente a barreira para restringir a perda de água. Alta resistência cuticular previne, não somente a perda de água, mas também a absorção da mesma, e, assim, pode não ser um recurso totalmente positivo tendo em vista que as folhas são frequentemente umedecidas pela neblina (Hietz & Briones 1998). Em samambaias com alta resistência cuticular contra perda de água, como *Elaphoglossum glaucum* (Dryopteridaceae) e *Phlebodium areolatum* (Polypodiaceae), a absorção de água por esta via é insignificante (Hietz & Briones 1998).

A raque é sustentada por amplo tecido subepidérmico, constituído por fibras (Fig. 3.3), presente em ambas as faces (Fig. 3.1). Adjacente a estas fibras encontram-se células parênquimáticas (Fig. 3.4), as quais são clorofiladas (Fig. 3.1). A microscopia utilizando fluorescência Fig. 3.5 (Filtro triplo - excitação: 330 – 385 nm, 460 – 490 nm, 510 – 550 nm; emissão: 420 nm, 520 nm, 590 nm) e 3.6 (Filtro azul - excitação: 330 – 385 nm; emissão: 420 nm) confirmou a presença de cloroplastos neste parênquima (cor vermelha) e lignina nas fibras (cor verde – Fig. 3.5 e cor azul – Fig. 3.6). As paredes celulares destas fibras, além da grande quantidade de pontoações, apresentam-se lignificadas apenas nas camadas mais externas da parede celular, sendo que as camadas mais internas são somente celulósicas, caracterizando o

tipo de fibras denominado de gelatinosas. No bordo foliar (Fig. 3.7) também há a presença de fibras subepidermicamente. Na porção mais interna do córtex da raque encontra-se um estrato constituído por células de paredes mostrando conspícuo espessamento em forma de “U” (Fig. 3.1), contendo compostos fenólicos. A camada mais interna do córtex, a endoderme, é pouco evidente na microscopia óptica convencional, por ser constituída por células achatadas radialmente e de paredes muito delgadas (Fig. 3.8). Entretanto, com o recurso da microscopia de fluorescência, as estrias de Caspary tornam-se facilmente visíveis em decorrência da presença de suberina que é autofluorescente (Fig. 3.5). Assim, verifica-se que o espessamento em “U” corresponde ao tecido adjacente à endoderme (Fig. 3.9). O meristelo (Fig. 3.5) é delimitado externamente por periciclo, com um ou dois estratos celulares (Fig. 3.8), contendo uma estrutura vascular concêntrica, do tipo anficrival. O xilema, posicionado internamente ao floema, tem a forma geralmente em “V” pouco acentuado, por vezes plano, e mostra elementos traqueais de metaxilema em posição central, e de protoxilema em posição lateral (Fig. 3.8).

Em *P. hirsutissima*, na região da nervura mediana da lâmina foliar, o feixe vascular é envolvido pelo periciclo, pela endoderme, cujas células apresentam estrias de Caspary e por células parenquimáticas de paredes espessadas (Ferrari 2009). Em *P. macrocarpa*, o feixe vascular é anficrival, com xilema em forma de “V” e periciclo com uma a duas camadas de células; a endoderme, muitas vezes não íntegra, está envolvida por células parenquimáticas com conteúdo fenólico (Ferrari 2009). Em *Campyloneurum repens* (Polypodiaceae) o sistema vascular da lâmina foliar na região da nervura mediana é representado por um feixe anficrival, delimitado pelo periciclo, com uma a duas camadas de células e circundado pela endoderme, com estrias de Caspary (Ferrari 2009). O xilema, em forma de “V”, apresenta três polos de protoxilema (Ferrari 2009).

As células epidérmicas apresentam formas variadas, tendendo ao alongamento (Fig. 4.1) no sentido longitudinal da fronde. As

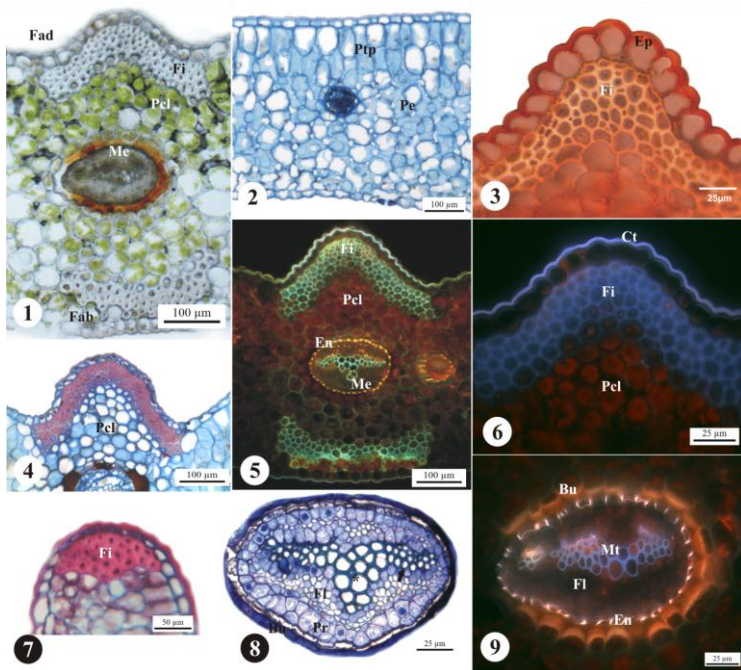
paredes celulares anticlinais são sinuosas (Fig. 4.2 e 4.3) e as periclinais convexas (Fig. 4.1 e 4.3). Paredes celulares anticlinais sinuosas têm sido referidas em espécies do gênero *Pleopeltis*, como em *P. macrocarpa* e *P. hirsutíssima* (Ferrari 2009). Em *Pleopeltis lepidopteris* (Polypodiaceae) foram observadas paredes anticlinais sinuosas em ambas as faces da lâmina foliar (Viviani *et al.* 2009). Segundo Krauss (1949), as sinuosidades representam adaptações mecânicas, evitando o colapso celular durante os movimentos de expansão e contração da folha pela entrada e saída de água. Em espécies do gênero *Tillandsia*, que geralmente ocupam ambientes com fornecimento descontínuo de água e nutrientes, foi sugerido que a sinuosidade poderia auxiliar em um suporte mecânico evitando murchamento (Scatena & Segecin 2005). Portanto, esta sinuosidade das paredes anticlinais das células epidérmicas da fronde podem exercer um papel importante na capacidade que esta espécie apresenta de desidratar-se em períodos de carência hídrica e retornar a vitalidade estrutural-funcional quando há disponibilidade de água.

Os estômatos (Fig. 4.3 e 4.4) estão restritos a face abaxial, sendo do tipo anomocítico (Fig. 4.5) e posicionados no mesmo nível das demais células epidérmicas. Estômatos anomocítico também foram registrados em outras espécies de *Pleopeltis*, como em *P. macrocarpa* e *P. hirsutíssima* (Ferrari 2009), assim como observado em *P. lepidopteris* (Viviani *et al.* 2009). No estudo realizado com oito espécies de samambaias pertencentes aos gêneros *Asplenium*, *Elaphoglossum*, *Polypodium*, *Phlebodium*, *Trichomanes* e *Pleopeltis*, por Hietz & Briones (1998) foi evidenciado que os estômatos de todas as espécies não estão posicionados acima da epiderme circundante ou afundados na mesma, correspondendo ao observado na espécie em estudo. Entretanto, em *P. pleopeltifolia*, o estômato na figura 4.4 mostra o poro na forma de fenda com cerca de 4  $\mu\text{m}$  de abertura (sentido perpendicular à fenda), enquanto os estômatos na figura 4.5 mostram poros com cerca de 11  $\mu\text{m}$  de abertura. Esta diferença não se relaciona com o momento fisiológico da abertura estomática e sim com o plano de observação da estrutura. A

eletromicrografia registra a superfície cuticular, transparente na fotomicrografia, portanto em 4.4 é registrada a imagem mais superficial do poro, enquanto a 4.5 mostra um plano mais interno a esta, o que confirma a presença de um átrio externo ao ostíolo. Esta evidência, que não pode ser constatada em secções transversais pelas dificuldades técnicas de preparo e observação das amostras, é de grande relevância, uma vez que a presença deste átrio externo tem sido interpretada na literatura como característica xeromorfa, restringindo a transpiração (Eames & Mac Daniels 1947; Fahn & Cutler 1992), pois cria um microclima de teor de umidade intermediário entre o ambiente interno e externo.

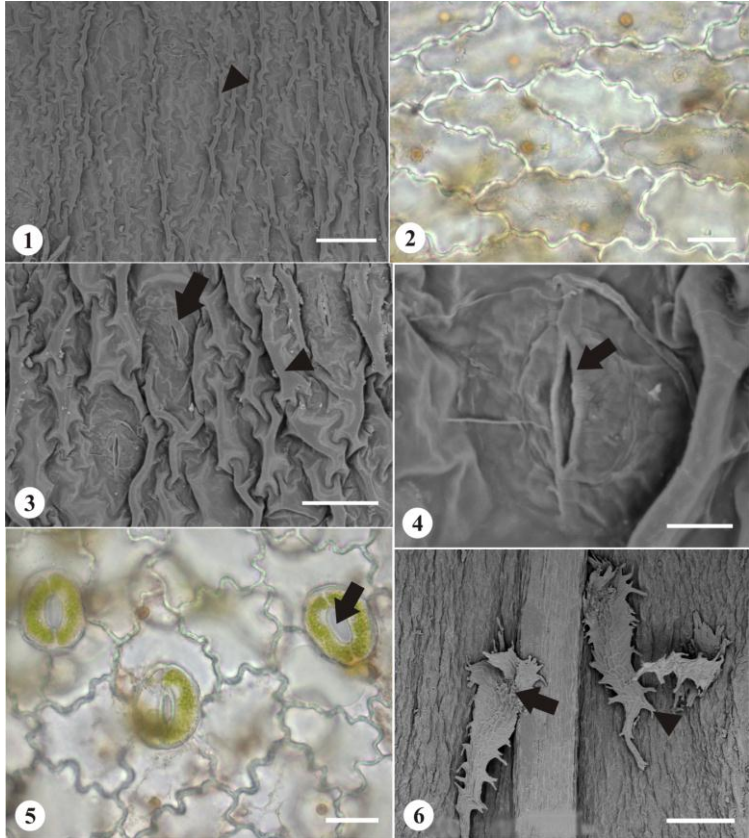
Em ambas as faces da fronde de *P. pleopeltifolia* ocorrem tricomas do tipo escamas (Fig. 4.6), constituídos por um pedúnculo curto, perpendicular a superfície epidérmica, do qual se expande uma escama peltada, porém de forma alongada, com afilamento em direção a uma extremidade; as bordas desta escama mostram projeções irregulares. Ogura (1972) relata que os tricomas das Polypodiaceae podem apresentar-se na forma de escamas e pelos, sendo importantes na identificação taxonômica. Segundo o autor, os pelos são geralmente filiformes, consistem de uma ou mais células e podem ramificar-se; enquanto as escamas são geralmente planas ou achatadas e grandes, constituídas por numerosas células. Viviani *et al.* (2009), analisando a morfoanatomia de frondes de esporófitos jovens de *P. lepidopteris*, constataram a presença de escamas em ambas as faces da lâmina foliar. Ranal (1993) analisou o desenvolvimento de *P. hirsutissima* e constatou que esporófitos jovens apresentam escamas em ambas as faces, que se caracterizam como deltoides basipeltadas e com margem ligeiramente denteada. Já de acordo com Labiak & Prado (1998), esporófitos de *P. hirsutissima* apresentam lâmina foliar revestida por escamas filiformes de base larga, margem hialina e ciliada. Strehl & Miranda (1997) também descreveram escamas de *P. hirsutissima* do tipo peltado, não glandular, com base alargada e ápice unisseriado.

Tem sido demonstrada a contribuição de tricomas foliares na absorção de água, principalmente em espécies com alta resistência cuticular, mesmo que a sua estrutura não seja tão desenvolvida como a dos tricomas das bromélias (Hietz & Briones 1998). Os autores acrescentam que os tricomas derivaram independentemente em bromélias e samambaias, sendo um método importante para a absorção de água em epífitas. Escamas similares às encontradas nas bromélias, já foram descritas para espécies das famílias Dryopteridaceae (*Elaphoglossum petiolatum*) e Polypodiaceae (*Pleopeltis astrolepis*, *P. mexicana*, *Polypodium hirsutissimum* e *P. squalidum*) (Hietz & Briones 1998). Os mesmos autores relatam que, em *Polypodium puberulum* (Polypodiaceae), uma densa cobertura de tricomas na face adaxial da lâmina foliar retém uma película de água, aumentando o período no qual água líquida pode ser absorvida. Em *Pleopeltis polypodioides* (Polypodiaceae), uma gota de água colocada sobre a superfície foliar coberta por tricomas propaga-se rapidamente por capilaridade atingindo extensa área entre as células do escudo e epidérmicas (Hietz 2010). Assim, na epífita *P. pleopeltifolia*, estas escamas podem estar desempenhando função relevante na reidratação das frondes quando há disponibilidade hídrica.



**Figura 3** - Secções transversais de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston, em microscopia óptica convencional (**1-4** e **7-8**) e de fluorescência (**5-6** e **9**). **1, 3**. Aspecto geral da raque. **2**. Lâmina foliar destacando os tecidos do mesofilo, delimitados por epiderme uniestratificada. **3, 4** e **6**. Tecidos adaxiais da raque. Note em **3** a diferença dos diâmetros do lume celular, confirmando tratar-se de fibras. **5**. (Filtro triplo - excitação: 330 – 385 nm, 460 – 490 nm, 510 – 550 nm; emissão: 420 nm, 520 nm, 590 nm) e **6**. (Filtro azul - excitação: 330 – 385 nm; emissão: 420 nm) Fluorescência evidenciando os cloroplastos (vermelho) e lignina e cutina (verde/azul). Em **5**, a endoderme, conspícua devido à fluorescência da suberina, contornando o meristelo. **7**. Bordo da fronde com tecido de sustentação, subepidérmico. **8** e **9**. (Filtro azul - excitação: 330 – 385 nm; emissão: 420 nm) Detalhe do meristelo, envolvido por endoderme (cabeça de seta) e estrato de células com espessamento em “U”. Em **8**., note periciclo uni ou biestratificado e xilema em forma de “V” (metaxilema central - \*; protoxilema nas

extremidades – seta). Em 9, destaca-se a fluorescência das estrias de Caspary na endoderme. Legenda: Bu - bainha de células com espessamento em “U”; Ct - cutícula; En - endoderme; Ep - epiderme; Fab - face abaxial; Fad – face adaxial; Fi – fibras; Fl - floema; Me - meristelo; Pcl - parênquima clorofilado; Pe - parênquima esponjoso; Pr - periciclo; Ptp - parênquima tendendo ao paliçádico.



**Figura 4** - Vistas frontais da superfície epidérmica de fronde de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston, em microscopia eletrônica de varredura (1, 3, 4 e 6) e microscopia óptica (2 e 5). 1, 2. Face adaxial,

note células com paredes anticliniais sinuosas e pericliniais (1) convexas (cabeça de seta); destituída de estômatos. **3.** Face abaxial, paredes celulares anticliniais sinuosas e pericliniais convexas (cabeça de seta); estômatos (seta) presentes. **4.** Detalhe de estômato, note poro em fenda (seta). **5.** Face abaxial, poro estomático parecendo mais amplo decorrente do plano de observação, interno à superfície cuticular (4. mostra vista mais superficial, indicando que há presença de um átrio externo, entre poro e ostíolo, característica xeromorfa). **6.** Superfície abaxial evidenciando os tricomas em forma de escamas, note a forma alongada a partir da base (seta) e bordas com projeções (cabeça de seta). Barras – 1. 100µm; 2. 25 µm; 3. 50 µm; 4. 10 µm; 5. 25 µm; 6. 200 µm.

### 4.3 Curva de absorção de água

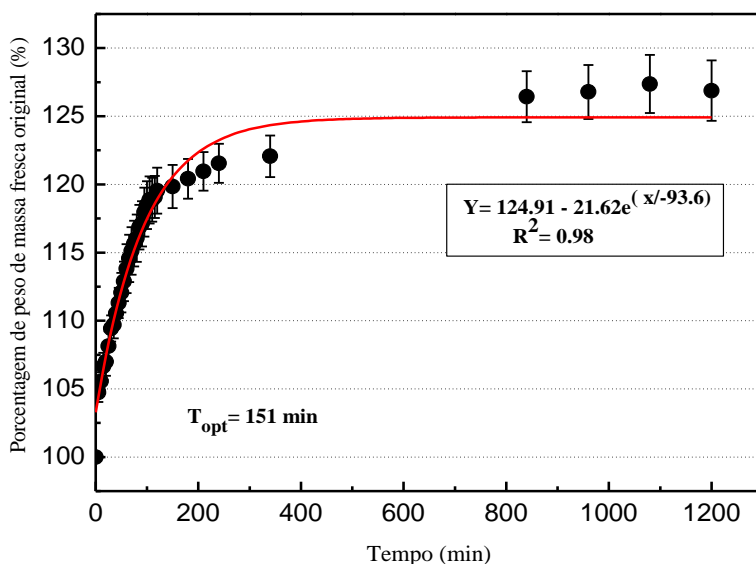
O tempo ideal de embebição ( $T_{opt}$ ) para determinação do peso de massa túrgida de frondes de *P. pleopeltifolia* em estudos de conteúdo relativo de água (CRA) é de 151 minutos. Durante este tempo, as plantas apresentaram um aumento médio de 19,8% ( $p < 0,0001$ ) no conteúdo de água, partindo de valores médios de peso de massa fresca de  $3,3 \pm 0,1$  g atingindo até  $3,9 \pm 0,15$  g de peso de massa túrgida.

Medidas de peso de massa túrgida representam um passo crítico para obtenção de bons dados de CRA, tendo em vista que apesar de simples, esta técnica precisa ser ajustada para cada material. Os ajustes relacionam-se principalmente à duração e condições ambientais do período de embebição, necessários para a obtenção do peso de massa túrgida (Yamasaki & Dillenburg 1999).

Segundo Barrs & Weatherley (1962), curvas de absorção de água de folhas embebidas parecem ser divididas em duas fases distintas: uma absorção inicial rápida durante as primeiras horas de embebição (Fase I), seguida por uma absorção lenta e constante que perdura enquanto o tecido permanece embebido (Fase II). Foi sugerido por Weatherley (1950), que a primeira fase



representa a absorção de água em resposta ao déficit hídrico no tecido, enquanto que a fase lenta e persistente é devida ao crescimento dos discos/folhas. Com isso, curvas de absorção de água devem ser plotadas a fim de identificar o período de tempo onde a fase I termina. Uma clara distinção entre as fases I e II foi facilmente observada na curva plotada para *P. pleopeltifolia*, sendo que o tempo obtido de 151 minutos representa a fase de absorção inicial rápida proposta por Barrs & Weatherley (1962).



**Figura 5** - Alterações na porcentagem de peso de massa fresca de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston imersas em água destilada por um período de 20 horas sob irradiância RFA  $20 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os valores representam m\u00e9dias para  $n = 5$ .

#### 4.4 Desidratação, reidratação e conteúdo relativo de água (CRA)

Partindo de um conteúdo relativo de água (CRA) inicial médio de 85,83%, os indivíduos de *P. pleopeltifolia* apresentaram um declínio acentuado no conteúdo de água quando mantidas sem irrigação (Fig. 6), além do evidente murchamento e enrolamento foliar (Fig. 7). Em apenas cinco dias ocorreu uma redução significativa de 83,1% no conteúdo de água, passando para um CRA médio de 14,5%. Após este período inicial, as plantas passaram para um estado estável de seca sendo mantida uma média de 12,9% de CRA aos dez dias de desidratação e 9,6% aos quinze dias, não havendo diferenças significativas. Durante o tratamento de reidratação, em apenas um dia as plantas reidrataram totalmente, atingindo um CRA médio de 87,8%, sendo que as frondes recuperaram sua morfologia original, como a observada em frondes hidratadas.

Testes preliminares demonstraram maior eficiência na reidratação quando as plantas desidratadas foram irrigadas por aspersão, simulando chuva, sendo mantidas em ambientes com alta umidade relativa, em torno de 90%. A irrigação realizada somente no sistema radicular não se mostrou eficiente para a reidratação das mesmas. Estes dados demonstram a provável importância dos tricomas escamiformes encontrados em ambas as faces da lâmina foliar de *P. pleopeltifolia*, como descrito no item 4.2, na absorção de água, tendo em vista que, como a espécie apresenta cutícula conspícua, a absorção por esta via seria insignificante durante o tratamento de reidratação.

Segundo Hietz (2010), a tolerância à dessecação se refere à habilidade para sobreviver a uma perda quase total de água nos tecidos: cerca de 90% do conteúdo de água de uma folha, conforme observado em *P. pleopeltifolia*. Neste teor de água, o tecido da planta pode estar em equilíbrio com a umidade relativa do ambiente, não havendo mais perda de água a menos que o ar fique ainda mais seco ou quente (Hietz 2010), justificando as

pequenas oscilações não significativas ocorridas no CRA durante os cinco, dez e quinze dias de tratamento de desidratação.

O CRA é considerado uma forma satisfatória para relacionar o status hídrico celular com o metabolismo, sendo um indicador facilmente mensurável, robusto para comparações de tecidos e espécies, que “normaliza” o conteúdo de água ao expressá-lo em relação ao estado totalmente túrgido (hidratado). CRA é uma medida de mudança relativa do volume celular, enquanto que o potencial hídrico é resultado do turgor celular e do potencial osmótico, e, portanto, depende da concentração de solutos e rigidez da parede celular, não sendo diretamente relacionado com o volume celular (Lawlor & Cornic 2002).

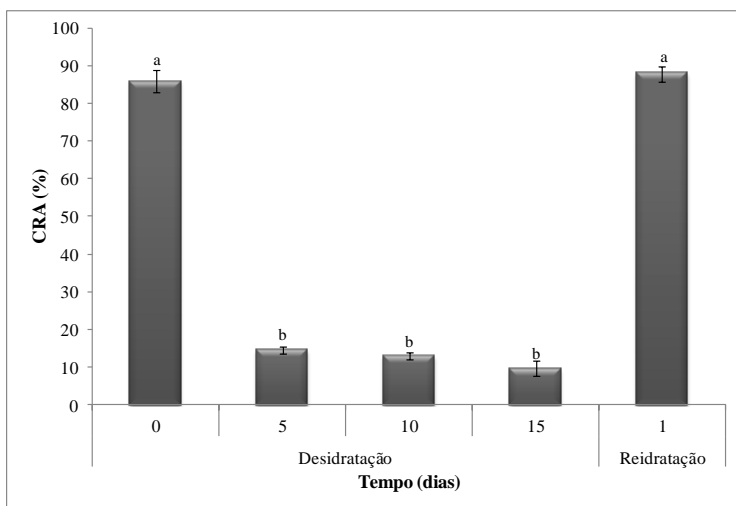
*Pleopeltis* é um gênero com proporções relativamente altas de espécies tolerantes à dessecação, já sendo descritas aproximadamente nove espécies (Hietz 2010). Plantas deste gênero não sobrevivem à dessecação total, mas algumas espécies demonstram tolerar déficits hídricos muito elevados, enrolando-se quando secas e desenrolando mediante reidratação (Hietz & Briones 1998), como a espécie estudada *P. pleopeltifolia*.

Durante treze dias de tratamento de desidratação, o CRA de folhas da espécie poiquiloídrica *Ramonda serbica* (Gesneriaceae) decaiu continuamente de 98% em plantas completamente hidratadas para 4% em plantas desseccadas, sendo que o CRA da espécie mostrou um declínio notável especialmente nos seis primeiros dias de tratamento. Durante o tratamento de reidratação, indivíduos de *R. serbica* recuperaram seu conteúdo de água, chegando a um CRA de 95% após 72 horas. Esta angiosperma herbácea pertence ao grupo das plantas que ressuscitam, sendo capazes de resistir à dessecação, mesmo durante meses, utilizando mecanismos morfológicos e fisiológicos para abrandar e controlar a perda de água (Zivkovic *et al.* 2005). O declínio do CRA foi facilmente perceptível em *P. pleopeltifolia* em apenas cinco dias de tratamento, similar aos dados obtidos para *R. serbica*. No entanto, foram necessárias apenas 24 horas para recuperação do CRA de *P. pleopeltifolia*.

Indivíduos de *Selaginella tamariscina* (Selaginellaceae), em estudos de desidratação, sobreviveram a sete dias de seca, e retornaram a uma condição normal após 12 horas da reidratação. A diminuição gradual no conteúdo de água da espécie, após o início da desidratação, levou ao murchamento e enrolamento das frondes (Wang *et al.* 2010), assim como o observado em *P. pleopeltifolia*.

Tratamentos experimentais realizados com sete samambaias epífitas demonstraram diferentes níveis de dessecação, que variam de acordo com as estratégias hídricas de cada espécie. Dentre as espécies, *Pleopeltis mexicana* (Polypodiaceae) e *Polypodium plebeium* (Polypodiaceae) demonstraram fortes quedas nos conteúdos relativos de água (Tausz *et al.* 2001). Segundo os mesmos autores, não foram conduzidos estudos detalhados sobre o grau de dessecação ao qual *P. plebeium* e *P. mexicana* podem sobreviver, mas sugerem que as espécies provavelmente pertencem ao grupo das tolerantes à dessecação.

Estudos realizados com a samambaia *Mohria caffrorum* (Mohriaceae) mostram que plantas coletadas durante a estação de seca desidrataram mais lentamente do que as coletadas durante a estação chuvosa, sendo que ambas apresentaram um CRA inicial aproximado de 90% chegando a cerca de 10% durante o curso de tempo da desidratação. Entretanto, durante a reidratação as plantas coletadas durante a estação de seca reidrataram totalmente, atingindo valores de CRA semelhantes e até superiores ao CRA inicial, enquanto que as coletadas durante a estação chuvosa não conseguiram atingir valores superiores a 20% do seu CRA da desidratação. Com isso, as plantas coletadas durante a estação de seca foram consideradas tolerantes à dessecação, enquanto as coletadas durante a estação chuvosa, consideradas sensíveis à dessecação (Farrant *et al.* 2009). Estes resultados corroboram com os obtidos para *P. pleopeltifolia*, sendo que a mesma apresentou o mesmo comportamento que as plantas coletadas durante a estação de seca, confirmando o caráter de tolerância à dessecação para a espécie.



**Figura 6** - Conteúdo relativo de água (CRA) de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston submetidas aos tratamentos de desidratação (0, 5 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia). Os valores são médias para n = 5. Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes (ANOVA seguida por teste de Tukey  $p > 0,05$ ). Barras representam o desvio padrão.



**Figura 7** – Indivíduos de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston. **1.** Planta hidratada (Conteúdo relativo de água médio - 85,83%) **2.** Planta desidratada (Conteúdo relativo de água médio - 9,6%)

#### **4.5 Conteúdo de clorofilas e carotenoides**

Durante os cinco dias iniciais dos tratamentos de seca, ocorreram decréscimos significativos tanto nos conteúdos de clorofila *a* e clorofila *b* (Fig. 8), bem como, no conteúdo de clorofilas totais (Fig. 9). Todavia, as razões de clorofila *a/b* mantiveram-se estáveis durante a desidratação e reidratação, não havendo diferenças significativas (Fig. 10). O conteúdo de carotenoides diminuiu significativamente durante os tratamentos de desidratação (Fig. 11) Entre o quinto e o décimo quinto dia de dessecação, ocorreram pequenas variações não significativas no conteúdo relativo de água, como descrito no item 4.4. Durante este período os conteúdos de clorofilas e carotenoides também

não foram alterados. Na reidratação, ocorreu uma recuperação parcial no conteúdo de clorofilas e carotenoides, atingindo 158% e 305% de aumento, respectivamente, em relação aos quinze dias de tratamento de desidratação, em apenas um dia.

Segundo Tuba *et al.* (1998), plantas tolerantes à dessecação podem ser divididas em dois grupos: homeoclorofiladas e poiquiloclorofiladas. As homeoclorofiladas preservam o conteúdo de clorofilas durante a dessecação, enquanto que em poiquiloclorofiladas, a dessecação resulta em perdas de clorofilas e tilacóides, que devem ser resintetizados após a reidratação (Gaff 1977; Bewley 1979; Csintalan *et al.* 1996; Tuba *et al.* 1993; Tuba *et al.* 1998).

Em estudos realizados com *Xerophyta viscosa* (Velloziaceae), uma espécie poiquiloclorofilada, foram observadas diminuições tanto no conteúdo de clorofilas como no de carotenoides, durante tratamentos de desidratação e, a recuperação dos mesmos durante a reidratação (Sherwin & Farrant 1998). O mesmo resultado foi obtido, em relação ao conteúdo de clorofilas para *Selaginella tamariscina*, sendo também considerada uma espécie poiquiloclorofilada. As razões de clorofila *a/b* em *S. tamariscina* mantiveram-se estáveis durante os tratamentos de desidratação e reidratação (Wang *et al.* 2010). Este padrão de resultados também foi obtido para a espécie em estudo, *P. pleopeltifolia*.

A degradação de clorofilas observada durante a fase de dessecação, como observado em *P. pleopeltifolia*, pode conferir uma vantagem adaptativa para colonização de ambientes caracterizados por períodos de secas recorrentes e exposição à radiação solar. Com isso, possíveis danos foto-oxidativos podem ser prevenidos em condições onde a fotossíntese não é possível (Sherwin & Farrant 1998).

Em relação ao conteúdo de carotenoides, em espécies poiquiloclorofiladas, este pode ser parcialmente (Sherwin & Farrant 1998) ou totalmente degradado durante desidratação (Willigen 2001). Indivíduos de *Pleopeltis mexicana* (Polypodiaceae) não apresentaram diferenças significativas na

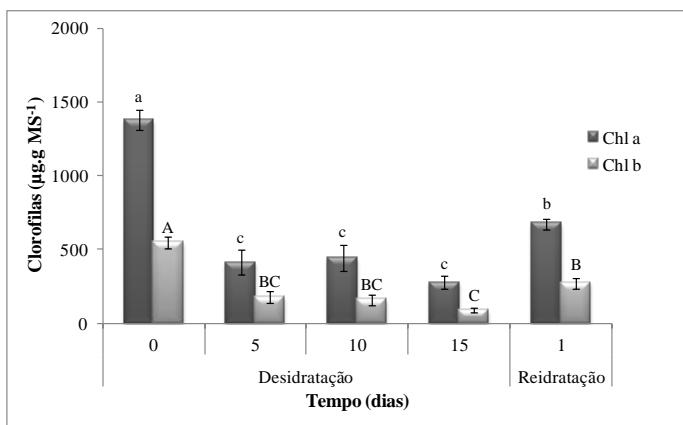
concentração de carotenoides quando submetidos aos diferentes tratamentos de desidratação (Tausz *et al.* 2001).

As plantas podem compensar o estresse foto-oxidativo através de sistemas de defesa antioxidantes e fotoprotetores, incluindo carotenoides localizados diretamente nas membranas tilacóides. Em casos de seca contínua, as plantas aumentam a concentração constitutiva de carotenoides de proteção, para fornecer maior proteção. Em casos mais severos, estas substâncias protetoras podem ser degradadas sob estresse e, eventualmente a degradação de pigmentos segue como um resultado do dano oxidativo (Tausz *et al.* 2001).

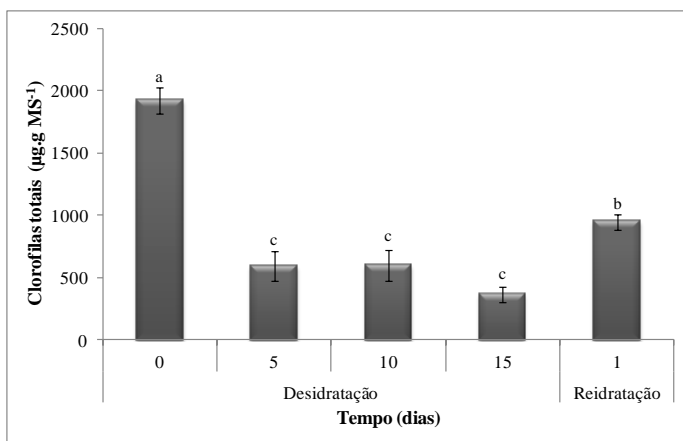
Declínios no conteúdo de carotenoides, como observado em *P. pleopeltifolia*, podem ser devidos ao dismantelamento do aparato fotossintético, visando a prevenção de interações com a luz, bem como a degradação de pigmentos pode ser resultante de danos oxidativos (Sherwin & Farrant 1998).

Os dados da literatura corroboram com os obtidos para *P. pleopeltifolia*, tendo em vista que o mesmo padrão de perda e recuperação dos pigmentos foi observado, confirmando o caráter poiquiloclorofilado para a espécie. O ônus bioquímico para espécies poiquiloclorofiladas esta no período de recuperação, associado ao reparo e resíntese de compostos, como os pigmentos, uma vez que a água torna-se disponível (Sherwin & Farrant 1998).



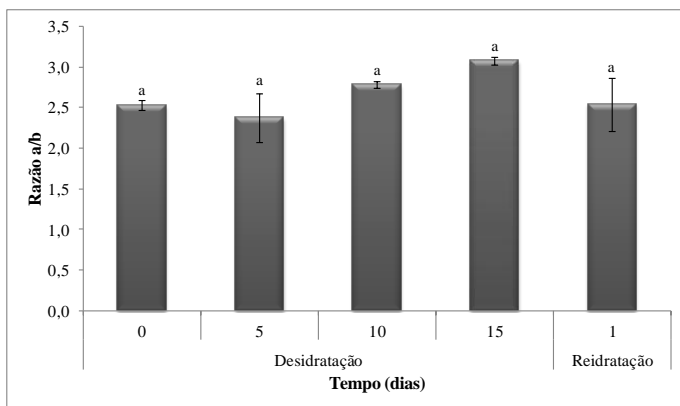


**Figura 8** - Conteúdo de clorofilas *a* e *b* de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston submetidas aos tratamentos de desidratação (0, 5, 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia). Os valores são médias para n=3. Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes (ANOVA seguida por teste de Tukey  $p > 0,05$ ). Barras representam o desvio padrão.

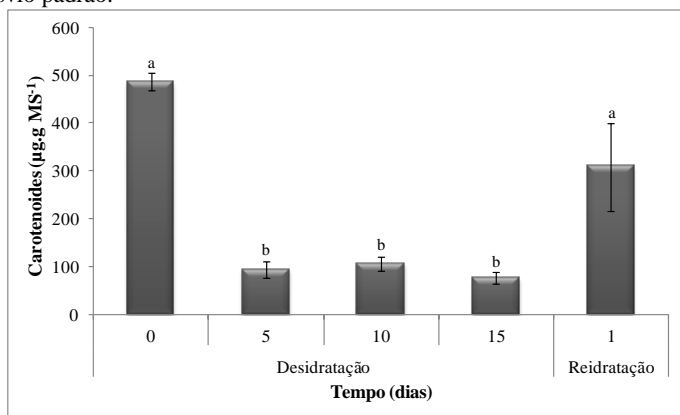


**Figura 9** - Conteúdo de clorofilas totais de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston submetidas aos tratamentos de desidratação (0, 5, 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia). Os valores são médias para n=3. Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes

ANOVA seguida por teste de Tukey  $p > 0,05$ ). Barras representam o desvio padrão.



**Figura 10** - Razão do conteúdo de clorofilas *a* e *b* de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston submetidas aos tratamentos de desidratação (0, 5, 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia). Os valores são médias para  $n=3$ . Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes (Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn  $p > 0,05$ ). Barras representam o desvio padrão.



**Figura 11** - Conteúdo de carotenóides de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston submetidas aos tratamentos de desidratação (0, 5, 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia). Os valores são médias para  $n=3$ . Médias seguidas

por letras iguais não são significativamente diferentes (ANOVA seguida por teste de Tukey  $p > 0,05$ ). Barras representam o desvio padrão.

#### 4.6 Taxa de transporte de elétrons (ETR) de esporófitos

As análises de supressão da fluorescência da clorofila *a*, em indivíduos de *Pleopeltis pleopeltifolia*, apresentaram diferenças significativas entre os parâmetros fotossintéticos analisados:  $E_{\text{optimum}}$  (irradiância ótima),  $P_{\text{max}}$  (taxa de transporte de elétrons máxima) e Alfa  $\alpha$  (eficiência fotossintética) (Tab. 1). As plantas submetidas a cinco dias de desidratação, quando comparadas às plantas hidratadas (0 dias), não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros fotossintéticos analisados. As plantas submetidas a dez e quinze dias de desidratação tiveram reduções significativas, tanto nos valores de  $P_{\text{max}}$  bem como no Alfa ( $\alpha$ ), atingindo zero em todos estes parâmetros nos quinze dias. A irradiância ótima ( $E_{\text{optimum}}$ ) foi diferente apenas nas plantas submetidas a quinze dias de desidratação, atingindo valor nulo. A partir dos dez dias de desidratação, decréscimos notáveis na inclinação ( $\alpha$ ) das curvas rápidas de luz, bem como na amplitude das mesmas foram perceptíveis, sendo que não foi possível a detecção da fluorescência da clorofila *a* nos indivíduos submetidos aos quinze dias de desidratação, gerando uma taxa nula de transporte de elétrons igual (Fig. 12).

Características da fluorescência da clorofila têm o potencial de prover informações sobre a eficiência da fotossíntese, sendo que análises da fluorescência da clorofila tem se tornado a técnica mais eficaz e amplamente utilizada por fisiologistas vegetais e ecofisiologistas (Maxwell & Johnson 2000).

A obtenção dos parâmetros fotossintéticos ( $E_{\text{optimum}}$ ,  $P_{\text{max}}$  e  $\alpha$ ), a partir das curvas rápidas de luz (RLC's), permite a descrição de suas características e possibilitam a análise estatística dos dados visando possíveis comparações. As curvas rápidas de luz obtidas para os indivíduos de *P. pleopeltifolia*, demonstram, claramente, as diferenças entre as plantas submetidas aos diferentes

tratamentos de desidratação e reidratação, quando analisados os parâmetros fotossintéticos ( $E_{\text{optimum}}$ ,  $P_{\text{max}}$  e  $\alpha$ ). Com isso, comprova-se a efetividade dos tratamentos aos quais as plantas foram submetidas, tendo em vista que os pontos cardinais obtidos a partir de uma RLC descrevem a capacidade fotossintética foliar e suas adaptações aos possíveis estresses ambientais como seca e alta irradiância (Ralph & Gademann 2005).

Decréscimos na capacidade de tolerar altos níveis de irradiância estão diretamente relacionados com decréscimos nos teores de clorofila *a*, uma vez que as respostas obtidas através do PAM dependem diretamente dos níveis deste pigmento (Genty *et al.* 1989). Mesmo após o decréscimo significativo ocorrido no conteúdo de clorofila *a* dos esporófitos submetidos ao tratamento de cinco dias desidratação, conforme item 4.5, a taxa de transporte de elétrons permaneceu alta nestes indivíduos, similar a encontrada nas plantas hidratadas. Já nos tratamentos de dez e quinze dias de desidratação, juntamente com as diminuições no conteúdo de clorofila *a*, ocorreram decaimentos notáveis na taxa de transporte de elétrons. Estes resultados sugerem que, em tratamentos de estresse hídrico, durante pequenos períodos de tempo, as clorofilas *a* não degradadas durante o período de estresse conseguem manter a taxa de transporte de elétrons elevada (similar a das plantas hidratadas), suprimindo o decréscimo no conteúdo deste pigmento.

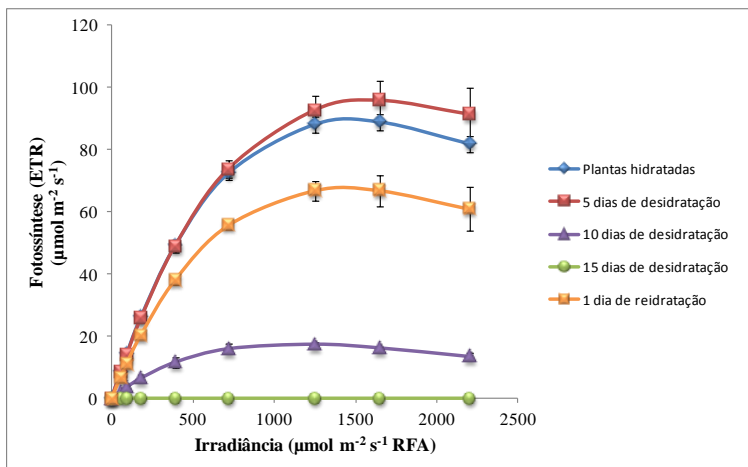
Conforme os dados obtidos para *P. pleopeltifolia*, as plantas hidratadas (0 dias) e as submetidas aos cinco dias de desidratação apresentaram maior eficiência na captura de luz ( $\alpha$ ), quando comparadas as plantas reidratadas. Apenas o parâmetro  $E_{\text{optimum}}$  das plantas reidratadas foi estatisticamente igual ao das plantas hidratadas e ao das plantas submetidas aos cinco e dez dias de desidratação. Todavia, o conteúdo relativo de água das plantas reidratadas foi igual ao das plantas hidratadas (0 dias), conforme descrito no item 4.4, bem como o conteúdo de pigmentos das plantas reidratadas foi superior ao das plantas submetidas aos cinco dias de desidratação (item 4.5). Kaiser (1987) indica que em conteúdos relativos de água abaixo de 30% haveria reduções

irreversíveis na fotossíntese causadas por danos às membranas em tecidos sensíveis à dessecação. Estes dados sugerem possíveis danos ao aparato fotossintético de *P. pleopeltifolia* provocados pelo longo período (15 dias) de exposição à desidratação nas plantas reidratadas, tendo em vista que ocorreu a recuperação da atividade do PSII, entretanto, a recuperação foi parcial.

Durante a secagem lenta de indivíduos de *Xerophyta humilis* (Velloziaceae), durante cerca de nove dias, declínios na fotossíntese ocorreram em CRA abaixo de 50%, enquanto que em indivíduos submetidos à secagem rápida, por aproximadamente 20 horas, a fotossíntese começou a declinar a partir do CRA de 25%. Diferenças entre estes tratamentos podem estar relacionadas a diferenças na extensão dos danos ao aparato fotossintético. No CRA de 50%, folhas submetidas à secagem lenta perderam mais de 50% do seu conteúdo de clorofilas e os tilacóides estavam parcialmente desmantelados, o que pode contribuir ao declínio inicial na atividade do PSII. Folhas submetidas à secagem rápida mantiveram grande parte do seu conteúdo de clorofilas e as membranas tilacóides não foram desmanteladas durante a seca, permitindo a continuação da atividade do PSII em baixo conteúdo de água. Estas folhas, contudo, não foram capazes de recuperar a atividade do PSII com a reidratação, sugerindo que danos irreversíveis possam ter ocorrido no sistema de transporte de elétrons. Folhas submetidas à secagem lenta reiniciaram a atividade do PSII com a reidratação no CRA de 60% e a recuperação total ocorre no CRA de 90% (Farrant *et al.* 1999). Nos tratamentos de desidratação de indivíduos de *P. pleopeltifolia*, os mesmos foram submetidos a tratamentos de secagem lenta, sendo os resultados obtidos similares aos descritos por Farrant *et al.* (1999) para folhas de *X. humilis* submetidas à secagem lenta, tendo em vista que mesmo com a perda de clorofilas durante a seca a atividade parcial do PSII foi recuperada em apenas um dia de reidratação.

**Tabela 1** - Parâmetros da Curva Rápida de Luz (RLC) plotadas com ETR (P) *versus* irradiância (E) em esporófitos de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston, sob diferentes tratamentos de desidratação (0, 5, 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia), utilizando o modelo de curva *Waiting-in-line*. Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes (ANOVA seguido por teste de Tukey  $p > 0,05$ ). Média  $\pm$  DP (n = 3).

	<b>0 dias</b>	<b>5 dias</b>	<b>10 dias</b>	<b>15 dias</b>	<b>Reidratação</b>
<b>E<sub>optimum</sub></b> ( $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{ s}^{-1}$ )	1488 $\pm$ 39a	1642 $\pm$ 149a	1176 $\pm$ 186a	0b	1449 $\pm$ 156a
<b>P<sub>max</sub></b> ( $\mu\text{mol el\u00e9trons m}^2 \text{ s}^{-1}$ )	89 $\pm$ 3a	96 $\pm$ 7a	18 $\pm$ 0,7b	0c	68 $\pm$ 4d
<b>Alfa (<math>\alpha</math>)</b>	0,16 $\pm$ 0,006a	0,16 $\pm$ 0,008a	0,04 $\pm$ 0,008b	0c	0,13 $\pm$ 0,009d
<b>(A)</b>	243 $\pm$ 7	261 $\pm$ 18	48 $\pm$ 2	0	184 $\pm$ 11
<b>(K<sub>w</sub>)</b>	0,00067 $\pm$ 0,000018	0,00061 $\pm$ 0,00005	0,00087 $\pm$ 0,0001	0	0,0007 $\pm$ 0,00008
<b>Correla\u00e7\u00e3o r (n\u00famero de amostras / pontos de dados)</b>	0,98 (3/12)	0,97 (3/12)	0,95 (3/12)	- (3/12)	0,98 (3/12)



**Figura 12** - Curva Rápida de Luz (RLC) Fotossíntese (ETR) versus Irradiância (E) de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston sob diferentes tratamentos: (◆) 0 dias, (■) 5 dias, (▲) 10 dias, (●) 15 dias de desidratação e (x) 1 dia de reidratação. Os valores são médias para n = 3. Barras representam o desvio padrão.

#### 4.7 Conteúdo de prolina

Os tratamentos de estresse hídrico não afetaram significativamente o conteúdo de prolina em *P. pleopeltifolia* (Fig. 13). Partindo de um valor médio inicial de  $5,15 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MS de prolina nas folhas hidratadas, ocorreu uma variação não significativa de 33% neste conteúdo nas plantas submetidas ao período máximo de dessecação (15 dias). Durante a reidratação ocorreu um incremento notável de 177% no conteúdo de prolina, em relação às plantas hidratadas, atingindo  $14,27 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MS.

Apesar da presença de uma forte correlação entre a tolerância ao estresse e o acúmulo de prolina em plantas superiores, esta relação pode não ser universal (Ashraf & Foolad 2007), sendo o

acúmulo de prolina considerado, em alguns casos, sintoma de injúria.

Em estudos com *Vigna unguiculata* (Leguminosae), o acúmulo de prolina não se manifesta como estratégia para evitar a seca (Shackel & Hall, 1983; Petrie & Hall 1992). Incrementos tardios e pequenos nos níveis de prolina em plantas tolerantes à dessecação sugerem fortemente que ela não participa do ajustamento osmótico, sendo, portanto, relacionada com alguma injúria provocada pelo estresse, ao invés de respostas adaptativas com efeitos benéficos sobre o funcionamento fisiológico das plantas (Souza *et al.* 2004).

Em plantas de arroz crescidas sob estresse salino, o acúmulo de prolina nas folhas foi considerado um sintoma de injúria ao invés de uma indicação de tolerância ao sal (Lutts *et al.* 1999). Resultados similares foram obtidos com plantas de sorgo também submetidas ao estresse salino, onde acúmulo de prolina não parece estar relacionado à tolerância ao sal, mas é, provavelmente, uma reação das plantas aos danos provocados pelo estresse (Lacerda *et al.* 2003).

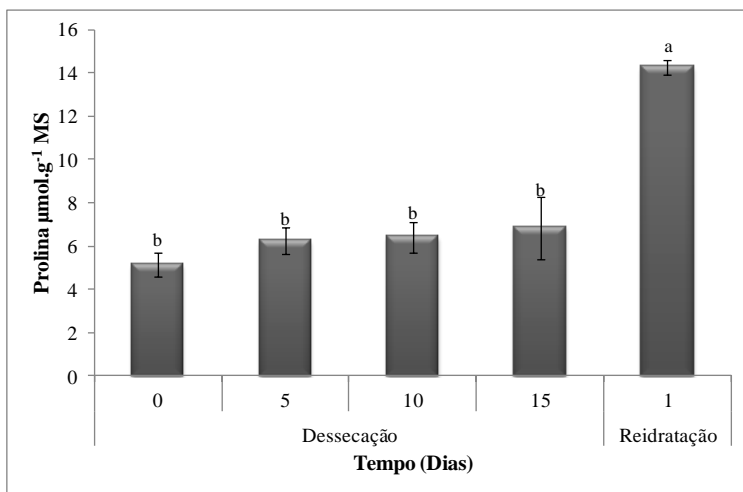
Estudos de desidratação e reidratação realizados com *Boea higoscopica* (Gesneriaceae) demonstraram uma diminuição no conteúdo de prolina quando as plantas eram submetidas à desidratação, quando comparadas as plantas hidratadas. Após 24 horas de reidratação, ocorreu um grande incremento neste conteúdo, sendo muito superior ao valor das plantas hidratadas, tanto quanto das desidratadas (Bianchi *et al.* 1991), sendo que este comportamento na reidratação também foi observado em *P. pleopeltifolia*.

Em estudos com *Ramonda serbica* (Gesneriaceae), o déficit hídrico provocou uma redução no conteúdo de aminoácidos livres totais bem como no conteúdo de prolina, em folhas, durante os primeiros seis dias de desidratação. Durante o período restante dos tratamentos de desidratação ocorreram incrementos nestes conteúdos. O decaimento no conteúdo de aminoácidos livres totais durante a desidratação de *R. serbica* pode ser resultado de uma menor taxa de biossíntese de aminoácidos bem como de uma



maior degradação. O menor conteúdo de prolina em folhas dessecadas, quando comparadas às hidratadas pode ser consequência, segundo os autores de um delicado balanço de algumas atividades enzimáticas tanto das vias de síntese como das vias de degradação de aminoácidos, que podem ser deficientes em condições de estresse hídrico. Como consequência, a prolina não afetou o ajustamento osmótico em *R. serbica* durante dessecação (Živković *et al.* 2005).

Aumentos nos níveis de prolina também não se constituem numa estratégia de adaptação de *P. pleopeltifolia* as restrições nos níveis de água do ambiente, sendo que este aminoácido não atuou como soluto compatível na espécie durante períodos de estresse hídrico aos quais os indivíduos foram submetidos.



**Figura 13** - Conteúdo de prolina de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston submetidas aos tratamentos de desidratação (0, 5, 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia). Os valores são médias para  $n = 3$ . Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes (ANOVA seguida por teste de Tukey  $p > 0,05$ ). Barras representam o desvio padrão.

#### 4.8 Conteúdo de açúcares

Os resultados obtidos, mensurados a partir da curva padrão de glicose (Fig. 14) demonstram a capacidade de folhas de *P. pleopeltifolia* para acumular grandes quantidades de açúcares solúveis totais durante períodos de restrição de água (Fig. 15). Um incremento notável na concentração de açúcares é perceptível nos dez primeiros dias de tratamento, sendo que em apenas cinco dias de desidratação ocorreu um aumento de 204% nesta concentração, em relação às plantas hidratadas. Na reidratação, ocorreu um decréscimo no nível de açúcares, voltando aos valores próximos aos encontrados em folhas hidratadas.

Visando garantir sua própria sobrevivência, as plantas desenvolveram uma série de estratégias para lidar com vários estresses abióticos. Um mecanismo comum é o acúmulo de solutos compatíveis, que são compostos orgânicos, altamente solúveis e não tóxicos em altas concentrações. Os solutos compatíveis acumulados diferem entre as famílias botânicas, sendo que cada uma tende a usar um ou dois dos solutos de preferência a outros (Chen & Murata 2002; Taiz & Zeiger 2010).

Os açúcares podem atuar como solutos compatíveis em plantas, permitindo um possível ajustamento osmótico, além de proteger as células durante períodos de dessecação severa através da vitrificação, na qual um líquido supersaturado é produzido com as propriedades de um sólido (Ingram & Bartels 1996). A formação de fase vítrea parece ser indispensável para a sobrevivência durante a dessecação, e muitas plantas tolerantes à dessecação apresentam este mecanismo durante a desidratação, visando à prevenção da cristalização de compostos químicos, fusão entre os sistemas de membrana e alterações conformacionais em proteínas (Hoekstra *et al.* 2001), além de reduzir consideravelmente os índices de reações químicas possivelmente deletérias nas células desidratadas (Buitink *et al.* 1998).

O conteúdo de açúcares solúveis em indivíduos de *Selaginella tamariscina* (Selaginellaceae) foi marcadamente maior que o

normal durante os tratamentos de desidratação, sendo que permaneceu elevado mesmo após 12 horas da reidratação (Wang *et al.* 2010). Isto implica, segundo os autores, que os açúcares solúveis desempenham papéis importantes no ajustamento osmótico e em outros processos de proteção, sendo cruciais na manutenção do balanço osmótico em células desidratadas de muitas plantas que ressuscitam (Wang *et al.* 2010).

O conteúdo de sacarose em *Sporobolus stapfianus* (Poaceae) se manteve estável durante os primeiros cinco dias de tratamento de desidratação, enquanto que o conteúdo relativo de água declinou de 100% para 85%. Após este período, ocorreu um incremento de cinco vezes no conteúdo de sacarose, enquanto o conteúdo relativo de água reduziu de 85% para 29% (Whittaker *et al.* 2001).

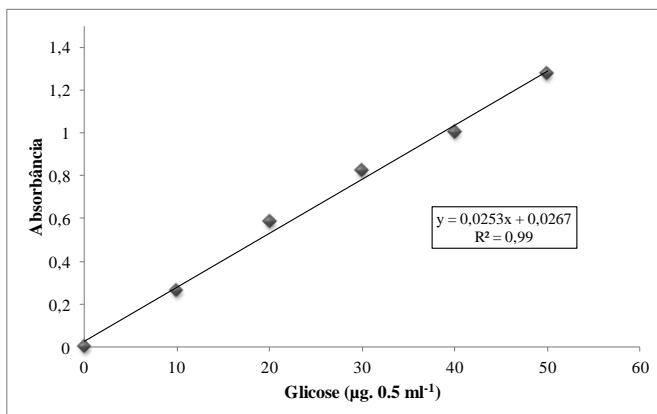
Durante o tratamento de desidratação da espécie epífita *Dendrobium candidum* (Orchidaceae), o conteúdo de açúcares solúveis aumentou significativamente. Durante os primeiros dias de desidratação, o conteúdo de açúcares aumentou de 25,2 mg.g<sup>-1</sup> MS para 37,3 mg.g<sup>-1</sup> MS (Bian *et al.* 2002).

Em rizomas de *Polypodium vulgare* (Polypodiaceae) foi observado ajustamento osmótico associado ao incremento no conteúdo de sacarose em células desidratadas de rizoma. Todos os rizomas acumularam grandes quantidades de sacarose em resposta a somente 9 horas de déficit hídrico (Bagniewska-Zadworna *et al.* 2006).

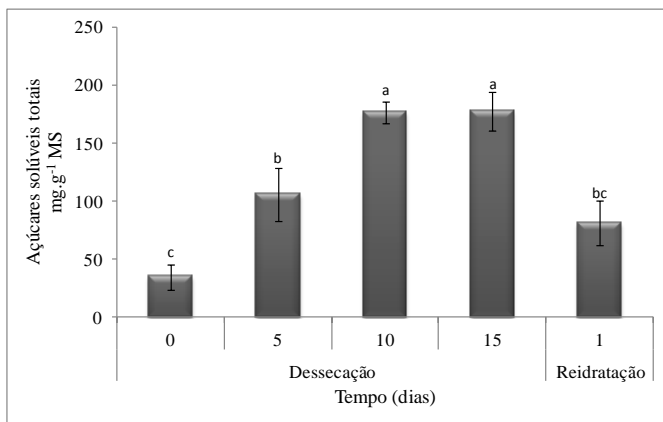
Em *Craterostigma plantagineum* (Linderniaceae), alterações evidentes ocorrem no metabolismo de carboidratos durante a desidratação. Durante a desidratação há uma redução no conteúdo de octulose, em relação às folhas fotossinteticamente ativas, ocorrendo um acúmulo de sacarose. O acúmulo de sacarose em tecidos desidratados parece ser comum em diferentes plantas que ressuscitam, sendo que diferentes rotas metabólicas podem ser utilizadas na sua síntese (Bartels & Salamini 2001).

Os dados da literatura corroboram com os obtidos para *P. pleopeltifolia*, sugerindo que os açúcares atuam como solutos compatíveis podendo favorecer um possível ajustamento

osmótico para a espécie em situações de dessecação, além da possibilidade de vitrificação.



**Figura 14** – Curva padrão de glicose.



**Figura 15** - Conteúdo de açúcares solúveis totais de frondes de *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston submetidas aos tratamentos de desidratação (0, 5, 10 e 15 dias) e reidratação (1 dia). Os valores são médias para n = 3. Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes (ANOVA seguida por teste de Tukey p > 0,05). Barras representam o desvio padrão.

## 5. CONCLUSÕES

Foi evidenciada a característica de tolerância à dessecação para a espécie *Pleopeltis pleopeltifolia* (Raddi) Alston.

Diminuições no conteúdo relativo de água afetaram negativamente o conteúdo de pigmentos fotossintéticos da espécie, contudo não afetaram a taxa fotossintética da mesma quando submetidas à desidratação por um curto período de tempo. Já períodos de seca prolongados demonstraram provocar diminuições nos parâmetros fotossintéticos e danos ao aparato fotossintético.

Foi confirmado o caráter poiquiloclorofilado para a espécie.

O aminoácido prolina não atua como soluto compatível, em condições de estresse hídrico em *P. pleopeltifolia*.

Os açúcares solúveis totais atuam como soluto compatível na espécie, em situações de estresse de seca, favorecendo um possível ajustamento osmótico, além da vitrificação.

A espécie apresenta características xeromorfas ligadas ao hábito epifítico, sendo fundamentais para a sobrevivência da mesma, atuando tanto na manutenção hídrica da espécie, bem como na absorção de água pelas frondes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ashraf, M.; Foolad, M. R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**. 59, 2, 206-216.

Bagniewska-Zadworna, A.; Zenkteler, E.; Czaczyk, K.; Osińska, M. 2006. The effect of dehydration with or without abscisic acid pretreatment on buds regeneration from *Polypodium vulgare* L. rhizomes. **Acta Physiologiae Plantarum**. 29, 1, 47-56.

Barrs, H. D. 1968. Determination of water deficits in plant tissue. *In*: KOZŁOWSKI, T.T. (Ed) **Water deficits and plant growth**. New York: Academic Press, v.1, p.235-368.

Barrs, H. D.; Weatherley, P. E. 1962. A Re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. **Australian Journal of Biological Sciences**. 15, 413-428.

Bartels, D.; Salamini, F. 2001. Desiccation Tolerance in the Resurrection Plant *Craterostigma plantagineum*. A Contribution to the Study of Drought Tolerance at the Molecular Level. **Plant Physiology**. 127, 1346-1353.

Bates, L. S.; Waldren, R. P.; Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**. 39, 205-207.

Bennet, B. C. 1986. Patchiness, diversity and abundance relationships of vascular epiphytes, **Selbyana**. 9, 70-75.

Benzing, D. H. 1990. **Vascular epiphytes: general biology and related biota**. Cambridge: Cambridge University Press.

Bewley, J. D. 1979. Physiological aspects of desiccation tolerance. **Annual Review of Plant Physiology**. 30, 195–238.

Bian, H.-W.; Wang, J.-H.; Lin, W.-Q.; Han, N.; Zhu, M.-Y. 2002. Accumulation of soluble sugars, heat-stable proteins and dehydrins in cryopreservation of protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* by the air-drying method. **Journal of Plant Physiology**. 159, 1139-1145.

Bianchi, G.; Murelli, C.; Bochicchio, A.; Vazzana, C. 1991. Changes of low-molecular weight substances in *Boea hygroskopica* in response to desiccation and rehydration. **Phytochemistry**. 30, 2, 461-466.

Bialeski, R. L.; Turner, N. A. 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by Thin-Layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**. 17, 278-293.

Bilger, W.; Schreiber, U.; Bock, M. 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical

quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**. 102, 4, 425-432.

Bjorkman, O.; B. Demmig. 1987. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77-K among vascular plants of diverse origins. **Planta**. 170, 489-504.

Buitink, J.; Claessens, M.; Hemminga, M.; Hoekstra, F. 1998. Influence of water content and temperature on molecular mobility and intracellular glasses in seeds and pollen. **Plant Physiology**. 118, 2, 531-41.

Bukatsh, F. 1972. Benerkungen zur doppelfarbung astrablausafranina. **Microkosmos**. 61, 255.

Chen, T. H. H.; Murata, N. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Current Opinion in Plant Biology**. 5, 250-257.

Clark, K. L.; Nadkarni, N. M.; Scharfer, D.; Gholz, H. L. 1998. Atmospheric deposition and net retention of ions by the canopy in a tropical montane forest, Monteverde, Costa Rica. **Journal of Tropical Ecology**. 14, 27-45.



Costa, A. F. 1982. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2<sup>a</sup> ed. v.3.

Crowe, J. H.; Hoekstra, F. A.; Crowe, L. M. 1992. Anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**, 54, 579-599.

Csintalan, Z.; Tuba, Z.; Lichtenthaler, H. K.; Grace, J. 1996. Reconstitution of Photosynthesis Upon Rehydration in the Desiccated Leaves of the Poikilochlorophyllous Shrub *Xerophyta scabrida* at Elevated CO<sub>2</sub>. **Journal of Plant Physiology**. 148, 345-350.

Eames, A. J.; MacDaniels, L. H. 1947. **An Introduction to Plant Anatomy**. 2<sup>a</sup> Ed. USA: McGraw-Hill Book Company, INC.

Engel, V. L.; Poggiani, F. 1991. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 3, 1, 39-45.

Erdtman, G. 1952. **Pollen morphology and plant taxonomy: Angiosperms**. Stockholm: Almqvist & Wiksell.

Fahn, A.; Cutler, D. F. 1992. **Xerophytes**. Gebrüder Borntraeger: Germany.

Farrant, J. M., Cooper, K., Kruger, L. A., Sherwin, H. W. 1999. The Effect of Drying Rate on the Survival of Three Desiccation-tolerant Angiosperm Species. **Annals of Botany**. 84, 371-379.

Farrant, J. M.; Lehner, A.; Cooper, K.; Wiswedel, S. 2009. Desiccation tolerance in the vegetative tissues of the fern *Mohria caffrorum* is seasonally regulated. **The Plant journal: for cell and molecular biology**. 57, 1, 65-79.

Ferrari, F. B. 2009. Anatomia foliar de espécies de Aspleniaceae e Polypodiaceae (Monilófitas) ocorrentes no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, MG, Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. Brasil. 88 p.

Forzza, R. C. *et al.* 2010. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v.1.

Franks, F.; Hatley R. H. M.; Mathias, S. F. 1991 Materials science and the production of shelf-stable biologicals. **BioPharm**. 4, 8, 38.

Gaff, D. F. 1977. Desiccation tolerant vascular plants of southern Africa. **Oecologia**. 31, 95–109.

Genty, B.; Briantais, J. M.; Baker, N. R. 1989 The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**. 990, 87–92.

Gerlach, D. 1984. **Botanische Mikrotechnik**: eine Einführung. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Giudice, G. E.; Morbelli, M. A.; Piñeiro, M. R.; Copello, M.; Erra, G. 2004. Spore Morphology of the Polypodiaceae from Northwestern Argentina. **American Fern Journal**. 94, 1, 9-27.

Gloag, R. S.; Ritchie, R. J.; Chen, M.; Larkum, A. W. D.; Quinnell, R. G. 2007. Chromatic photoacclimation, photosynthetic electron transport and oxygen evolution in the chlorophyll d-containing oxyphotobacterium *Acaryochloris marina*. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1767, 2, 127-135.

Grunden, A. M.; Ghosh, M.; Adams, M. W. 2001. Proline Dipeptidase from *Pyrococcus furiosus*. **Methods in Enzymology**. 330, 433-445.

Hall, D. O.; Rao, K. K. 1980. **Fotossíntese**. São Paulo: EPU/EDUSP, p. 18-71.

Hare, P. D.; Cress, W. A.; Van Staden, J. 1999. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress related signal transduction. **Journal of Experimental Botany**. 50, 413–434.

Hietz, P. 2010. Fern adaptations to xeric environments. *In*: Mehlreter, K.; Walker, L. R.; Sharpe, J. M. **Fern Ecology**. New York: Cambridge University Press. p. 140–170.

Hietz, P.; Briones, O. 1998. Correlation between water relations and within-canopy distribution of epiphytic ferns in a Mexican cloud forest. **Oecologia**. 114, 3, 305-316.

Hoekstra, F. A.; Golovina, E. A. 1999. Membrane behavior during dehydration: implications for desiccation tolerance. **Russian Journal of Plant Physiology**. 46, 295–306.

Hoekstra, F. A.; Golovina, E. A.; Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in plant science**. 6, 9, 431-438.

Ingram, J.; Bartels, D. 1996. The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**. 47, 377-403.

Jensen, W. A. 1962. **Botanical histochemistry**: principles and practice. San Francisco: W. H. Freeman & Co.

Johansen, D. A. 1940. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book.

Kaiser, W. M. 1987. Effects of water deficit on photosynthetic capacity. **Physiologia Plantarum**. 71, 142-149.

Kersten, R. de A. 2010. Epífitas vasculares – Histórico, participação taxonômica e aspectos relevantes, com ênfase na Mata Atlântica. **Hoehnea**. 37, 1, 9-38.

Kooten, O. V.; Snel, J. F. H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**. 25, 3, 147-150.

Krause, G. H.; Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 42, 313-349.

Krauss, B. H. 1949. Anatomy of the vegetative organs of Pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr II – The leaf. **Botanical Gazette**. 110, 333-404.

Labiak, P. H.; Hirai, R. Y. 2012. Polypodiaceae. *In: Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB091721>).

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

Lacerda, C. F. de; Cambraia, J.; Oliva, M. A.; Ruiz, H. A.; Prisco, J. T. 2003. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**. 49, 107-120.

Lawlor, D. W.; Cornic, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant Cell Environment**. 25, 275-294.

Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**. 148, 350-382.

Liu, M.-S.; Chien, C.-T.; Lin, T.-P. 2008. Constitutive components and induced gene expression are involved in the desiccation tolerance of *Selaginella tamariscina*. **Plant cell physiology**. 49, 4, 653-663

Lutts, S.; Majerus, V.; Kinet, J.-M. 1999. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiologia Plantarum**. 105, 450–458.

Madison, M. 1977. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. **Selbyana**. 2, 1-13.

Maxwell, K.; Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal of experimental botany**. 51, 345, 659-668.

Moran, R. C. 2008. Diversity, biogeography, and floristics. *In*: Ranker, T. A.; Hafler, C. H. (eds.). **Biology and evolution of ferns and lycophytes**. New York: Cambridge University Press. p.367-394.

Morris, D. L. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. **Science**. 107, 254.

Nadkarni, N. M. 1981. Canopy root: convergent evolution in rainforest nutrient cycle. **Science**. 214, 4524.

Nadkarni, N. M.; Matelson, T. J. 1991. Litter dynamics within the canopy of a neotropical cloud forest, Monteverde, Costa Rica. **Ecology**. 72, 849-860.

O'Brien, T. P.; Feder, N.; McCully, M. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue o. **Protoplasma**. 59, 368–373.

Ogura, Y. 1972. **Comparative anatomy of vegetative organs of the pteridophytes**. Handbuch der Pflanzenanatomie, Vol. 7 Part 3. Gebrüder Borntraeger, Berlin.

Oliver, M. J.; Tuba, Z.; Mishler, B. D. 2000. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**. 151, 85-100.

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

Petrie, C. L.; Hall, A. E. 1992. Water relations in cowpea and pearl millet under soil water deficits. I. Contrasting leaf water relations. **Australian Journal of Plant Physiology**. 19, 577–589.

Pryer, K. M.; Schuettpelz, E.; Wolf, P. G.; Schneider, H.; Smith, A. R.; Cranfill, R. 2004. Phylogeny and evolution of ferns (Monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. **American Journal of Botany**. 91, 1582-1598.



Raghavan, V. 1989. **Developmental biology of fern gametophytes**. Cambridge University Press, New York.

Ralph, P.J.; Gademann, R. 2005. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. **Aquatic Botany**. 82, 222-237.

Ranal, M. A. 1993. Desenvolvimento de *Polypodium hirsutissimum* Raddi (Pteridophyta, Polypodiaceae) em condições naturais. **Acta Botanica Brasilica**. 7, 3-15.

Randi, A. M. 1987. Aspectos fotomorfogênicos, bioquímicos e citoquímicos durante a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Stemb. Tese de doutorado. UNICAMP. Campinas. Brasil. 192 p.

Ritchie, R. J. 2008. Fitting light saturation curves measured using modulated fluorometry. **Photosynthesis research**. 96, 3, 201-215.

Runcie, J. W.; Durako, M. J. 2004. Among-shoot variability and leaf-specific absorbance characteristics affect diel estimates of in situ electron transport of *Posidonia australis*. **Aquatic Botany**. 80, 209-220.

Ruzin, S.E. 1999. **Plant microtechnique & microscopy**. New York: Oxford University Press.

Scatena V. L.; Segecin. 2005. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 28, 3,635-649.

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, Netherlands.

Schobert, B.; Tschesche, H. 1978. Unusual solutions properties of prolina and its interaction with proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**. 541, 270-277.

Schreiber, U.; Endo, T.; Mi, H-L.; Asada, K. 1995. Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. **Plant Cell Physiology**. 36, 873–882.

Seiferman-Harms, D. 1987. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. **Physiology Plantarum**. 69, 561-568.

Shackel, K. A.; Hall, E. A. 1983. Comparison of Water Relations and Osmotic Adjustment in Sorghum and Cowpea under Field Conditions. **Australian Journal of Plant Physiology**. 10, 423-435.

Sharpe, J. M.; Mehltreter, K.; Walker, L. R. 2010. Ecological importance of ferns. *In*: Mehltreter, K.; Walker, L. R.; Sharpe, J. M. **Fern Ecology**. New York: Cambridge University Press. p. 140–170.

Sherwin, H. W.; Farrant, J. M. 1998. Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. **Plant Growth Regulation**. 24, 203-210.

Slatyer, R. O.; Taylor, S. A. 1960. Terminology in plant-soil-water relations. **Nature**. 187, 922-924.

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

Souza, R. P.; Machado, E. C.; Silva, J. A. B.; Lagôa, A. M. M. A.; Silveira, J. A. G. 2004. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany**. 51, 45-56.

Strehl, T.; Miranda, A. L. B. 1997. Alguns aspectos da anatomia de *Poypodium hirsutissimum* Raddi (Pteridophyta – Polypodiaceae). **Iheringia**. 49, 21-32.

Streit, N. M.; Canterle, L. P.; Canto, M. W.; Hecktheuer, L. H. H. 2005. As Clorofilas. **Ciência Rural**. 35, 3, 28-39.

Taiz, L.; Zeiger, E. 2010. **Plant physiology**. Massachusetts: Sinauer Associates 5ed.

Tausz, M.; Hietz, P.; Briones, O. 2001. The significance of carotenoids and tocopherols in photoprotection of seven epiphytic fern species of a Mexican cloud forest. **Australian Journal of Plant Physiology**. 28, 775-783.

Tryon, R. M.; Tryon, A. F. 1982. **Ferns and allied plants**, with special reference to tropical America. New York: Springer Verlag.

Tuba, Z.; Lichtenthaler, H. K.; Csintalan, Z.; Pócs, T. 1993. Regreening of the desiccated leaves of the poikilochlorophyllous *Xerophyta scabrida* upon rehydration. **Journal of Plant Physiology**. 142, 103–108.

Tuba, Z.; Proctor, M. C. F.; Csintalan, Z. 1998. Ecophysiological responses of homoiochlorophyllous and poikilochlorophyllous desiccation tolerant plants: a comparison and an ecological perspective. **Plant Growth Regulation**. 24, 211–217.

Viviani, D.; Santos, M.; Randi, Á. M. 2009. Desenvolvimento inicial de *Pleopeltis lepidopteris* (Polypodiaceae – Polypodiopsidia). **Rodriguésia**. 60(4), 735-746.

Wang, X.; Chen, S.; Zhang, H. *et al.* 2010. Desiccation Tolerance Mechanism in Resurrection Fern-Ally *Selaginella tamariscina* Revealed by Physiological and Proteomic Analysis. **Journal of Proteome Research**. 9, 6561-6577.

Weatherley, P. E. 1950. Studies in the water relations of the cotton plant. 1. The field measurement of water deficits in leaves. **New Phytologist**. 49, 81-97.

Weaver, P. L. 1972. Cloud moisture interception in the Luquilo mountains of Puerto Rico. **Caribbean Journal of Science**. 12, 129-144.

White, A. J.; Critchley, C. 1999. Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. **Photosynthesis Research**. 59, 1, 63–72.

Whittaker, A.; Bochicchio, A.; Vazzana, C.; Lindsey, G.; Farrant, J. 2001. Changes in leaf hexokinase activity and metabolite levels in response to drying in the desiccation-tolerant species *Sporobolus stapfianus* and *Xerophyta viscosa*. **Journal of experimental botany**. 52, 358, 961-969.

Willigen, C. V.; Pammenter, N. W.; Mundree, S.; Farrant, J. 2001. Some physiological comparisons between the resurrection grass, *Eragrostis nindensis*, and the related desiccation-sensitive species, *E. curvula*. **Plant Growth Regulation**. 35, 121-129.

Windisch, P.G. 1992. Pteridófitas da região Norte-Occidental do Estado de São Paulo: guia para estudo e excursões. São José do Rio Preto: UNESP.

Yamasaki, S.; Dillenburg, L. R. 1999. Measurements of leaf relative water content in *Araucaria angustifolia*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 11, 2, 69-75.

Zar, J. H. 1996. **Biostatistical Analysis**. Prentice Hall Upper: Saddle River. 3ed.

Živković, T.; Quartacci, M. F.; Stevanović, B.; Marinone, F.; Navari-Izzo, F. 2005. Low-molecular weight substances in the poikilohydric plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. **Plant Science**. 168, 1, 105-111.