

Bruno Degaspari Minardi

**ESTUDOS MORFOFISIOLÓGICOS DE DUAS
SAMAMBAIAS EPÍFITAS DA MATA ATLÂNTICA:**

***Elaphoglossum luridum* (Fée) Christ
(DRYOPTERIDACEAE) e *Vittaria lineata* (L.) Smith
(PTERIDACEAE)**

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

Minardi, Bruno Degaspari
ESTUDOS MORFOFISIOLÓGICOS DE DUAS SAMAMBAIAS EPÍFITAS DA
MATA ATLÂNTICA: *Elaphoglossum luridum* (Fée) Christ
(DRYOPTERIDACEAE) e *Vittaria lineata* (L.) Smith
(PTERIDACEAE) [dissertação] / Bruno Degaspari Minardi ;
orientadora, Áurea Maria Randi ; co-orientadora, Marisa
Santos. - Florianópolis, SC, 2012.
114 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. CAM. 4.
Pigmentos fotossintéticos. 5. Curvas rápidas de luz. I.
Randi, Áurea Maria. II. Santos, Marisa. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Vegetal. IV. Título.

Bruno Degaspari Minardi

**ESTUDOS MORFOFISIOLÓGICOS DE DUAS
SAMAMBAIAS EPÍFITAS DA MATA ATLÂNTICA:
Elaphoglossum luridum (Fée) Christ
(DRYOPTERIDACEAE) e *Vittaria lineata* (L.) Smith
(PTERIDACEAE).**

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 (Co-orientadora)

Dr. Moacir A. Torres (UDESC/CAV)

Dra. Rosete Pescador (UFSC/CCA)

Dra. Ana Cláudia Rodrigues (UFSC/CCB)

“Dedico este trabalho ao meu irmão Vinícius
Degaspari Minardi (*in memoriam*)”

“Há um pequeno número de homens e mulheres que pensam por todos os outros, e para os quais todos os outros falam e agem.”

(Jean Jacques Rousseau)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Neimar Leonardi Minardi e Veralice Degaspari e ao meu irmão Ney Mário Degaspari Minardi pelo apoio, compreensão, ajuda e por todo carinho ao longo deste percurso. A minha namorada Ana Paula Lorenzen Voytena pelo carinho, companheirismo, compreensão e ajuda nas principais decisões deste trabalho. Agradeço também a minha sogra, Marisa Lorenzen Voytena pela amizade e incentivo.

Aos meus amigos e colegas de curso Eduardo M. P. da Rocha, Rulian S. Beade, Itamê Baptista, Marcela Uberti, Jeovane Warmling, Robson Avi, Kátia Arenhart, Felipe Guimarães, Eduardo Valduga, Eduardo Bastos, Carlos Eduardo, Cíntia Martins, Richard Tito, Carlos Montoya pela convivência, cumplicidade, ajuda, amizade e pelas intermináveis reuniões promovidas pela Professora Dr. Maria Terezinha Paulilo nos bares da região.

À Professora Dr. Áurea Maria Randi pelo carinho, dedicação, e orientação deste trabalho, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional. À professora e co-orientadora deste trabalho Dr. Marisa Santos, pelo conhecimento, dedicação e defesa dos direitos dos pós-graduandos do Departamento de Botânica. Também agradeço ao professor Dr. Alexandre Salino (UFMG) pela identificação das espécies estudadas e a técnica e amiga Elise Lara Galitsk pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos professores que ajudaram no desenvolvimento deste trabalho: Dr. Paulo Antunes Horta, Dr. Leonardo Rorig, Dr. José Bonomi Barufi, pelo incentivo e disponibilidade de equipamentos. Ao professor do Centro de Ciências Agrárias Dr. Marcelo Maraschin pela disponibilidade e conhecimento. Ao professor Dr.

Moacir Aluisio Torres da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/LAGES) pelo auxílio nas análises de fluorescência da clorofila. Aos demais professores do Departamento de Botânica – UFSC e ao professor Dr. Gilmar Roberto Zaffari por minha formação acadêmica e pessoal.

Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro sob forma de bolsa. Ao projeto “Rede de Epífitas” (PNADB-CAPES) pela possibilidade de conhecer pesquisadores de diferentes instituições brasileiras e pela experiência adquirida em diferentes cursos.

RESUMO

As pteridófitas constituem um importante grupo de organismos da flora brasileira, muito dependentes das condições climáticas presentes na Floresta Atlântica. As epífitas são plantas que não possuem conexões diretas com o solo e utilizam-se de suporte, mas não dos nutrientes, dos forófitos em que se apoiam. Dentre a grande variedade de pteridófitas epífitas da Mata Atlântica, podemos citar as espécies *Elaphoglossum luridum* (Fée) H. Christ. (Dryopteridaceae) e *Vittaria lineata* (L.) Smith (Pteridaceae). Considerando-se o número reduzido de informações sobre a anatomia e a fisiologia de pteridófitas epífitas, foram realizadas as caracterizações anatômicas e estudos de diferentes aspectos da fisiologia, em ambas as espécies, através de análises de: conteúdo relativo de água (CRA), pigmentos fotossintéticos, fluorescência da clorofila *a* e a concentração de malato foliar, em plantas do grupo controle, submetidas ao estresse hídrico e à aplicação exógena de ácido abscísico (ABA); com o objetivo de observar caracteres importantes para a sobrevivência destas espécies em ambientes xéricos. Os materiais botânicos foram coletados na Unidade de Conservação Desterro – UFSC (UCAD), Florianópolis, SC, sendo cultivados na casa de vegetação do Departamento de Botânica – CCB – UFSC. Ambas as espécies estudadas apresentam características anatômicas relacionadas às condições xéricas, tais como: frondes coriáceas a cartáceas, que apresentam suculência, cutícula espessa, células epidérmicas com paredes periclinais espessa e estômatos, restritos a face abaxial. As análises fisiológicas demonstraram uma grande capacidade de manutenção hídrica em *E. luridum* e *V. lineata*, pois, mesmo em condições de estresse hídrico e aplicação de ABA exógeno, as espécies não apresentaram alterações significativas no CRA, mantendo altos níveis. Nas análises da concentração de pigmentos fotossintéticos, as plantas

submetidas aos tratamentos de estresse demonstraram quedas significativas nos níveis de clorofila *a* e *b*, todavia as concentrações de carotenoides mantiveram-se estáveis. Os parâmetros fotossintéticos (α , E_{optimum} e ETR_{max}), obtidos através das curvas rápidas de luz (RLC's), apresentaram quedas significativas após os tratamentos de estresse hídrico e aplicação de ABA. Em *E. luridum*, não foram encontradas evidências do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM). Em *V. lineata*, plantas do grupo controle não apresentaram diferença no conteúdo de malato entre as amostras coletadas as 06h00min e as 18h00min, não demonstrando, assim, evidências do metabolismo CAM. Contudo, plantas submetidas ao estresse hídrico por sete dias e à aplicação exógena de ABA, apresentaram aumentos significativos nas concentrações de Δ Malato, demonstrando uma acidificação noturna e revelando uma regulação positiva do metabolismo CAM. Assim, foram encontradas evidências da possibilidade de alteração do modo de fixação de carbono da via C3 para o CAM, em resposta ao déficit hídrico e aplicação exógena de ABA, podendo, com isso, a espécie *V. lineata* apresentar o metabolismo CAM facultativo.

Palavras-chave: *Elaphoglossum luridum*, *Vittaria lineata*, anatomia, CRA, pigmentos, curvas rápidas de luz, malato, ABA, CAM.

ABSTRACT

Ferns are an important group of organisms of the flora, very dependent on climatic conditions present in the Atlantic Forest. Epiphytes are plants that do not have direct connections with the soil and utilize phorophytes just to support. Among the wide variety of epiphytic ferns of the Atlantic Forest, we can mention the species *Elaphoglossum luridum* (Fée) H. Christ. (Dryopteridaceae) and *Vittaria lineata* (L.) Smith (Pteridaceae). Considering the small number of information about the anatomy and physiology of epiphytic ferns, anatomical characterization and studies of different aspects of physiology in both species, were conducted through analysis of: relative water content (RWC), photosynthetic pigments, chlorophyll fluorescence, malate concentration of fronds. Three groups were analyzed: control group, group subjected to water stress and another subjected to exogenous application of abscisic acid (ABA), with the aim of observing important characters for the survival of these species in xeric environments. The botanical material was collected in the Environmental Desterro Park - UFSC (UCAD), Florianópolis, SC. The plants were kept in the greenhouse of the Botany Department - CCB - UFSC. Both species have anatomical features related to xeric conditions, such as coriaceous to chartaceous fronds that present succulence, presence of thick cuticle, epidermal cells with thick external periclinal walls and stomata restricted to the abaxial surface. The physiological analyzes showed a great ability to retain water in *E. luridum* and *V. lineata*, because even under conditions of water stress and exogenous abscisic acid (ABA) application, the species showed no significant changes in the RWC. In the analysis of the concentration of photosynthetic pigments, plants subjected to stress treatments showed significant decreases in levels of chlorophyll *a* and *b*, however the concentrations of

carotenoids were kept stable. The photosynthetic parameters (α , E_{optimum} and ETR_{max}), obtained by rapid light curves (RLC's), showed significant decreases after treatment of water stress and ABA application. In *E. luridum*, we did not find evidence of crassulacean acid metabolism (CAM). In *V. lineata*, the control group showed no difference in malate content of the samples collected between 06h00min and 18h00min, so there was no evidence of CAM metabolism. However, plants subjected to drought stress for seven days and the application of exogenous ABA showed significant increases in concentrations of Δ Malate, demonstrating a nocturnal acidification and revealing an up regulation of CAM metabolism. Thus, we found evidence of the possibility of changing the mode of carbon fixation pathway C3 to CAM in response to water stress and exogenous application of ABA and may, therefore, the species *V. lineata* present the facultative CAM metabolism.

Keywords: *Elaphoglossum luridum*, *Vittaria lineata*, anatomy, RWC, pigments, rapid light curves, malate, ABA, CAM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Elaphoglossum luridum</i> (Fée) H. Christ. a) Habitat natural; b) Cultivo.	23
Figura 2 - <i>Vittaria lineata</i> (L.) Smith. a) Habitat natural. b) Cultivo.	24
Figura 3 – Esporos de <i>Elaphoglossum luridum</i> (a), com superfície ornamentada com cristas (*) e perfurações (seta), e <i>Vittaria lineata</i> (b), com depósitos tendendo à globulares (seta).	47
Figura 4 - Vista frontal da superfície epidérmica da fronde de <i>Elaphoglossum luridum</i> . a, c, d) Em MEV; b) em microscopia óptica. a) Células epidérmicas da face adaxial com paredes periclinais externas convexas (*) e acentuada demarcação da sinuosidade das paredes anticlinais (seta). b) Estômato polocítico na face abaxial, com células-guarda (cg) contornadas por uma célula subsidiária (cs) em forma de ferradura; células com paredes anticlinais sinuosas (seta). c) Células-guarda (cg), delimitando poro em fenda (seta), no mesmo nível das células epidérmicas ordinárias (ce). d) Tricomas do tipo escamas e ramificados (tr) na face abaxial.	48
Figura 5 - Secções transversais de fronde de <i>Elaphoglossum luridum</i> , em microscopia óptica. a) Mesofilo, constituído por parênquima tendendo à paliádico (ptp) e parênquima esponjoso (pe), e epiderme uniestratificada, em ambas faces da folha, adaxial (fad) e abaxial (fab). b) Campos primários de pontoação (setas) na epiderme e nos parênquimas. c) Detalhe dos tecidos adaxiais, com epiderme (ep) delimitada por parede periclinal externa espessa, com pequena quantidade de cutina (reação ao sudan IV– rosada), e cutícula (seta) mostrando forte reação positiva ao sudan (vermelha). d) Tecidos abaxiais, estômato (es) e ampla câmara subestomática (cs). e) Tecidos centrais da raque com meristelo envolvido por um estrato de células com espessamento em U (*). Meristelo formado por feixe	

anficrival, floema (fl) envolvendo o xilema (xi), periciclo (seta preta) e endoderme (seta branca).....	50
Figura 6 - Frondes de <i>Vittaria lineata</i> – a, b) Vistas frontais da superfície epidérmica em MEV, face adaxial (a) e abaxial (b). Nos sulcos lineares (sl) encontram-se os esporângios (seta preta) e as paráfises (seta branca). c, d) Secções transversais da fronde, na região do sulco linear, destacando a presença de estômatos (setas), em microscopia óptica (c) e em microscopia de fluorescência (d); Filtro verde - excitação: 460 – 490 nm; emissão: 520 nm). Estômatos em posição elevada em relação às demais células epidérmicas e amplas câmaras subestomáticas (cs). e) Vista frontal da epiderme, na região lateral do sulco linear - face adaxial da fronde, evidenciando estômatos do tipo polocíticos, com célula subsidiária (*) em forma de ferradura. f) Vista frontal da parede do interior do sulco linear, mostrando tricoma glandular (Tr), em reação positiva ao sudan IV, indicando presença de substância lipídica.	52
Figura 7 - Secções transversais da fronde de <i>Vittaria lineata</i> , em microscopia óptica. a) Aspecto geral mostrando sulcos lineares (sl) na face abaxial, os três meristelos (me) e mesófilo formado por parênquima tendendo à paliádico (ptp) e parênquima esponjoso (pe). b) Detalhe dos tecidos adaxiais evidenciando células epidérmicas (ep) com paredes espessas, duas camadas de células subepidérmicas (se) e parênquima tendendo à paliádico (ptp). c) Epiderme e tecido subepidérmico com paredes espessas. Parede periclinal externa das células epidérmica em tênue reação com sudan (seta branca) e cutícula espessa (seta preta; forte reação ao sudan IV, indicando alta concentração de cutina). d) Detalhe do meristelo central, com xilema (xi) em forma de “V” e contornado por floema (fl).	53
Figura 8 - Conteúdo Relativo de Água (CRA) de frondes de <i>Elaphoglossum luridum</i> submetidas a diferentes tratamentos. Médias seguidas de letras iguais representam	

igualdade entre os tratamentos $p < 0,05$ Média $\pm$ DP ($n = 3$).	61
Figura 9 - Conteúdo Relativo de Água (CRA) de frondes de <i>Vittaria lineata</i> submetidas a diferentes tratamentos. Médias seguidas de letras iguais representam igualdade entre os tratamentos $p < 0,05$ Média $\pm$ DP ($n = 3$).	62
Figura 10 - Concentração de clorofilas e carotenoides em frondes de <i>Elaphoglossum luridum</i> sob diferentes tratamentos: Controle, Estresse hídrico e aplicação de ABA. Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos $p < 0,05$. Média $\pm$ DP ($n = 3$).	65
Figura 11 - Concentração de clorofilas e carotenoides em frondes de <i>Vittaria lineata</i> sob diferentes tratamentos: Controle, Estresse hídrico e aplicação de ABA. Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos $p < 0,05$. Média $\pm$ DP ($n = 3$).	66
Figura 12 - Concentração de clorofilas e carotenoides em frondes de <i>Elaphoglossum luridum</i> e <i>Vittaria lineata</i> sob o tratamento Controle. Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos $p < 0,05$. Média $\pm$ DP ($n = 3$).	69
Figura 13 - Curva Rápida de Luz (RLC) Fotossíntese (ETR) versus Irradiância (E) de <i>Elaphoglossum luridum</i> sob diferentes tratamentos: (●) controle, (□) Estresse Hídrico (Δ) Aplicação de ABA. Média $\pm$ DP ($n = 3$).	73
Figura 14 - Curva Rápida de Luz (RLC) Fotossíntese (ETR) versus Irradiância (E) de <i>Vittaria lineata</i> sob diferentes tratamentos: (●) controle, (□) Estresse Hídrico (Δ) Aplicação de ABA. Média $\pm$ DP ($n = 3$).	76
Figura 15 - Curva Rápida de Luz (RLC) Fotossíntese (ETR) versus Irradiância (E) de <i>Elaphoglossum luridum</i> (curvas em preto) e <i>Vittaria lineata</i> (curvas em cinza) sob diferentes tratamentos: (●) controle, (□) Estresse Hídrico (Δ) Aplicação de ABA. Média $\pm$ DP ($n = 3$).	76

Figura 16 - Flutuação diária (06h00min – 18h00min) na Concentração de Malato em frondes de <i>Elaphoglossum luridum</i> em três diferentes tratamentos: Controle, Estresse Hídrico e aplicação de ABA. Letras iguais acima das barras indicam equidade entre os horários das coletas de um mesmo tratamento $p < 0,05$. Média $\pm$ DP ($n = 3$).	81
Figura 17 - Flutuação diária (06h00min – 18h00min) na Concentração de Malato em frondes dos esporófitos de <i>Elaphoglossum luridum</i> e <i>Vittaria lineata</i> sob o tratamento Controle. Média $\pm$ DP ($n = 3$).	82
Figura 18 - Flutuação diária (06h00min – 18h00min) na Concentração de Malato em frondes de <i>Vittaria lineata</i> em três diferentes tratamentos: Controle, Estresse Hídrico e aplicação de ABA. Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa entre os horários das coletas de um mesmo tratamento $p < 0,05$. Média $\pm$ DP ($n = 3$).	83
Figura 19 - Flutuação diária de Malato (Δ MALATO) em frondes de <i>Vittaria lineata</i> em três diferentes tratamentos: Controle, Estresse Hídrico e aplicação de ABA. Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos $p < 0,05$. Média $\pm$ DP ($n = 3$).	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Parâmetros da Curva Rápida de Luz (RLC) plotadas com ETR (P) versus irradiância (E) em esporófitos de <i>Elaphoglossum luridum</i> , sob diferentes tratamentos: Controle, Estresse hídrico e aplicação de ABA, usando o modelo de curva <i>Waiting-in-line</i> . Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes. (ANOVA seguida por teste de <i>Tukey</i> $p>0,05$). Média $\pm$ DP ($n = 3$).	72
Tabela 2 Parâmetros da Curva Rápida de Luz (RLC) plotadas com ETR (P) versus irradiância (E) em esporófitos de <i>Vittaria lineata</i> , sob diferentes tratamentos: Controle, Estresse hídrico e aplicação de ABA, usando o modelo de curva <i>Waiting-in-line</i> . Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes. (ANOVA seguida por teste de <i>Tukey</i> $p>0,05$). Média $\pm$ DP ($n = 3$).	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- α – Eficiência da fotossíntese
- A - Constante de escalonamento para a altura da curva de fotossíntese
- ABA – Ácido abscísico
- Δ Malato – Diferença entre noite e dia na concentração de malato
- ANOVA – Análise de variância
- APX – Ascorbato peroxidase
- ATP – Adenosina trifosfato
- β – Fotoinibição ou Fotoproteção
- C3 – Metabolismo fotossintético C3
- C4 – Metabolismo fotossintético C4
- ^{14}C – Isótopo do carbono quatorze
- CAM – Metabolismo ácido das crassuláceas
- Car's - Carotenoides
- 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_{optimum} – Irradiância ótima para o transporte de elétrons
- ETR – Taxa de transporte de elétrons
- ETR_{max} – Taxa máxima de transporte de elétrons
- F – Fluorescência
- IRGA – Analisador de gás infravermelho
- K_w - Constante de escalonamento para o eixo X em curva de fotossíntese
- LA - Luz actínica
- LHCII – Complexo antena do fotossistema II
- L-MDH – L-malato-desidrogenase
- LS – Pulso de luz saturante
- $[\text{Malato}]_{\text{dia}}$ – Concentração de malato às 06h00min
- $[\text{Malato}]_{\text{noite}}$ – Concentração de malato às 18h00min
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MF - Massa fresca
- MS – Massa seca
- MT - Massa túrgida

- NAD^+ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NADP - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzido)
- OAA - Oxaloacetato
- P – Medida da fotossíntese
- PAM - Fluorímetro de Amplitude Modulada
- PEG – Polietilenoglicol
- PEP - Fosfoenolpiruvato
- PEPC – Fosfoenolpiruvato carboxilase
- PEPCCK – Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
- qN – Quenching não fotoquímico
- qP – Quenching fotoquímico
- PSI – Fotossistema I
- PSII – Fotossistema II
- ΦPSII - Rendimento quântico efetivo do Fotossistema II
- ETR – Taxa de Transporte de Elétrons
- RFA – Radiação fotossinteticamente ativa
- RFA_{sat} – Radiação fotossinteticamente ativa de saturação da fotossíntese

- RLC – Curva rápida de luz
- ROS – Espécies reativas de oxigênio
- SOD – Superóxido dismutase
- UCAD - Unidade de Conservação Ambiental Desterro
- UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
- UV – Radiação ultravioleta.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XII
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 Local de coleta	36
3.2 Espécies estudadas	36
3.3 Acondicionamento dos esporos	37
3.4 Análise estrutural de esporos e frondes	38
3.5 Análise ultraestrutural de esporos e frondes	39
3.6 Determinação do Conteúdo Relativo de Água (CRA).....	40
3.7 Curvas rápidas de luz (RLC's) através da fluorescência da clorofila <i>a</i> dos esporófitos.	40
3.8 Extração e quantificação dos pigmentos fotossintéticos.....	42
3.9 Análise da concentração de malato foliar	43
3.10 Análise estatística	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 Estrutura e ultraestrutura de esporos	46

4.2 Estrutura e ultraestrutura de frondes.....	47
4.3 Conteúdo Relativo de Água (CRA).....	60
4.4 Pigmentos Fotossintéticos	65
4.5 Curvas rápidas de luz (RLC's) através da fluorescência da clorofila <i>a</i> dos esporófitos.	70
4.6 Análise da concentração de malato foliar	81
5. CONCLUSÕES	91
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Domínio da Mata Atlântica é um ecossistema complexo de grande importância, abrigando uma quantidade significativa da diversidade biológica do Brasil e do mundo (Mittermeier *et al.* 2004). Os altos níveis de riqueza e endemismo, juntamente com a destruição sofrida no passado, incluíram a Floresta Atlântica no cenário mundial como um dos 34 *hot spots* de biodiversidade (Mittermeier *et al.* 2004). Estima-se que 95% da Floresta Atlântica estão localizados em território brasileiro e o restante dividido entre argentinos e paraguaios (Tabarelli *et al.* 2005).

Segundo Myers *et al.* (2000), a riqueza da Floresta Atlântica foi estimada em 20 mil espécies de plantas vasculares, sendo oito mil endêmicas. Esses números são utilizados como referência no estudo da diversidade vegetal encontrada nessa floresta, possibilitando a comparação da riqueza e endemismo em uma escala planetária Myers *et al.* (2000). Apesar do substantivo aumento do conhecimento acerca da flora da Floresta Atlântica, podemos considerá-lo ainda insuficiente, visto que, em menos de duas décadas, mais de 1.000 novas espécies de angiospermas foram descobertas, representando 42% do total descrito para o Brasil neste período (Sobral & Stehmann 2009).

São reconhecidas para o Domínio Atlântico, 15.782 espécies distribuídas em 2.257 gêneros e 348 famílias (Stehmann *et al.* 2009), o que corresponde a cerca de 5% da flora mundial, estimada atualmente em 300.000 espécies (Judd *et al.* 2009). Do total de gêneros e espécies, 132 (6%) e 7.155 (45%) respectivamente, são endêmicos. As briófitas estão representadas por 1.230 espécies, as pteridófitas por 840, as gimnospermas por 4 e as angiospermas por 13.708. As plantas vasculares somam 14.552, das quais 6.933 são endêmicas (Stehmann *et al.*

2009). Esses números confirmam ser a Floresta Atlântica o quinto *hot spot* mais rico em endemismo, ficando atrás dos Andes (15.000 espécies), Sunda (15.000), Bacia do Mediterrâneo (11.700), Madagascar e Ilhas do Oceano Índico (11.600) (Myers *et al.* 2000, Mittermeier *et al.* 2004).

A grande perda de habitats, juntamente com a fragmentação deste Domínio, deixou poucos ecossistemas extensos e intactos, o que pode gerar sérias consequências na manutenção das espécies em longo prazo (Ribeiro *et al.* 2009). Desde os tempos da colonização européia, as interferências antrópicas fizeram com que a vegetação natural da Floresta Atlântica fosse reduzida para valores preocupantes. Estima-se que a área original cobria aproximadamente 1.500.000 km², estendendo-se por mais de 3.000 km ao longo da costa leste do Brasil (Morellato & Haddad 2000). Dados atuais indicam que restam aproximadamente 10% da vegetação original (Ribeiro *et al.* 2009). Segundo Liebsch *et al.* 2008, os fragmentos que restam possuem tamanho reduzido e são biologicamente pobres.

O grupo das pteridófitas possui ampla distribuição mundial, sendo que essas plantas desenvolveram adaptações marcantes em meios extremos, sendo encontradas nos mais distintos ambientes (Rathinasabapathi, 2006). Muitas espécies são cosmopolitas, e vivem preferencialmente nas regiões tropicais do mundo, em locais úmidos e sombreados das matas (Rathinasabapathi, 2006). Segundo Tryon & Tryon (1982), calcula-se que no mundo ocorram cerca de 9.000 espécies de pteridófitas, concentrando-se nas Américas cerca de 3.250 desse montante. Já Ross (1996) aceita um número total de espécies substancialmente maior, por volta das 12.500 espécies. Prado (2003) verificou a existência de aproximadamente 13.000 espécies de pteridófitas em todo o mundo, das quais mais de 1.200 pertencem a

Lycophyta (Judd *et al.* 2009) e cerca de 11.500 a Monilophyta (Pryer *et al.* 2004).

As pteridófitas constituem um importante grupo de organismos da flora brasileira, muito dependentes de condições climáticas presentes na Floresta Atlântica, como umidade relativa do ar elevada e temperaturas amenas (Prado 2003).

Windisch (1992) menciona que das espécies neotropicais, cerca de 30% podem ser encontradas em território brasileiro. Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil ocorrem centros de endemismo e especiação de pteridófitas no Continente Sul-Americano, que são habitados por aproximadamente 600 espécies (Tryon 1972). Sehnem (1977) citou a ocorrência de 493 espécies de pteridófitas para a Região Sul do Brasil (Estado do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul).

Há aproximadamente 350 milhões de anos (Carbonífero), as pteridófitas dominavam o ambiente terrestre (Collinson 1996). Atualmente, seus fósseis se distribuem por todo mundo em uma grande diversidade de habitats (Page 2002). Conhecidas como samambaias e plantas afins, as pteridófitas são plantas vasculares sem flores nem sementes, que se reproduzem por esporos, com marcada alternância de duas gerações em seu ciclo de vida e se destacam como um dos primeiros grupos a conquistar o ambiente terrestre, devido à presença de um sistema vascular para a condução de água e nutrientes (Tryon & Tryon 1982).

Nas regiões tropicais, as pteridófitas podem ocupar os mais diversos ambientes, desde o nível do mar até quase o limite da vegetação altimontana (Page 1979; Windisch 1992). Para ocupar essa diversidade de ambientes, as pteridófitas apresentam diferentes formas biológicas, incluindo quase todas as formas de crescimento e de adaptações das angiospermas (Holttum 1938). As florestas apresentam alta diversidade de pteridófitas, especialmente, nas montanhas tropicais, que são ambientes

frescos e úmidos, excelentes para a ocorrência dessas plantas (Tryon 1985). No sul do Brasil, a maior diversidade de pteridófitas é encontrada em áreas florestais, sendo que a floresta ombrófila densa e a floresta ombrófila mista são as que apresentam maior riqueza específica (Sehnem 1979).

Constituem um grupo de plantas bastante importante e com aspectos ecológicos bem diversificados (Lehn *et al.* 2002). Elas apresentam uma gama de adaptações, incluindo plantas terrícolas, epífitas, hemiepífitas, rupícolas, aquáticas, escandentes, variando desde plantas minúsculas com alguns milímetros de comprimento até formas arborescentes atingindo 20 metros. (Lehn *et al.* 2002). Cada uma destas situações específicas requer características morfológicas, anatômicas e fisiológicas adequadas (Windisch 1992).

Segundo Madison (1977), epífitas são plantas que não possuem conexões diretas com o solo, utilizam-se de suporte, mas não nutrientes, dos forófitos em que se apoiam. 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 (forófito), obtendo nutrientes diretamente da umidade atmosférica, sem emitir estruturas haustoriais (Bennett 1986). Apesar de não serem parasitas, já foram chamadas de “piratas de nutrientes” e “ervas daninhas”, pelo fato de que, em alguns casos, prejudicarem os forófitos em que vivem (competição por luz e peso nos galhos).

Schimper (1888) foi um dos primeiros pesquisadores a trabalhar com a flora vascular epifítica neotropical, e sugeriu que as reduções da umidade ambiental juntamente com o aumento da estação seca provocam a redução da riqueza da flora vascular epifítica.

As epífitas compõem aproximadamente 10% de toda a flora vascular (Kress, 1986). São encontradas quase que exclusivamente em florestas tropicais, onde chegam a

representar 25% das espécies. (Nieder *et al.* 2001). Uma vez que as epífitas apresentam adaptações à vida acima do solo, sua dependência no meio ambiente é maior do que seus correspondentes terrestres (Engwald *et al.* 2000). A importância ecológica do epifitismo nas comunidades florestais consiste basicamente na manutenção do equilíbrio e diversidade biológica (Benzing 1995). Espécies epífitas proporcionam recursos alimentares e microambientes especializados para a fauna do dossel, através do armazenamento de consideráveis quantidades de biomassa associada à retenção de água e detritos tendo, portanto, grande desempenho na produtividade primária e ciclagem de nutrientes, além de funcionarem como bioindicadores (Nadikarni 1985; Benzing 1995).

O dossel das árvores oferece às epífitas mais luz em comparação aos estratos inferiores como o bosque e o sub-bosque, porém uma série de limitações fisiológicas são relevantes: por exemplo, a relativa escassez de nutrientes devido à menor quantidade de substrato no dossel quando comparado com o chão da floresta, a instabilidade do substrato, e acima de tudo, o estresse hídrico causado por secas recorrentes (Luttge *et al.* 1986). Este fato explica a preferência das epífitas pelos ambientes tropicais e subtropicais do planeta.

Dentre a grande variedade de pteridófitas epífitas da Mata Atlântica, encontramos a espécie *Elaphoglossum luridum* (Fée) Christ., espécie da família Dryopteridaceae, pertencente ao gênero *Elaphoglossum* (Smith *et al.* 2006). Espécie com hábito epífita; folhas simples, inteiras, dimorfas; lâmina linear; soros acrosticóides. A lâmina estéril possui escamas em ambas as faces, principalmente na abaxial; possui uma característica cartácea a subcoriácea. A margem da lâmina estéril é plana, o ápice é obtuso a arredondado. Ocorre preferencialmente em bosques úmidos, sobre grandes árvores e troncos caídos. O gênero *Elaphoglossum* é conhecido como um dos maiores, contendo aproximadamente 600 espécies, a maioria no

Neotrópico, sendo 85% das espécies, epífitas (Tryon e Tryon 1982). O nome do gênero deriva do Grego *elaphos* (veado) + *glossa* (língua). As frondes se assemelham a uma língua de veado



Figura 1 - *Elaphoglossum luridum* (Fée) H. Christ. **a)** Habitat natural; **b)** Cultivo.

Outra pteridófita epífita nativa da Mata Atlântica é a espécie *Vittaria lineata* (L.) Smith, espécie da família Pteridaceae, pertencente ao gênero *Vittaria* (Smith *et al.* 2006). Espécie exclusivamente com hábito epífito; pecíolos ausentes; folhas laminares (10 – 50 cm), simples, pêndulas; soros lineares, em uma fileira entre a ráquis e a margem; esporos monoletes. Conhecida popularmente como “Samambaia Cordão de Sapato”, esta espécie cresce preferencialmente em bosques úmidos como epífitas, sobre troncos ou no dossel (Tryon & Tryon 1982). Devido a sua beleza e rusticidade, possui interesse ornamental, sendo bastante utilizada em jardins particulares.



Figura 2 - *Vittaria lineata* (L.) Smith. a) Habitat natural. b) Cultivo.

A determinação do conteúdo relativo de água (CRA) é comumente utilizada para avaliar as condições hídricas de um vegetal. A quantidade de água da folha é um indicador do balanço hídrico da planta, uma vez que indica a quantidade relativa de água presente em seus tecidos e por consequência, podem determinar a massa seca (Slatyer & Taylor 1960). Medições do teor de água baseadas em massa fresca e seca de um tecido têm sido substituídas, principalmente, por equações que incluem medidas com base na quantidade máxima de água que um tecido é capaz de reter, denominada massa túrgida (Barrs 1968). Essas medidas 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 espécie, pois a taxa de absorção de água pelas folhas é diferente entre elas (Yamasaki & Dillenburg 1999). Estes ajustes relacionam-se principalmente à duração e as condições ambientais do período de embebição, necessário para a obtenção da massa túrgida (Yamasaki & Dillenburg 1999).

As clorofilas e os carotenoides são pigmentos presentes nos vegetais, cuja abundância varia de acordo com a espécie (Seiferman-Harms 1987). Estes pigmentos são capazes de absorver a radiação visível, processo essencial para a sobrevivência vegetal e por este motivo denominado metabolismo primário (Seiferman-Harms 1987).

As clorofilas são pigmentos fundamentais para a sobrevivência vegetal, responsáveis pela cor verde característica da maioria das plantas terrestres e também pela captação de radiação solar, que durante o processo de fotossíntese, é convertida em energia química redutora na forma de ATP e NADPH. A sua deficiência pode ser facilmente detectada através da palidez foliar, gerando uma considerável redução nas taxas fotossintéticas e, conseqüentemente, no metabolismo primário (Marengo 2005).

O tecido fotossintético mais ativo das plantas superiores é o mesofilo (Taiz & Zeiger 2010). As células presentes no mesofilo possuem grandes quantidades de cloroplastos, os quais contêm os pigmentos especializados na absorção da luz, as clorofilas e os carotenoides (Taiz & Zeiger 2010).

A clorofila *a* está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica, participando do primeiro estágio do processo de fotossíntese, que envolve a conversão da energia luminosa em energia química, enquanto 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). A energia absorvida pelos diferentes pigmentos pode ser transferida para a clorofila *a* durante o processo de fotossíntese e ainda, os carotenoides têm a função de proteger as moléculas de clorofilas contra a foto-oxidação sob irradiância intensa (Duarte 2003).

As clorofilas do tipo *a* e *b* são abundantes nas plantas verdes, enquanto as do tipo *c* e *d* são comumente encontradas em alguns protistas e cianobactérias (Taiz & Zeiger 2010). A maioria das plantas contém aproximadamente de duas a três vezes mais clorofila *a* do que clorofila *b*, presentes nas folhas de plantas vasculares e nas algas verdes (Taiz & Zeiger 2010). Todas as clorofilas possuem uma complexa estrutura em anel, sendo quimicamente comparadas com os grupos tipo porfirina encontradas na hemoglobina e nos citocromos, também possuem uma longa cauda de hidrocarbonetos quase sempre ligada a estrutura do anel, responsável pela ligação da clorofila à porção hidrofóbica do seu ambiente (Taiz & Zeiger 2010).

Já os diferentes tipos de carotenoides são encontrados em todos os organismos fotossintéticos e em sua maioria são moléculas lineares, com cadeias conjugadas, cujos picos de absorção se encontram na região dos 400 a 500 nanômetros, originando uma coloração alaranjada característica (Taiz & Zeiger 2010). Estes pigmentos constituem integralmente as membranas dos tilacóides e encontram-se associados aos pigmentos proteicos das antenas e aos centros de reação (Taiz & Zeiger 2010). A radiação luminosa absorvida pelos carotenoides é transferida para as moléculas de clorofila portanto, são chamadas de pigmentos acessórios. Além da função como pigmento acessório, os carotenoides desempenham um papel essencial na fotoproteção, liberando o excesso de energia antes que possa danificar o organismo (Taiz & Zeiger 2010).

A faixa espectral absorvida para desencadear o processo fotossintético é dependente do pigmento em questão. A clorofila possui dois picos de absorção máxima nas faixas do azul e vermelho (400 a 700 nm), o mesmo espectro de ação para a fotossíntese (Hall & Rao 1980). Os pigmentos acessórios, como os carotenoides, possuem o pico de absorção na faixa do azul e do ultravioleta (Wellburn 1994). A combinação das clorofilas (*a* e *b*) e dos carotenoides capacita as plantas a captarem a maior parte de energia luminosa, sendo esta absorção, um dos fatores que podem limitar a eficiência fotossintética das plantas, o crescimento e a adaptabilidade aos diferentes habitats e ambiente (Engel & Poggiani 1991).

A análise da fluorescência da clorofila vem se demonstrando uma metodologia muito relevante para fisiologistas e ecofisiologistas de plantas. A fluorescência emitida pela clorofila *a* pode ser utilizada como uma ferramenta muito eficiente para medições de diversos parâmetros fotossintéticos, principalmente para realização de diversas 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 transferência de elétrons, 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 (Taiz & Zeiger 2010). Quando as moléculas de clorofila absorvem energia luminosa, elas alteram transitariamente as suas configurações eletrônicas ao nível atômico. Estes pigmentos fotossintéticos se alteram do estado basal (Chl *a*) para o estado excitado, o singlete 1 (Chl *a**) (Taiz & Zeiger 2010). Este estado excitado possui vida muito curta ($\approx 10^{-8}$ s) e é muito instável (Taiz & Zeiger 2010). Assim, após receberem a energia dos fótons, estes pigmentos

dissipam a energia proveniente da luz através de três vias de dissipação (desexcitação) do estado singlete 1 (Chl a^*) (Taiz & Zeiger 2010).

Em uma folha, a energia da luz absorvida pelas moléculas de clorofila pode seguir três diferentes destinos: pode ser usada para conduzir a fotossíntese (energia fotoquímica), o excesso de energia pode ser dissipado na forma de calor e também a energia pode ser reemitida como fluorescência (Maxwell & Johnson 2000). 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 (Maxwell & Johnson 2000). Assim, medindo-se a emissão de fluorescência da clorofila, informações sobre as alterações na eficiência fotoquímica e na dissipação de calor podem ser obtidas.

Embora a quantidade total de fluorescência da clorofila é muito pequena (1 ou 2% do total da luz absorvida), as medições podem ser realizadas com facilidade (Maxwell & Johnson 2000). O espectro da fluorescência é diferente do espectro da luz absorvida, pois o pico de emissão de fluorescência possui um comprimento de onda maior do que o da luz absorvida (Maxwell & Johnson 2000). Portanto, o rendimento de fluorescência pode ser quantificado, expondo-se uma folha à luz de comprimentos de onda definidos e medindo-se a quantidade de fluorescência emitida.

Os fluorímetros de amplitude modulada, comumente chamados de PAM, fornecem um modo para realizar medições rápidas e precisas de diversos parâmetros fotossintéticos associados à fluorescência da clorofila *a* (Genty *et al.* 1989; Krause & Weis 1991; Bilger *et al.* 1995; Gloag *et al.* 2007).

Segundo Ritchie (2008), a utilização de curvas rápidas de luz (RLC), fotossíntese (P) *versus* irradiância (E) é mais simples para análise de fotossíntese quando comparada às análises utilizando-se eletrodo de oxigênio,

fixação do ^{14}C ou o analisador de gás infravermelho (IRGA).

De acordo com White & Critchley (1999), análises que utilizam curvas rápidas de luz são muito úteis na investigação do aparato fotossintético das plantas. A análise pelas curvas rápidas de luz é a única técnica disponível atualmente que pode investigar a aclimação do aparato fotossintético ao escuro e sua resposta às exposições crescentes de luz (White & Critchley 1999). Esta metodologia analisa variações na fluorescência em resposta aos pulsos com intensidades crescentes de luz, possibilitando estimar a Taxa de Transporte de Elétrons (ETR) entre outros parâmetros fotossintéticos. (Van Kooten & Snel 1990; Krause & Weis 1991; Gloag *et al.* 2007).

A avaliação da fluorescência da clorofila *a* do Fotossistema II (PSII) tem sido um método de fácil execução e muito eficaz na determinação dos mecanismos da fotossíntese e no estudo da influência de diferentes condições ambientais nas reações fotossintéticas (White & Critchley 1999). Nos cloroplastos, após ser absorvida pelo complexo antena (LHCII), a energia luminosa excita as clorofilas *a* do centro de reação do PSII, alterando temporariamente suas configurações eletrônicas (Taiz e Zeiger, 2010). Durante a excitação, estes pigmentos passam do estado basal (Chl *a*), para um estado denominado singleto 1 (Chl *a**), que possui um nível de energia mais alto (Taiz e Zeiger, 2010). Este estado de alta energia é instável e de vida curta, assim, após a excitação, esta molécula retorna ao seu orbital inicial, e a energia proveniente da luz é dissipada por meio de três vias de decaimento energético. Estas vias são denominadas: dissipação fotoquímica (qP), onde a energia luminosa é utilizada nos processos fotoquímicos da fotossíntese; dissipação não fotoquímica (qN) onde ocorre a produção de calor na forma de radiação infravermelha; e a fluorescência (F) onde ocorre a emissão de radiação na

região do visível (Taiz e Zeiger, 2010). Portanto, a fluorescência representa a radiação emitida durante o decaimento energético dos pigmentos que foram excitados pela absorção da radiação visível (RFA) ou radiação UV. Segundo Krause & Weis (1991), em temperatura ambiente, a fluorescência é uma luz emitida que exibe dois pontos de emissão, o principal na faixa de 682 nm e outro ponto menos pronunciado na faixa de 740 nm.

Os três métodos de dissipação da energia luminosa pelas moléculas de clorofila são concorrentes, assim, alterações nos processos fotoquímicos da fotossíntese (qP) e/ou na dissipação de calor (qN) causarão alterações complementares na emissão da fluorescência (F) (Efeito Kautsky) (Krause & Weis 1991). Sendo assim, diferenças na emissão da fluorescência podem evidenciar alterações no processo de fotossíntese.

O quenching de fluorescência pode ser medido através da utilização de um fluorímetro de pulso com amplitude modulada – PAM, através da determinação da fluorescência com base na cinética de relaxamento. A utilização desta técnica também permite a elaboração de Curvas Rápidas de Luz (RLC), na qual variações na fluorescência emitida em resposta aos crescentes pulsos de luz podem estimar a Taxa de Transporte de Elétrons (ETR) do PSII (White & Critchley 1999). Segundo Beer *et al.* (1998), a ETR medida por meio de um fluorímetro de pulso com amplitude modulada é intimamente relacionada à atividade fotossintética mensurada em equipamentos que determinam as trocas gasosas realizadas pelas plantas. A obtenção de RLC's (Fotossíntese *versus* Irradiância) é muito fácil quando comparada ao tempo despendido e as rotinas necessárias para a obtenção de dados semelhantes através de medições utilizando eletrodos de oxigênio, fixação do ^{14}C ou os métodos com analisadores de gás infravermelho (IRGA) (Ritchie 2008).

Muitas plantas que habitam regiões áridas ou locais com restrições hídricas recorrentes apresentam um

mecanismo diferenciado para a concentração de CO₂ no local de ação da Rubisco (Taiz & Zeiger 2010). Semelhante ao mecanismo C₄, a via de fotossíntese CAM parece ter surgido durante os últimos 35 milhões de anos para capturar o CO₂ atmosférico e sequestrar o CO₂ respiratório em ambientes áridos (Taiz & Zeiger 2010). Esta importante variação na fixação do carbono fotossintético foi nomeada historicamente de metabolismo ácido das Crassuláceas (CAM), devido ao fato da primeira observação ter sido realizada em *Bryophyllum calycinum* (Lam.) Pers., uma espécie da família Crassulaceae (Cushman & Borland 2002).

Uma das mais importantes adaptações de algumas samambaias epífitas ao déficit hídrico é a via do metabolismo ácido das Crassuláceas (CAM), que permite a assimilação do CO₂ mesmo em condições de estresse hídrico e alta irradiância (Benzing 1986; Kluge *et al.* 1989). As plantas CAM desenvolveram uma estratégia metabólica em que a absorção noturna de CO₂ ocorre com o aumento da umidade relativa do ar, quando os estômatos estão abertos durante o período noturno. Desta forma, as plantas CAM, apresentam um tipo muito específico de concentração do CO₂ atmosférico, permitindo o aumento da eficiência no uso da água (Taiz & Zeiger, 2010). O CO₂ atmosférico entra no mesófilo foliar através dos estômatos, abertos predominantemente à noite, e é fixado na reação catalisada pela fosfoenolpiruvatocarboxilase (PEPC), no citosol, onde ela representa um ponto chave no controle da fixação do CO₂ e se combina com fosfoenolpiruvato (PEP) para formar oxaloacetato (OAA) (Lüttge 1993 e Nimmo 2000). O ácido fosfoenol-pirúvico (PEP) utilizado como substrato para esta reação é derivado do metabolismo noturno de açúcares (Taiz & Zeiger 2010). O OAA resultante da atividade da PEPC é reduzido ao ácido málico, que é acumulado no vacúolo durante a noite (Taiz & Zeiger 2010). O ácido málico sintetizado durante a noite é removido do citosol e transportado para os vacúolos

(Taiz & Zeiger 2010). Durante a transição noite-dia, os estômatos fecham-se gradualmente e ocorre um efluxo de malato dos vacúolos, que é descarboxilado pela NAD(P) – enzima málica [NAD(P)-ME] ou através de formação de OAA, através da malato desidrogenase e sua descarboxilação por PEP carboxiquinase (PEPCK) originando piruvato ou PEP e CO₂ (Lüttge 1993; Black & Osmond 2003). Em consequência destes processos, ocorrem mudanças diurnas (noite/dia) no conteúdo de ácido málico (Δ malato) (Taiz & Zeiger 2010).

Devido à natureza temporal destes mecanismos, muitas plantas CAM crescem em regiões áridas do mundo (Winter & Smith 1996). Além disso, mais espécies CAM, principalmente com hábito epifítico, têm sido encontradas em áreas tropicais e subtropicais com chuvas recorrentes (Winter & Smith 1996). Isso não é surpreendente, dado que o estresse hídrico é frequentemente suportado por plantas epífitas durante os períodos de estiagem (Benzing 1990).

O metabolismo CAM se caracteriza pelos diferentes eventos bioquímicos em pontos específicos do ritmo circadiano (Dodd *et al.* 2002). As plantas que realizam a fixação do carbono através do metabolismo CAM, demonstram um padrão diurno de expressão e regulação de algumas enzimas envolvidas na fixação, como por exemplo, PEPC, PEPCK, Rubisco, além de exibirem oscilações nos níveis de malato, armazenado nos vacúolos (Niewiadomska *et al.* 1999). As oscilações durante o fotoperíodo podem ser consideradas como um indicador do funcionamento do metabolismo CAM (Lüttge 1993).

Este metabolismo tem sido descrito para espécies terrestres, rupícolas, epífitas e aquáticas, em 328 gêneros de 33 famílias que incluem 28 famílias de angiospermas (Magnoliophyta), uma família na Gnetopsida, duas famílias na Filicopsida, e uma família no Lycopodiopsida (Smith & Winter 1996). Não está claro porque a incidência

do metabolismo CAM em samambaias tropicais epífitas é baixa em relação a outras espécies similares de plantas vasculares que habitam os mesmos locais (Benzing 1990). Holtum & Winter (1999) enfatizaram que a ocorrência do metabolismo CAM em samambaias epífitas é mais comum do que se imagina, porém este metabolismo tem sido pouco estudado nessas plantas.

Atualmente, diferentes metodologias estão sendo utilizadas para a determinação do tipo de metabolismo fotossintético de uma planta. Ensaio bioquímicos e anatômicos podem ser realizados, como análise de suculência foliar, testes hormonais, isótopo do ^{13}C , acidez titulável, assimilação do carbono, testes enzimáticos entre outros (Neales & Hew 1975; Tamaki & Mercier 1997; Silveira *et al.* 2005). As plantas CAM acumulam ácidos orgânicos (H^+) (principalmente o malato) durante o período noturno para posteriormente utilizá-los durante o dia, portanto, quanto maior a diferença entre os dois períodos, maior será a tendência da planta ao metabolismo CAM (Taiz & Zeiger 2010).

O mecanismo enzimático para a detecção de malato é simples, rápido, confiável e vem sendo muito utilizado em trabalhos científicos buscando a determinação do metabolismo fotossintético de plantas (Pierce *et al.* 2002; Rut *et al.* 2008).

O estresse hídrico é considerado um dos mais prejudiciais e recorrentes estresses abióticos que afetam as plantas (Benzing 1990). Este fato é compreensível devido à inconstância dos eventos de precipitação. Para sobreviver a tais condições, algumas plantas desenvolveram mecanismos que lhes permitem perceber rapidamente a presença de condições adversas e instantaneamente provocar alterações fisiológicas em resposta ao estresse (Benzing 1990). Exemplos deste mecanismo é a capacidade das plantas em regular a perda de água através do fechamento parcial/total dos estômatos e também a redução no desenvolvimento foliar, eventos estes que

precedem perdas substanciais de turgescência foliar e danos irreversíveis nas membranas internas (Cowan 1982). O hormônio vegetal ácido abscísico (ABA) desempenha um papel fundamental na regulação destas respostas (Taiz & Zeiger 2010). O ABA é definido como um hormônio de estresse devido a sua rápida acumulação em resposta aos diferentes tipos de estresse, e consequentemente sua mediação ajuda na sobrevivência das plantas sob tais condições (Taiz & Zeiger 2010).

O ABA é um composto terpenóide de quinze carbonos, produzido pela clivagem de um carotenoide de quarenta carbonos e é sintetizado nas células que contêm plastídios e transportado através do xilema e floema (Taiz & Zeiger 2010).

A aplicação de ácido abscísico (ABA) exógeno é bastante utilizada em estudos de fisiologia do estresse sob diferentes aspectos: indução do metabolismo CAM em plantas CAM facultativas, substituindo o estresse hídrico e salino (Chu *et al.* 1990); na análise dos efeitos do ABA sobre a estabilidade das membranas, conteúdo de pigmentos fotossintéticos e no conteúdo relativo de água (Gadallah 1995), entre outros.

Devido à escassez de estudos e a importância ecológica das samambaias epífitas da Mata Atlântica, este trabalho pretende contribuir com conhecimento na área anatômica e fisiológica destas plantas. Diversas espécies encontradas em ambientes tropicais apresentam estratégias de sobrevivência extremamente relevantes e que nunca foram estudadas. A fim de melhor caracterizar os mecanismos de tolerância ao estresse em samambaias epífitas, foram realizados estudos de aspectos anatômicos, bioquímicos e fisiológicos associados a algumas situações de estresses em esporófitos de *Elaphoglossum luridum* e *Vittaria lineata*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar aspectos morfofisiológicos de duas espécies de samambaias epífitas da Mata Atlântica - *Elaphoglossum luridum* (Fée) Christ e *Vittaria lineata* (L.) Smith

2.2 Objetivos específicos

Em amostras de *Elaphoglossum luridum* e *Vittaria lineata*:

- Analisar a estrutura e ultraestrutura de esporos;
- Analisar a estrutura e a ultraestrutura de frondes;
- Determinar o conteúdo relativo de água (CRA) de frondes;
- Determinar conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Clorofila *a*, *b* e carotenóides) de frondes;
- Avaliar a Taxa de Transporte de Elétrons (ETR) de esporófitos, através de curvas rápidas de luz (RLC);
- Verificar a presença de acidificação noturna através de análises dos teores de malato nas frondes as 06h00min e 18h00min.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de coleta

Indivíduos de *Elaphoglossum luridum* (Fée) H. Christ. e *Vittaria lineata* (L.) Smith utilizadas no presente estudo foram coletadas do habitat natural na Unidade de Conservação Ambiental Desterro (UCAD). A unidade é administrada pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), situada no noroeste da Ilha de Florianópolis, Santa Catarina (sede - 27° 31'50"S 0,8; 48° 30'44 0,3"W, área – 495 hectares, cerca de 1% da área da ilha). Nos locais de coleta foram feitas medições instantâneas de irradiância com auxílio de um sensor LI-190 (LI-COR Instruments, EUA), conectado ao LI-250 Light meter (LI-COR Instruments, EUA).

3.2 Espécies estudadas

Foram coletados indivíduos adultos (= férteis) das espécies *Elaphoglossum luridum* (Fée) H. Christ e *Vittaria lineata* (L.) Sm. A espécie *Elaphoglossum luridum* pertencente à família Dryopteridaceae, ordem Polypodiales e classe Polypodiopsida. *Vittaria lineata* pertence à família Pteridaceae, ordem Polypodiales e classe Polypodiopsida (Smith *et al.* 2006). Os indivíduos das duas espécies foram transportados para casa de vegetação do Departamento de Botânica da Universidade federal de Santa Catarina, onde foram cultivados. Amostras do material vegetal foram herborizadas e depositadas no Herbário FLOR (UFSC, Florianópolis, SC) sob os números: 18264 (*Elaphoglossum luridum*) e 19712 (*Vittaria lineata*).

Ambas espécies foram aclimatadas por um período mínimo de seis meses na casa de vegetação do

Departamento de Botânica da UFSC, entre maio a novembro de 2011. As plantas foram amarradas em troncos e colocadas em suportes pendurados nas paredes. Durante o período de realização do trabalho a temperatura da casa de vegetação durante o dia variou de 20 a 30 °C e durante o período noturno se manteve em torno de 15 °C. A umidade relativa do ar foi monitorada e variou entre 50 e 80%. A densidade de fluxo de fótons dentro da estufa alternou entre 43 a 85 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ RFA. A irradiância (PAR) foi medida na região mediana das plantas, entre ápice e raiz, com um sensor LI-190 (LI-COR Instruments, EUA), conectado ao LI-250 Light meter (LI-COR Instruments, EUA), colocado junto às plantas. As plantas foram diariamente irrigadas com água destilada, mantendo sempre uma alta umidade. Uma vez por semana, foram irrigadas com uma solução de Hoagland's (20%) (v/v) (Hoagland e Arnon, 1938). Para a realização dos experimentos fisiológicos, após o período de aclimação, por no mínimo seis meses (Ong *et al.* 1986), as plantas foram divididas em três grupos experimentais, cada um submetido a uma condição diferente de cultivo: 1) plantas controle irrigadas diariamente por duas semanas, 2) plantas submetidas ao estresse hídrico por um período de uma semana (sem irrigação) e 3) plantas irrigadas 5 vezes por semana com solução de Ácido Abscísico 10 μM (ABA) por um período de quinze dias.

3.3 Acondicionamento dos esporos

Após as coletas, frondes férteis de *Elaphoglossum luridum* e *Vittaria lineata* 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 de *Elaphoglossum luridum* e *Vittaria lineata* armazenados sob refrigeração a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ foram depositados entre lâmina e lamínula, com água, e analisados por meio de microscopia óptica (Leica DM2500).

Para análise estrutural das frondes *in vivo*, foram realizadas diafanizações, secções transversais, longitudinais e paradérmicas, à mão livre, com lâmina 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 testar os compostos fenólicos (Johansen 1940), Sudan IV para substâncias lipofílicas (Gerlach 1984) e floroglucinol acidificado para a lignina (Costa 1982). A contagem estomática foi realizada em triplicata através da dissociação da epiderme, delimitando-se dez campos aleatórios na região mediana da face abaxial, desprezando possíveis danos e nervuras das frondes. Posteriormente, para cada um destes campos foi realizado o teste de médias por meio do programa Microsoft Excel. A contagem estomática foi obtida em objetiva de 20x, com o auxílio de um microscópio óptico Leica DM2500, com registros de imagens capturadas com câmera fotográfica digital (Leica DFC295).

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. As amostras emblocadas em PEG foram seccionadas em micrótomo de rotação Leica RM 2125 RT, coradas com Safrablue (Bukatsh 1972) e Azul de toluidina (O' Brien *et al.* 1964). 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, com 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. O microscópio possui um sistema de iluminação de vapor de mercúrio (HBO 100) e uma câmera fotográfica digital QColor 3C (Q-imaging).

3.5 Análise ultraestrutural de esporos e frondes

Esporos armazenados sob refrigeração a 7 ± 1 °C foram colados em suporte de alumínio com fita de carbono dupla face. Amostras das frondes, previamente fixadas, como referido no item anterior, 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 - CED 030. As análises e documentações das amostras foram efetivadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL JSM – 6390LV).

3.6 Determinação do Conteúdo Relativo de Água (CRA)

Indivíduos adultos (=fértil) de *Elaphoglossum luridum* e *Vittaria lineata* submetidos aos três diferentes tratamentos: 1) Controle, 2) Estresse hídrico e 3) aplicação de ABA 10 μ M (Freschi *et al.* 2010a), tiveram seus Conteúdos Relativos de Água determinados segundo Barrs (1968). Após cada tratamento, discos foliares, perfazendo 1g de massa fresca para cada replicata foram retirados. Então, foram colocados em frascos tipo Becker contendo água destilada durante 180 minutos (20 μ mol m⁻² s⁻¹ RFA, 25 $\pm$ 2 °C) para a obtenção da massa túrgida (MT). Em seguida, os segmentos foliares foram secos em estufa (60 °C) durante 24 horas, e então pesados para a obtenção da massa seca (MS). Os CRA das espécies foram calculados em folhas adultas, completamente expandidas e expressos por $CRA = [(MF - MS)/(MT - MS)] * 100$. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.7 Curvas rápidas de luz (RLC's) através da fluorescência da clorofila *a* dos esporófitos.

A emissão de fluorescência da clorofila *a* dos esporófitos de *Elaphoglossum luridum* e *Vittaria lineata* foi avaliada com auxílio de um fluorímetro de pulso com amplitude modulada (Diving PAM, Underwater Fluorometer; Walz, Effeltrich, Germany), equipado com uma fibra óptica de 5,5 mm de diâmetro e um díodo azul (470 nm) como fonte de luz.

Para os três tratamentos: 1) controle, 2) estresse hídrico e 3) aplicação de ABA 10 μ M, esporófitos adultos foram previamente aclimatados por 25 minutos ao escuro. Os experimentos foram realizados em triplicatas (n = 3), sendo que dez curvas rápidas de luz foram feitas em amostras independentes de cada uma das espécies

estudadas, totalizando trinta curvas de fotossíntese por tratamento. O Diving PAM utiliza um grampo magnético para dar suporte às folhas posicionado cerca de um 1,0 mm a partir da extremidade do feixe de luz. Usando a opção “Rapid Light Curve” (RLC), as curvas de luz foram obtidas com a aplicação de uma série de oito pulsos de luz saturante (LS), cada um deles seguidos de uma exposição de luz actínica (LA) crescente ($2 - 2250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ RFA). Os parâmetros do PAM (ETR) foram calculados utilizando o software WINCONTROL (V.3.18) (WALZ, Germany) usando as configurações padrão para curva rápida de luz (RLC) (Walz, Effeltrich, Germany) (Genty *et al.* 1989). A taxa de transporte de elétrons (ETR) é uma estimativa da fotossíntese bruta e é definida como: $\text{ETR} = \Phi\text{PSII} \cdot \text{RFA} \cdot (0,5) \cdot (0,84)$, onde, ΦPSII é o rendimento quântico efetivo do Fotossistema II, RFA é a radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ RFA) utilizada, 0,5 é o coeficiente de atribuição entre o PSI/PSII, considerando que 50% dos fótons são absorvidos pelo PSII e a constante de absorvância foliar (0,84) é um fator de absorvância para plantas determinada por Bjorkman & Demmig (1987) e Runcie e Durako (2004), pois nem toda a radiação que chega até as folhas é absorvida pelas moléculas de clorofila, já que alguns fótons podem ser transmitidos e outros refletidos. O fator absorvância padrão (0,84) e o valor padrão (0,50) para a absorção estimada de luz pelo PSI e PSII foram utilizados para calcular a taxa de transporte de elétrons (ETR) (Schreiber *et al.* 1995).

Os valores de ETR foram representados como curvas rápidas de luz (RLC) (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 utilizado 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 Máxima de Transporte de Elétrons (ETR_{max}). A ETR_{max} ocorre em um valor de irradiância de $1/k_w$, chamado de irradiância ótima ($E_{optimum}$). Outro parâmetro obtido através da equação da fotossíntese é o Alfa (α), que corresponde a tangente do ângulo formado no início da curva rápida de luz ($\alpha = ETR_{max} \cdot e \cdot k_w$), é dada como a eficiência no transporte de elétrons (Maxwell e Johnson, 2000). Os valores ajustados para constantes (A) e (k_w) foram determinados utilizando a equação descrita por Gloag *et al.* (2007).

3.8 Extração e quantificação dos pigmentos fotossintéticos

Logo após a determinação do transporte de elétrons da fotossíntese, foram feitas as extrações e quantificações dos pigmentos fotossintetizantes segundo Lichtenthaler (1987). Para *Elaphoglossum luridum* foram necessárias amostras de 0,2 g de material vegetal fresco (n = 3) enquanto que para *Vittaria lineata*, amostras de 0,1 g de material vegetal fresco (n = 3) foram suficientes para realização das leituras no espectrofotômetro (Biospectro, SP-220). Frondes completamente expandidas utilizadas para extração dos pigmentos foram retiradas das plantas dos diferentes tratamentos e imediatamente processadas. Os discos foliares foram retirados com o auxílio de um furador de metal, desprezando-se as nervuras e eventuais danos presentes nas folhas. Logo após a retirada dos discos, os mesmos foram pesados e armazenados em nitrogênio líquido para a posterior extração e quantificação dos pigmentos fotossintéticos. Para a extração, as amostras foliares foram retiradas do nitrogênio líquido e imediatamente homogeneizadas em 10 ml de acetona aquosa (80% v/v), utilizando um graal com pistilo durante

5 minutos. O homogeneizado foi centrifugado por 10 minutos a 3.500 g, e o volume das amostras foi ajustado para 10 ml. Foram realizadas, em seguida, as leituras de absorbância das amostras em espectrofotômetro, a 663 nm, 646 nm e 470 nm. As leituras espectrofotométricas dos extratos foram feitas em triplicatas e os resultados foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ MS. A partir destas leituras, foram calculados os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, segundo equações específicas para cada pigmento:

$$\text{Clorofila } a = (12, 21 \cdot A_{663}) - (2, 81 \cdot A_{646})$$

$$\text{Clorofila } b = (20, 13 \cdot A_{646}) - (5, 03 \cdot A_{663})$$

$$\text{Carotenoides} = (1000 \cdot A_{470} - 3, 27 \cdot Ca - 104 \cdot Cb)/198.$$

3.9 Análise da concentração de malato foliar

A via de assimilação de carbono fotossintético foi avaliada através da determinação da diferença noite/dia na concentração de malato [μM] das frondes ($\Delta\text{Malato} = [\text{Malato}]_{\text{noite}} - [\text{Malato}]_{\text{dia}}$), através de análises enzimáticas, segundo Mollering (1985). Em ambas as espécies, *Elaphoglossum luridum* e *Vittaria lineata*, foram retiradas três amostras foliares de material fresco (1,0 g), no início (06h00min) e no final do período de luz (18h00min), provenientes dos tratamentos: 1) controle, 2) estresse hídrico e 3) aplicação de ABA (10 μM). As mesmas foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido (-192 °C), com intuito de conservar e paralisar todas as reações enzimáticas até o momento das análises. Para a extração, as amostras foram homogeneizadas em 10 mL de água destilada a 98° C. O extrato bruto foi mantido em banho-maria a 98° C durante 10 minutos, sendo posteriormente centrifugado a 3.500 g por 10 minutos, o precipitado foi descartado os extratos mantidos em temperatura ambiente. Após o resfriamento das amostras, alíquotas de 100 μL

foram utilizadas para a quantificação do malato através do kit enzimático K-LMALL (Megazyme International Ireland Limited – Ireland).

Para a detecção do ácido málico foliar são necessárias duas reações enzimáticas. A primeira reação é catalisada pela L-malato-desidrogenase (L-MDH), onde o ácido málico é oxidado à oxaloacetato pela nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+). No entanto, uma vez que o equilíbrio da reação encontra-se favorável ao ácido málico e ao NAD^+ , uma reação adicional é necessária para manter o produto NADH, e isto é conseguido através da conversão do oxaloacetato em L-aspartato e 2 α -cetoglutarato, na presença de um grande excesso de L-glutamato, pela glutamato oxaloacetato transaminase (GOT). A quantidade de NADH formado na reação descrita acima corresponde estequiometricamente à quantidade de ácido málico. Com isso, o NADH pode ser medido através do aumento na absorbância. As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Biospectro, SP-220) regulado em 340 nm, sendo as análises realizadas em triplicatas e a concentração de malato expressa em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$.

3.10 Análise estatística

Os dados referentes aos estudos fisiológicos (item 3.6; 3.7; 3.8; 3.9) foram apresentados como Médias $\pm$ DP. A análise de variância (Multifactor ANOVA one-way) foi seguida do teste de comparação de médias (Tukey 5%) para os dados que apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas (Zar 1996). Os resultados foram analisados pelos softwares Excel e BioEstat. Para comparar RLCs quantitativamente, usando estatística paramétrica, alguns parâmetros descritivos foram utilizados: Eficiência fotossintética (α), Taxa Máxima de Transporte de Elétrons (ETR_{max}) e E_{optimum} (Irradiância

ótima). Esses parâmetros foram calculados pela equação de Gloag *et al.* (2007), conforme o item 3.7.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estrutura e ultraestrutura de esporos

Os esporos de *Elaphoglossum luridum*, sob microscópio eletrônico de varredura (MEV), são monoletes, elipsoidais a esféricos em vista polar, com aproximadamente 35 μm de comprimento. A superfície do perisporo é ornamentada com perfurações e cristas (Fig. 3a). Mickel & Atehortúa (1980) propuseram uma classificação infragenérica, com base na morfologia e estrutura dos esporos, determinado a partir de imagens obtidas com um microscópio eletrônico de varredura (MEV). Segundo Moran *et al.* (2007), os problemas relacionados com a taxonomia de diferentes famílias, dentre elas a Dryopteridaceae, podem ser solucionados com a utilização dos caracteres observados nos esporos.

Os esporos de *Vittaria lineata*, sob microscopia eletrônica de varredura (MEV), também são monoletes, reniformes, elipsoidais a esféricos em vista polar, côncavo convexos no plano equatorial, com aproximadamente 45 μm de comprimento, apresentando a superfície lisa com depósitos de formatos irregulares, tendendo a globulares com aproximadamente 2 μm de diâmetro que se acham dispersos ou densamente agrupados (Fig. 3b). Esta espécie apresenta grande semelhança com *V. graminifolia* Kaulf. Entretanto, estas duas espécies de *Vittaria* mostram diferenças marcantes na morfologia dos esporos. A espécie *V. lineata* apresenta esporos monoletes, já a espécie *V. graminifolia* apresenta esporos tetraédricos globosus e triletes (Windisch & Nonato 1999).

Comumente, os esporos das samambaias apresentam duas formas básicas (formato reniforme e tetraédrico) e frequentemente possuem superfície ornamentada que pode apresentar uma variedade quase infinita de formas (Sharpe *et al.* 2010). Esporos monoletes em forma de feijão são comumente encontrados nas ordens

mais recentemente derivadas das samambaias, como Polypodiales (Sharpe *et al.* 2010). Os esporos das espécies estudadas possuem tamanho médio, pois conforme Erdtman (1952), quando apresentam de 25-50 μm , baseado no comprimento do maior eixo do esporo são considerados de tamanho médio. Ambas as espécies estudadas apresentam esporos com formatos clássicos, podendo auxiliar na identificação das espécies.

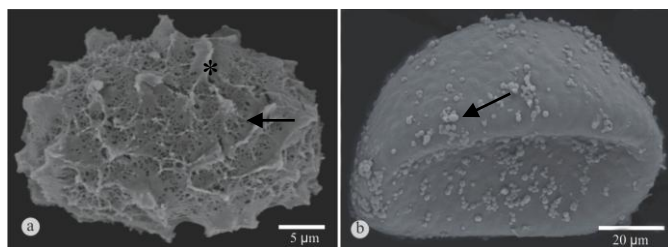


Figura 3 – Esporos de *Elaphoglossum luridum* (a), com superfície ornamentada com cristas (*) e perfurações (seta), e *Vittaria lineata* (b), com depósitos tendendo à globulares (seta).

4.2 Estrutura e ultraestrutura de frondes

Na espécie *Elaphoglossum luridum*, a lâmina foliar possui uma espessura média de 0,54 mm. Apresenta células epidérmicas com paredes periclinais externas convexas (Fig. 4a) e anticlinais com acentuada sinuosidade (Fig. 4a, 4b), ampliando a superfície de contato entre células vizinhas. A folha é do tipo hipoestomática, ou seja, com estômatos restritos à face abaxial, os quais estão orientados ao acaso, com uma densidade de 33 estômatos por mm^2 . Estes são do tipo polocítico, pois apresentam as células-guarda envolvida por uma célula subsidiária em formato de ferradura (Fig. 4b), e localizam-se no mesmo nível das demais células epidérmicas (Fig. 4c). Tricomas multicelulares, do tipo escamas e com longas ramificações

(Fig. 4d), ocorrem em ambas faces da lâmina foliar, porém em maior concentração na face abaxial.

A epiderme, de ambas as faces, é unisseriada, com células de formato retangular e paredes espessas (Fig. 5a). O mesofilo está constituído de parênquima tendendo a paliádico e parênquima esponjoso (Fig. 5a). O primeiro constituído por um estrato de células alongadas, com formatos irregulares e um grande número de cloroplastos. O parênquima esponjoso preenche o restante do mesofilo, variando de seis a sete camadas de células arredondadas e com conspícuos espaços intercelulares. Nas células da epiderme e do mesofilo são encontrados inúmeros campos primários de pontoações (Fig. 5b), indicando presença de grande quantidade de plasmodesmos intercomunicando as células. A cutícula, na face adaxial, é espessa, mostrando maior concentração de cutina na camada periférica (Fig. 5c). Na face abaxial, onde localizam-se os estômatos, há amplas câmaras subestomáticas (Fig. 5d).

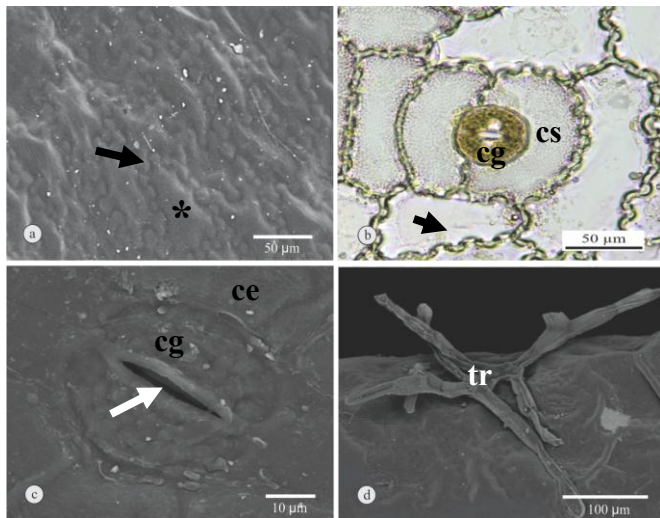


Figura 4 - Vista frontal da superfície epidérmica da fronde de *Elaphoglossum liridum*. **a, c, d)** Em MEV; **b)** em

microscopia óptica. **a)** Células epidérmicas da face adaxial com paredes periclinais externas convexas (*) e acentuada demarcação da sinuosidade das paredes anticlinais (**seta**). **b)** Estômato polocítico na face abaxial, com células-guarda (**cg**) contornadas por uma célula subsidiária (**cs**) em forma de ferradura; células com paredes anticlinais sinuosas (**seta**). **c)** Células-guarda (**cg**), delimitando poro em fenda (**seta**), no mesmo nível das células epidérmicas ordinárias (**ce**). **d)** Tricomas do tipo escamas e ramificados (**tr**) na face abaxial.

Na raque de *E. luridum*, o meristelo é constituído por um feixe vascular anficrival, xilema circundado pelo floema, e periciclo (Fig. 5e). O xilema apresenta as extremidades (protoxilema) em formato de gancho, caracterizando a forma de hipocampo (Tipo *Onoclea-Aspidium*), conforme Ogura (1972). O meristelo é envolvido por uma endoderme, constituída por células pequenas e de paredes delgadas, com estrias de Caspary. Adjacente à endoderme ocorre um estrato de células maiores e com espessamento em “U”, o qual apresenta cor marrom escuro, determinada por compostos fenólicos incrustados na parede (Fig. 5e), constatado através da reação positiva ao cloreto férrico.

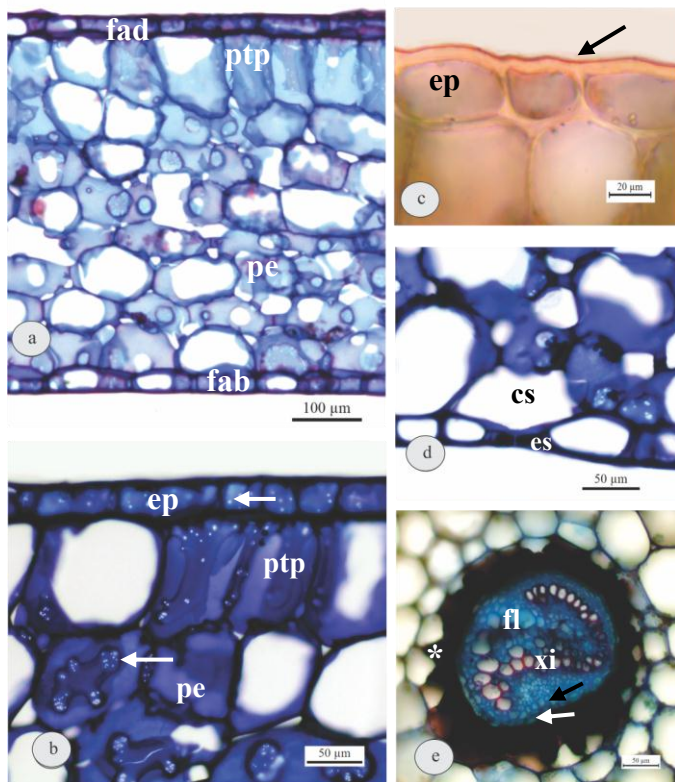


Figura 5 - Secções transversais de fronde de *Elaphoglossum luridum*, em microscopia óptica. **a)** Mesófilo, constituído por parênquima tendendo à paliçádico (**ptp**) e parênquima esponjoso (**pe**), e epiderme uniestratificada, em ambas faces da folha, adaxial (**fad**) e abaxial (**fab**). **b)** Campos primários de pontoação (**setas**) na epiderme e nos parênquimas. **c)** Detalhe dos tecidos adaxiais, com epiderme (**ep**) delimitada por parede periclinal externa espessa, com pequena quantidade de cutina (reação ao sudan IV– rosada), e cutícula (**seta**)

mostrando forte reação positiva ao sudan (vermelha). **d)** Tecidos abaxiais, estômato (**es**) e ampla câmara subestomática (**cs**). **e)** Tecidos centrais da raque com meristelo envolvido por um estrato de células com espessamento em U (*). Meristelo formado por feixe anficrival, floema (**fl**) envolvendo o xilema (**xi**), periciclo (**seta preta**) e endoderme (**seta branca**).

A lâmina foliar da fronde de *Vittaria lineata* possui uma espessura média de 1,05 mm. Vistas frontais da superfície epidérmica, em microscopia eletrônica de varredura, revelam que a cutícula é lisa, porém com depósitos de cera na face adaxial (Fig. 6a). Na face abaxial ocorrem dois sulcos lineares (Fig. 6b), que percorrem longitudinalmente a fronde, onde se localizam os esporângios e os estômatos. Em secção transversal da fronde, na região do sulco (Fig. 6c), verifica-se a presença de estômatos, um pouco elevados em relação às demais células epidérmicas, com amplas câmaras subestomáticas. Utilizando microscopia fluorescência (Filtro verde - excitação: 460 – 490 nm; emissão: 520 nm) confirmou-se a presença de estômatos (cor vermelha em decorrência dos cloroplastos nas células-guarda; Fig. 6d) somente nas regiões laterais do sulco, indicando encontrarem-se protegidos em área que constitui um microclima intermediário ao ambiente interno e externo à folha. Portanto, os estômatos estão restritos à face abaxial, demonstrando a característica hipoestomática da fronde, e ocorrem em uma concentração média de 113 estômatos.mm⁻². São do tipo polocítico, pois as células-guarda possuem uma célula subsidiária no formato de ferradura (Fig. 6e). As células epidérmicas têm paredes anticliniais sinuosas (Fig. 6e). No interior dos sulcos lineares existe um grande número de paráfises unisseriadas e sem ramificações, além dos esporângios que formam soros em uma única linha paralela a cada margem das

frondes (Fig. 6b). No interior dos sulcos também há a presença de tricomas glandulares, os quais secretam substâncias de natureza lipídica, constatado pela reação positiva ao sudan IV (Fig. 6f).

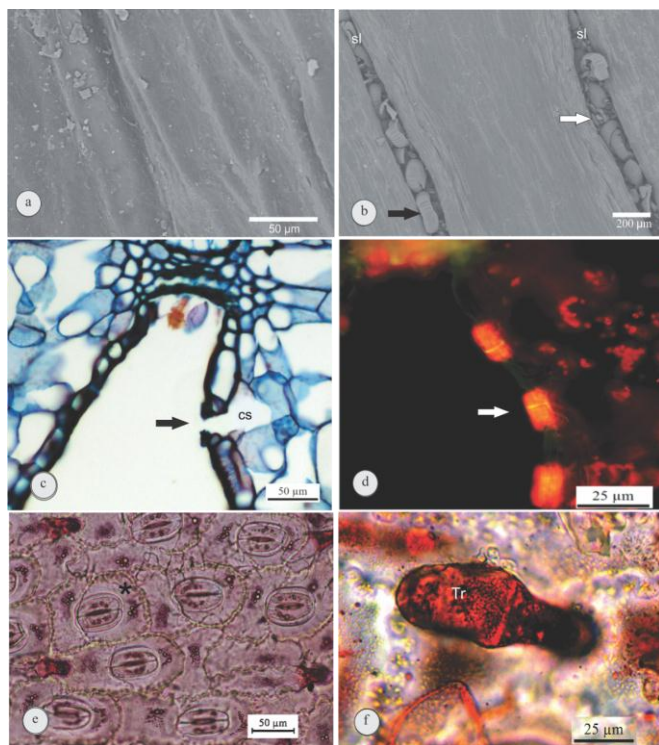


Figura 6 - Frondes de *Vittaria lineata* – **a, b)** Vistas frontais da superfície epidérmica em MEV, face adaxial (**a**) e abaxial (**b**). Nos sulcos lineares (**sl**) encontram-se os esporângios (**seta preta**) e as paráfises (**seta branca**). **c, d)** Secções transversais da fronde, na região do sulco linear, destacando a presença de estômatos (**setas**), em microscopia óptica (**c**) e em microscopia de fluorescência (**d**); Filtro verde - excitação: 460 – 490 nm; emissão: 520

nm). Estômatos em posição elevada em relação às demais células epidérmicas e amplas câmaras subestomáticas (**cs**). **e**) Vista frontal da epiderme, na região lateral do sulco linear - face adaxial da fronde, evidenciando estômatos do tipo polocíticos, com célula subsidiária (*) em forma de ferradura. **f**) Vista frontal da parede do interior do sulco linear, mostrando tricoma glandular (**Tr**), em reação positiva ao sudan IV, indicando presença de substância lipídica.

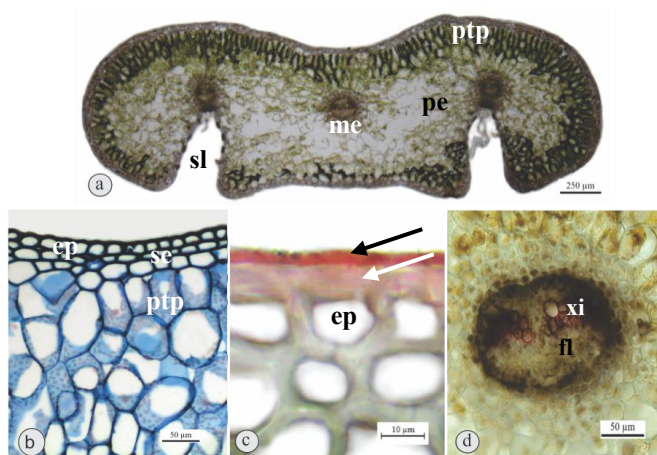


Figura 7 - Secções transversais da fronde de *Vittaria lineata*, em microscopia óptica. **a**) Aspecto geral mostrando sulcos lineares (**sl**) na face abaxial, os três meristelos (**me**) e mesofilo formado por parênquima tendendo à paliçádico (**ptp**) e parênquima esponjoso (**pe**). **b**) Detalhe dos tecidos adaxiais evidenciando células epidérmicas (**ep**) com paredes espessas, duas camadas de células subepidérmicas (**se**) e parênquima tendendo à paliçádico (**ptp**). **c**) Epiderme e tecido subepidérmico com paredes espessas. Parede periclinal externa das células epidérmica em tênue reação com sudan (**seta branca**) e cutícula espessa (**seta preta**; forte reação ao sudan IV,

indicando alta concentração de cutina). **d)** Detalhe do meristelo central, com xilema (**xi**) em forma de “V” e contornado por floema (**fl**).

Em secção transversal da fronde constata-se a presença dos dois sulcos lineares na face abaxial (Fig. 7a). A epiderme está constituída por um estrato de células com formato retangular e paredes espessas (Fig. 7b). Na face adaxial, a epiderme (Fig. 7c) apresenta células com a parede periclinal externa espessada e com presença de cutina (reação rosada com sudan IV) e a cutícula é espessa, onde há maior concentração de cutina (reação vermelha com sudan IV). As camadas subepidérmicas são constituídas de células aclorofiladas e com paredes espessadas (Fig. 7c). O mesofilo é constituído de parênquima tendendo ao paliádico e parênquima esponjoso (Fig. 7a). O primeiro apresenta células alongadas, porém não tipicamente justapostas, contém grande número de cloroplastos, e apresenta dois estratos de células localizadas na face adaxial e que avançam lateralmente nos bordos da fronde, chegando até próximo aos sulcos (Fig. 7a). O parênquima esponjoso preenche o restante do mesofilo, apresentando células arredondadas, clorofiladas e com grandes espaços intercelulares (Fig. 7a), variando de dez a onze camadas de células.

Na raque da fronde de *V. lineata* (Fig. 7a) ocorrem três meristelos, um central e dois laterais correspondendo às regiões onde localizam-se os sulcos lineares. O meristelo (Fig. 7d) está formado por um periciclo que envolve o feixe vascular do tipo anficrival, com xilema em forma de “V” contornado por floema. Delimitando externamente o meristelo encontra-se uma endoderme de células pequenas, paredes delgadas e com estrias de Caspary. Mais conspicuo é o estrato de células que envolve a endoderme, o qual é formado por células com paredes com espessamento em “U” e cor marrom. Esta cor marrom

ainda é evidenciada no interior das células parenquimáticas próximas ao meristelo (Fig. 7d), indicando presença de compostos fenólicos, constatado através da reação positiva ao cloreto férrico.

As espécies *E. luridum* e *V. lineata* possuem folhas com uma considerável suculência, com destaque para a espécie *V. lineata*. Esta suculência é evidenciada nas células parenquimáticas clorofiladas, as quais apresentam cloroplastos na periferia das células, indicando presença de amplos vacúolos, onde fica armazenada a água. A presença de cutícula espessa, associada a parede periclinal externa das células epidérmicas também espessa e com cutina, em ambas espécies, são aspectos que devem contribuir para o equilíbrio hídrico interno. Segundo Hietz & Briones (1998), estas características são comumente encontradas em samambaias epífitas e fazem parte de uma lista de atributos responsáveis pela manutenção hídrica durante os recorrentes períodos de seca enfrentados por estas espécies. A suculência das frondes tem sido descrita como uma característica fundamental das plantas que realizam a fixação do carbono atmosférico através do metabolismo CAM (Neales & Hew 1975).

A sinuosidade nas paredes anticlinais das células epidérmicas de *E. luridum* e *V. lineata* é frequentemente encontrada nas pteridófitas, já sendo descritas para as espécies *Asplenium oligophyllum* Kaulf., *Dryopteris rosea* Fourn., *D. patula* (Sw.) Underw., *Pleopeltis lepidopteris* Langsd. & Fisch. entre outras (Ferrari 2009; Hernández *et al.* 2006 e Viviani *et al.* 2009). De acordo com Watson (1942), o desenvolvimento de diferentes estresses, bióticos e abióticos, durante a diferenciação da folha tem sido associado com o padrão de parede sinuosa anticlinal em células epidérmicas. Segundo Panteris & Galatis (2005), a organização do citoesqueleto, mediada pelo domínio molecular, seria responsável pela formação das sinuosidades das paredes anticlinais das células epidérmicas.

A presença de células com paredes periclinais externas convexas na epiderme de *E. luridum* pode contribuir para maximizar a eficiência na absorção de luz, uma vez que estas plantas encontram-se sob o dossel de grandes árvores, em ambientes sombreados; células com superfícies convexas funcionam como lentes, direcionando a luz solar, para as clorofilas, com maior eficiência (Poulson & Volgelmann 1990; Moran 2004).

Nas pteridófitas, a distribuição estomática, na lâmina foliar, é muito variável. Na maioria das espécies, os estômatos ocorrem apenas na face abaxial (hipoestomáticas), em algumas espécies são encontrados em ambas as faces (anfiestomáticas) e em casos mais raros, os estômatos são encontrados apenas na face adaxial (epiestomática) (Ogura 1972). As espécies *E. luridum* e *V. lineata*, bem como a maioria das pteridófitas, apresentam estômatos apenas na face abaxial. Segundo Bondada *et al.* (2006), a característica hipoestomática pode ser uma adaptação para reduzir a perda de água por transpiração durante variações nas condições ambientais, tais como o estresse hídrico. Segundo Coutinho (1962), estômatos presentes apenas na face abaxial são comuns em espécies de florestas tropicais úmidas e tal fato representa uma proteção contra o bloqueio da abertura estomática por musgos e fungos, habitantes comuns nesse ambiente.

Na face abaxial das folhas de *Lepidodendron* sp. e *Sigillaria* sp. existem dois sulcos longitudinais onde os estômatos são encontrados em abundância (Ogura 1972). No presente estudo, a espécie *V. lineata* demonstrou características semelhantes, pois os estômatos são restritos ao interior dos sulcos longitudinais e são encontrados em considerável concentração (Fig. 6e). A localização dos estômatos na espécie *V. lineata* permite a criação de um microclima úmido dentro dos sulcos longitudinais, podendo auxiliar na manutenção hídrica durante os recorrentes períodos de seca aos quais as plantas epífitas são submetidas.

Cada estômato consiste em uma abertura central, ou um poro, circundada por duas células-guarda, porém a sua construção e posição é muito variável. Quanto ao nível dos estômatos em relação às células epidérmicas, ocorrem algumas diferenças entre as duas espécies estudadas. A espécie *E. luridum* apresenta os estômatos localizados no mesmo nível das células epidérmicas, como é o caso da espécie *Pyrrosia penangiana* (Hook.) Holttum; já na espécie *V. lineata*, os estômatos são elevados em relação às células epidérmicas, se assemelhando aos estômatos da espécie *Pyrrosia sheareri* (Baker) Ching (Ogura 1972). Os estômatos elevados da espécie *V. lineata* auxiliam as trocas gasosas, uma vez que eles se encontram em um microambiente úmido colaborando com a manutenção hídrica foliar.

Segundo Fryns-Claessens & Cotthem (1973), estômatos do tipo polocítico, como os encontrados nas espécies estudadas, são comuns a um grande número de espécies de pteridófitas, não respeitando família ou gênero. A principal característica deste tipo de estômato é a presença de uma célula subsidiária no formato de ferradura (Fryns-Claessens & Cotthem 1973).

Apenas na espécie *E. luridum* foram encontrados apêndices epidérmicos do tipo escama. Muller *et al.* (1981) trabalhando com samambaias do sul do Brasil, encontraram tricomas tipo escama com células vivas na base em *Pleopeltis astrolepis* (Liebm.) E. Fourn., *Polypodium hirsutissimum* Raddi e *Polypodium squalidum* Vell. com uma estrutura muito similar aos tricomas encontrados em bromeliáceas. Escamas com estrutura anatômica similar também foram encontradas nas frondes de *Pleopeltis mexicana* Fée e *Elaphoglossum petiolatum* Bonap., com a provável função de aumentar a capacidade das folhas em absorver água, sem aumentar a perda de água cuticular (Hietz & Briones 1998). As escamas evoluíram independentemente em samambaias e bromélias, mas são tratadas como uma importante

estrutura para absorção de água nas epífitas (Hietz & Briones 1998). Segundo Ogura (1972), os tricomas encontrados nos esporófitos de pteridófitas são geralmente filiformes, consistem de uma ou mais células podendo ramificar-se; enquanto que os apêndices tipo escama são geralmente achatados e com um tamanho consideravelmente grande, constituído por numerosas células, como os encontrados em *E. luridum* (Fig. 4d).

Na espécie *V. lineata*, no interior dos sulcos lineares foi encontrado grande número de paráfises oferecendo suporte e proteção mecânica aos esporângios ali presentes. Segundo Jones (1987), paráfises são tricomas que se encontram entre os esporângios e aproximadamente um terço das pteridófitas possuem este tipo de estrutura protetora. No interior dos sulcos lineares também há a presença de tricomas glandulares secretores de lipídios. Tricomas glandulares secretores de substâncias de natureza lipídica foram previamente descritos em algumas espécies de pteridófitas como *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link, *Gymnogramme sulfurea* Kaulf., entre outras (Ogura 1972). O tamanho e a concentração dos tricomas são variáveis, em resposta às diferentes condições ambientais, porém, a morfologia e a natureza da secreção destas estruturas podem exercer um papel taxonômico (Metcalf & Chalk 1950).

E. luridum e *V. lineata* são espécies epífitas que habitam locais sombreados da Mata Atlântica. Ambas espécies têm distinção entre os tecidos clorofilados do mesófilo, porém o parênquima paliçádico não mostra características típicas com células alongadas e bem justapostas, tendo sido denominado de parênquima tendendo ao paliçádico. O desenvolvimento da camada paliçádica está relacionado com a intensidade luminosa como amplamente referido na literatura (Mauseth 1988, Lambers *et al.* 1998, Larcher 2000). DeLucia *et al.*, (1996) explicam que existem duas razões para que a intensidade da luz diminua a medida que atravessa a folha: a primeira é

devido à reflexão pelas facetas das paredes celulares e a segunda é devido à reflexão pelos espaços intercelulares. Dessa forma, folhas de sombra tendem a apresentar apenas uma camada de parênquima paliçádico, permitindo que maior quantidade de luz alcance o parênquima esponjoso onde ocorrerá maior reflexão dos raios luminosos.

Em ambas as espécies estudadas, foram identificadas inúmeros campos primários de pontoação nas células epidérmicas e também em células do mesófilo. Segundo Zambryski & Crawford (2000), a presença deste tipo de estrutura reflete o alto grau de conexões celulares via plasmodesmos, permitindo o movimento dos mais variados tipos de moléculas, como nutrientes e reguladores de crescimento.

A formação do meristelo diverge da formação proposta por Ogura (1972) para as famílias estudadas. A união dos meristelos na região mediana da raque de *E. luridum* forma estelos com feixe do tipo hipocampus ou “tipo Onoclea” (cavalo-marinho), sendo segundo o autor, o padrão característico dos gêneros *Onoclea* L. (Onocleaceae), *Athyrium* Roth e *Woodsia* R. Br. (Woodsiaceae). Já na espécie *V. lineata*, a união dos meristelos na região mediana das frondes formam feixes, com xilema na forma de “V”. Segundo Ogura (1972), o xilema na forma de “V” é característica da família Cyatheaceae.

A presença de compostos fenólicos, de coloração marrom, é característica marcante em samambaias, ocorrendo principalmente nos tecidos de sustentação e próximo aos feixes vasculares (Ogura 1972). No presente estudo, ambas as espécies *E. luridum* e *V. lineata* apresentaram este tipo de substância referida por Ogura (1972). Segundo Haslam (1988), alguns compostos fenólicos contribuem para a rigidez das paredes celulares, atuando como a lignina para a sustentação de diferentes tecidos.

Em ambas as espécies estudadas, *E. luridum* e *V. lineata* foram observados caracteres anatômicos comumente encontrados em plantas que vivem em ambientes xéricos, como o dossel das grandes árvores.

4.3 Conteúdo Relativo de Água (CRA)

Os resultados evidenciam que não houve diferença estatisticamente significativa no conteúdo relativo de água (CRA) independente dos tratamentos de estresse hídrico e aplicação de solução de ABA (10 μ M) em relação ao CRA das plantas controle, cujos valores foram mantidos altos tanto em *Elaphoglossum luridum* (Fig. 8) como em *Vittaria lineata* (Fig. 9), sendo os valores médios de CRA, 89,37% e 92,36% respectivamente.

Os resultados mostraram a capacidade de ambas espécies em manter seus valores de CRA estáveis, mesmo em condições de estresse hídrico. Mesmo em florestas úmidas, o suprimento de água para as plantas epífitas é irregular e quase sempre limitado por um escasso substrato com uma pequena capacidade de armazenamento de água, onde períodos com altas temperaturas e irradiância podem esgotar rapidamente a água disponível para os epífitos, impondo uma condição de estresse hídrico (Luttge 1997). Portanto, para garantir sua sobrevivência, as espécies *E. luridum* e *V. lineata* possuem a capacidade de manter altos níveis de CRA mesmo em condições de estresse hídrico. No geral, as epífitas necessitam de características morfofisiológicas específicas para resistir a tal estresse. Essas características podem variar desde tamanho, espessura e formato foliar, passando por espessura cuticular, até mesmo a alternância da via de fixação do carbono C3 – C4, como é o caso das plantas CAM facultativas (Luttge 1997).

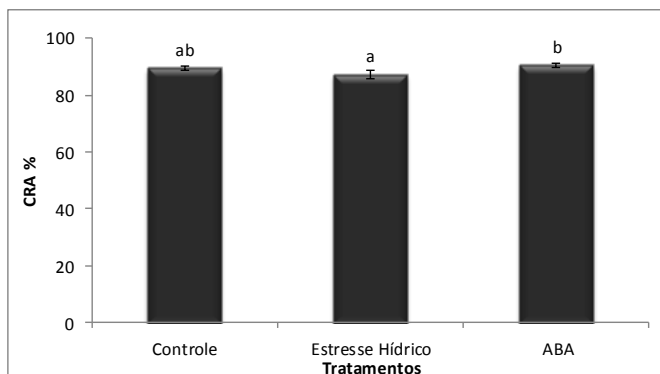


Figura 8 - Conteúdo Relativo de Água (CRA) de frondes de *Elaphoglossum luridum* submetidas a diferentes tratamentos. Médias seguidas de letras iguais representam igualdade entre os tratamentos $p < 0,05$ Média $\pm$ DP ($n = 3$).

Tausz *et al.* (2001) trabalhando com diferentes espécies de samambaias epífitas, dentre elas *Elaphoglossum glaucum* T. Moore e *Elaphoglossum petiolatum* Bonap., constataram um comportamento semelhante ao obtido no presente trabalho, as quais, mesmo em estresses luminoso e hídrico severos, as plantas mantiveram altos níveis de CRA, em torno de 90%. Hietz & Briones (1998) trabalhando com diferentes espécies de samambaias, demonstraram que as folhas coriáceas de *E. glaucum* apresentaram a menor taxa de perda de água não controlada (cuticular) dentre as espécies estudadas.

Em condições naturais, com substrato intacto, *E. glaucum* e *E. petiolatum* são capazes de manter altos níveis de CRA, sob estresse de curto prazo, reforçando a proteção dos tilacóides (Tausz *et al.* 2001). Em casos de dessecação mais severa, *E. petiolatum* pode enrolar suas folhas

reduzindo a área de contato com o meio externo (Tausz *et al.* 2001).

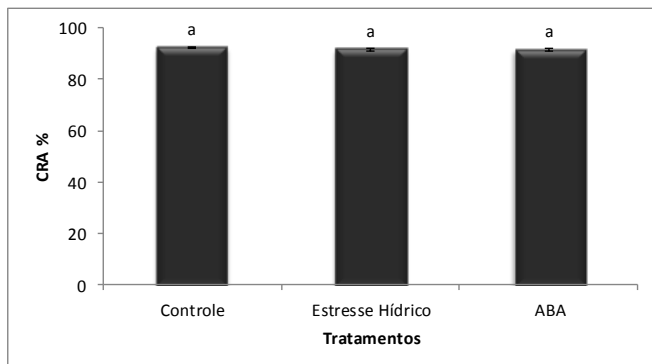


Figura 9 - Conteúdo Relativo de Água (CRA) de frondes de *Vittaria lineata* submetidas a diferentes tratamentos. Médias seguidas de letras iguais representam igualdade entre os tratamentos $p < 0,05$ Média $\pm$ DP ($n = 3$).

O estudo da ecofisiologia das epífitas tem recebido considerável atenção, especialmente para as adaptações que possibilitam sua sobrevivência em substratos (forófitos) com limitação de água e sem o contato da raiz com o solo. Estes estudos estão concentrados principalmente na família Bromeliaceae (Hietz & Briones 1998), embora o número de bromélias epífitas seja menos da metade do número de samambaias epífitas (Benzing 1990).

Hietz & Briones (1998) em trabalhos morfofisiológicos realizados com diferentes espécies de samambaias epífitas em uma floresta tropical mexicana constataram que diferentes aspectos propiciam o desenvolvimento destas plantas em ambientes xéricos, dentre eles: frondes coriáceas (*Pleopeltis mexicana*, *Elaphoglossum glaucum*), rizomas suculentos (*Polypodium*

puberulum Schltdl. & Cham., *Phlebodium areolatum* Hum. & Bonpl. Ex Willd.), baixas taxas de perda de água (todas as espécies estudadas exceto *P. puberulum*), alta elasticidade das paredes celulares (todas as espécies estudadas), cutícula espessa (*E. glaucum*, *P. areolatum*) que previnem não só a perda de água, mas também a sua absorção, gerando uma alta resistência cuticular, que evitaria a transpiração e absorção de água pela cutícula, levando a crer que toda a água por elas transpirada é proveniente da absorção radicular. Porém, para *Trichomanes bucinatum* Mickel & Beitel e *P. puberulum* encontradas em locais mais úmidos, a absorção de água através da lâmina foliar pode ser substancial, uma vez que em *P. puberulum*, sua face adaxial é recoberta por tricomas capazes de reter uma espécie de filme d'água, assim, aumentando o período durante o qual a água líquida pode ser absorvida (Hietz & Briones 1998).

Em ambas as espécies de samambaias epífitas estudadas neste trabalho, o tratamento de aplicação de ABA exógeno (10 μ M) por um período de quinze dias, não alterou o CRA das frondes em relação aos tratamentos controle. Apenas a espécie *E. luridum* apresentou diferença no CRA entre os tratamentos de estresse hídrico e irrigação com ABA (10 μ M), ocorrendo um incremento de 3,28% no CRA das plantas irrigadas com ABA, em relação às plantas submetidas ao estresse hídrico (Fig. 8).

Gadallah (1995) analisando o efeito do estresse hídrico, de ácido abscísico e de prolina em *Gossypium barbadense* L., demonstrou que as plantas tratadas com ABA exógeno mantiveram os mesmo níveis de CRA quando comparados aos das plantas controle não tratadas. Wang *et al.* (2011) estudando o efeito do ácido abscísico em diferentes cultivares de *Triticum aestivum* L., observaram a capacidade do ABA em manter altos níveis de CRA. Enquanto o CRA no tratamento de estresse hídrico utilizando polietilenoglicol (PEG) foi significativamente menor, no tratamento com a associação

de PEG + ABA observou-se o mesmo conteúdo relativo de água quando comparado ao tratamento controle (Wang *et al.* 2011).

O estresse hídrico frequentemente causa o aumento na concentração endógena do ácido abscísico (ABA), podendo também causar o acúmulo temporário de outros solutos compatíveis, como açúcares e prolina (Gadallah 1995). O aumento temporário destes compostos parece ser fundamental para a sobrevivência de plantas sob diferentes estresses bióticos e abióticos (Walton 1980). É muito conhecida e documentada a função vital do ABA na economia de água através da redução da abertura estomática e consequente diminuição da taxa de transpiração nas plantas (Walton 1980). Segundo Horton (1971), o ABA exógeno inicia o fechamento estomático quando aplicado em solução aquosa nas folhas intactas ou em segmentos epidérmicos isolados. Estes resultados levaram ao início das pesquisas com a hipótese de que o ABA estaria envolvido na regulação da abertura estomática e consequentemente atuaria no controle osmótico dos vegetais.

As alterações no turgor dentro das células-guarda, que regulam a abertura estomática, são causadas pelos movimentos de K^+ e Cl^- , e também através da síntese, metabolismo e movimentos de ânions orgânicos, principalmente o malato (Walton 1980). Existem diversos tipos de sinais que podem induzir o fechamento estomático, dentre eles o principal sinal conhecido é provavelmente o ABA. Na via de sinalização para o fechamento do poro estomático existem vários mensageiros secundários, tais como Ca_2^+ , H_2O_2 e NO que contribuem para o fechamento estomático (Atkinson *et al.* 1990; Zhang *et al.* 2001; Garcia-Mata & Lamattina 2009). A perda passiva da pressão de turgor resulta no fechamento estomático. O fechamento estomático tem efeitos negativos sobre a absorção de CO_2 , a fotossíntese, refrigeração transpiracional, absorção de água e nutrientes.

Portanto é interessante fechar os estômatos somente quando o benefício da retenção de água supera os efeitos negativos (Neill *et al.* 2002). Possivelmente, ambas as espécies epífitas estudadas apresentam comportamento semelhante ao descrito por Neill *et al* (2002).

4.4 Pigmentos Fotossintéticos

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que em ambas as espécies, *Elaphoglossum luridum* (Fig. 10) e *Vittaria lineata* (Fig. 11), os conteúdos de clorofila *a*, *b* e *totais* foram significativamente menores no tratamento de estresse hídrico (sete dias) e com aplicação da solução de ABA (10 μ m) quando comparados ao tratamento controle. A única exceção foi a espécie *V. lineata*, onde o nível de clorofila *b* no tratamento com ABA, não diferiu do controle (Fig. 11). Estes resultados evidenciam a efetividade dos dois tratamentos de estresse em relação às plantas controle.

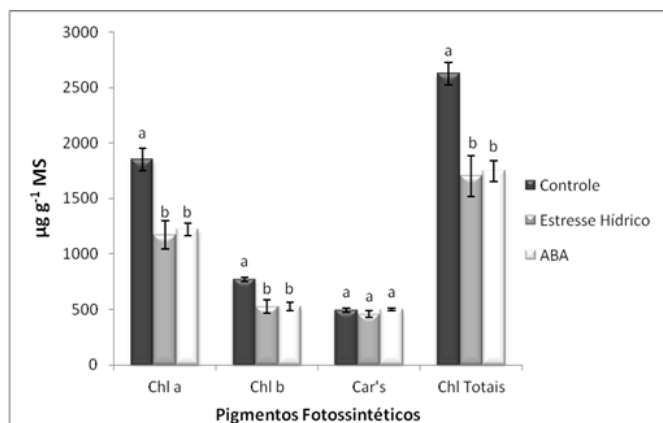


Figura 10 - Concentração de clorofilas e carotenoides em frondes de *Elaphoglossum luridum* sob diferentes tratamentos: Controle, Estresse hídrico e aplicação de

ABA. Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos $p < 0,05$. Média $\pm$ DP ($n = 3$).

A redução no conteúdo de clorofilas em plantas sob estresse foi previamente descrita em diversas espécies. Jaing *et al.* (1994) observaram a degradação das clorofilas induzida por estresse osmótico, em plântulas jovens de arroz, através da formação mais ativa de radicais hidroxilas ($\text{OH}^\cdot$). Também foi observada a redução nas clorofilas (*a*, *b* e *totais*) em *Triticum aestivum* L. sob estresse hídrico (Asharf *et al.* 1994).

Tausz *et al.* (2001) trabalhando com pigmentos em diferentes espécies de samambaias epífitas de uma floresta tropical mexicana, notaram comportamentos semelhantes aos obtidos no presente trabalho, ou seja, o conteúdo de clorofilas *totais* diminuiu nos tratamentos de estresse hídrico induzido nas espécies *Polypodium plebeium* Schltdl. & Cham., *Elaphoglossum petiolatum*, *Phlebodium areolatum* e *Asplenium cuspidatum* Lam.

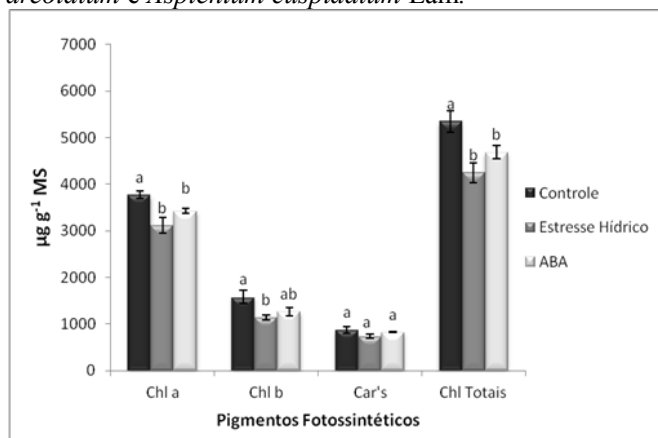


Figura 11 - Concentração de clorofilas e carotenoides em frondes de *Vittaria lineata* sob diferentes tratamentos: Controle, Estresse hídrico e aplicação de ABA. Médias

seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos $p < 0,05$. Média $\pm$ DP ($n = 3$).

Farooq & Bano (2006) analisando os aspectos bioquímicos dos efeitos do ácido abscísico, clorocolina e do estresse hídrico em *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek, verificaram que houve redução nos níveis de clorofilas totais tanto no tratamento de estresse hídrico, como no tratamento com ABA exógeno. No entanto, no tratamento de estresse hídrico combinado com a aplicação de ABA, as quantidades destes pigmentos aumentaram significativamente quando comparados ao tratamento de estresse hídrico. Esses autores demonstraram que a aplicação de ABA em associação com tratamentos de seca induz o fechamento estomático e diminuindo os efeitos do estresse hídrico sofrido pelas plantas, auxiliando na manutenção dos níveis dos pigmentos fotossintéticos.

Thaloot *et al.* (2006) observaram que o estresse hídrico em qualquer fase do desenvolvimento, diminuiu os níveis de clorofila *a* e *b* e carotenoides nas frondes de *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. A diminuição do teor das clorofilas nas frondes das plantas pode ser atribuída à elevada taxa de degradação destes pigmentos, sendo esta taxa, maior do que a biossíntese sob condições de estresse hídrico (Yang *et al.* 2001). Além disso, o estresse hídrico pode acelerar a quebra das moléculas de clorofila (Bano & Aziz, 2003).

Mayaba *et al.* (2001) demonstraram o diminuição de 58,3% nos teores de clorofilas em *Atrichum androgynum* (C. Mull.) A. J. sob estresse hídrico, porém, nas plantas tratadas com ABA, este comportamento não foi observado, já que não houve diferenças significativas entre as plantas tratadas com ABA e as não tratadas, demonstrando o aumento na capacidade de tolerância ao estresse hídrico em plantas tratadas com ácido abscísico.

Quanto à concentração de carotenoides nas frondes, ambas as espécies estudadas, não houve diferenças significativas entre os tratamentos de estresse quando comparados ao tratamento controle. Sherwin & Farrant (1998) trabalhando com mecanismos de proteção contra o excesso de luz, demonstraram não haver alteração no conteúdo de carotenoides no tratamento de estresse hídrico em *Craterostigma wilmsii* Engl., quando comparado aos resultados obtidos no tratamento controle. Resultado semelhante também foi obtido por Tausz *et al.* (2001), que verificaram que na grande maioria das samambaias analisadas, a quantidade de carotenoides não foi alterada por diferentes tratamentos de restrição hídrica em relação ao tratamento controle.

Os estresses hídrico, salino e de temperatura, são acompanhados pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) como O_2^- , H_2O_2 e $HO^\bullet$, causadores de danos nas membranas e macromoléculas (Mittler 2002). As plantas no geral desenvolveram estratégias antioxidantes para remover estes compostos tóxicos, assim, aumentando a tolerância a diferentes fatores causadores de estresse. Os antioxidantes incluem enzimas como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), e as conhecidas moléculas de baixo peso molecular como ascorbato (AsC), glutathione (GLU), antocianinas (ANT) e os carotenoides (CAR's). Como o descrito anteriormente, no presente trabalho, o teor de carotenoides não se alterou significativamente. Este fato pode ser devido à presença de outras enzimas e/ou moléculas capazes de inativar as espécies reativas de oxigênio (EROS), como as descritas acima. Outra possibilidade seria de que o estresse hídrico por um período de sete dias, não foi suficiente para causar alterações no conteúdo de carotenoides.

Também foi observada uma grande variação no conteúdo de pigmentos fotossintéticos entre os tratamentos controle das espécies estudadas (Fig. 12). Nos pigmentos

analisados, a espécie *V. lineata* apresentou níveis significativamente superiores aos observados em *E. luridum*.

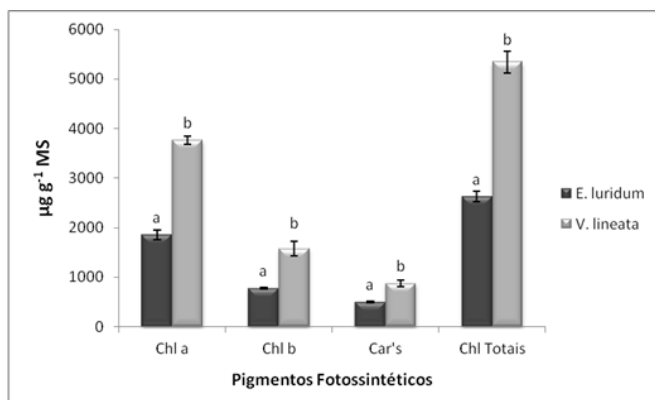


Figura 12 - Concentração de clorofilas e carotenoides em frondes de *Elaphoglossum luridum* e *Vittaria lineata* sob o tratamento Controle. Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos $p < 0,05$. Média $\pm$ DP ($n = 3$).

Jadhav *et al.* (2011) analisando os pigmentos fotossintéticos de onze espécies de samambaias, encontraram resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo, ou seja, observaram uma grande variação no conteúdo de pigmentos entre as onze espécies estudadas. A variação no teor de pigmentos fotossintéticos depende, dentre outros fatores, da quantidade de luz disponível (Wolf 1958). Em estudos ecofisiológicos, Shaikh & Dongare (2008) evidenciaram a variação no conteúdo de clorofilas e carotenoides em resposta aos diferentes microclimas em *Adiantum philippense* Burm., e constataram que os locais sombreados, úmidos e com temperaturas amenas são ambientes favoráveis para a alta concentração destes pigmentos.

No local onde ocorreram as coletas, a espécie *E. luridum* é encontrada mais frequentemente um pouco abaixo do dossel das grandes árvores ($67 \pm 09 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ RFA ao meio dia), enquanto que a espécie *V. lineata* geralmente é encontrada epifitando samambaias arborescentes na altura do peito. Este fato pode explicar a quantidade superior de pigmentos na espécie *V. lineata*, pois, em seu micro-habitat, a luz chega com maior dificuldade ($18 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ RFA ao meio dia), ou seja, para melhorar o aproveitamento na absorção deste fator limitante a planta apresenta altos níveis de pigmentos fotossintéticos quando comparado aos níveis da espécie *E. luridum*.

4.5 Curvas rápidas de luz (RLC's) através da fluorescência da clorofila *a* dos esporófitos.

A análise da fluorescência da clorofila *a* obtida com auxílio de fluorímetro de pulso com amplitude modulada (PAM), em ambas as plantas estudadas, *Elaphoglossum luridum* (Tab. 1) e *Vittaria lineata* (Tab. 2), apresentou diferenças significativas entre os parâmetros fotossintéticos analisados: E_{optimum} (irradiância ótima), ETR_{max} (Taxa máxima de transporte de elétrons) e o Alfa α (Eficiência fotossintética) em esporófitos do tratamento de estresse hídrico (sete dias) e aplicação de ABA ($10\mu\text{M}$), quando comparados com o controle. Esses resultados também podem ser observados nas Curvas rápidas de luz (RLC's) de *E. luridum* (Fig. 13) e *V. lineata* (Fig. 14). Em ambas as plantas estudadas, os valores de E_{optimum} , ETR_{max} e α diminuíram independentemente do estresse a que foram submetidas, quando comparados ao tratamento controle (Tab. 1 e 2). No entanto, na espécie *V. lineata*, o parâmetro α , que se refere à eficiência fotossintética, o tratamento com aplicação de ABA apresentou o maior valor, seguido do tratamento controle e estresse hídrico

respectivamente (Tab. 2). Notou-se também que, entre os dois tratamentos de estresse, o estresse hídrico provocou maiores alterações nas Curvas rápidas de luz (RLC), em relação ao tratamento controle (Fig. 13 e 14).

Em *E. luridum*, o tratamento de estresse hídrico e aplicação de ABA ocasionaram uma redução no E_{optimum} de 26,8% e 16,9%, respectivamente. Observou-se também uma redução no parâmetro ETR_{max} no tratamento de estresse hídrico (50,5%) e no tratamento com ABA (32,5%). No parâmetro α , a redução foi de 36,1% para o tratamento de estresse hídrico, e de 20,4% para o tratamento irrigado com ABA. Todos os valores apresentados foram relacionados com o tratamento controle.

Tabela 1 Parâmetros da Curva Rápida de Luz (RLC) plotadas com ETR (P) versus irradiância (E) em esporófitos de *Elaphoglossum luridum*, sob diferentes tratamentos: Controle, Estresse hídrico e aplicação de ABA, usando o modelo de curva *Waiting-in-line*. Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes. (ANOVA seguida por teste de *Tukey* $p > 0,05$). Média $\pm$ DP ($n = 3$).

	Controle	Estresse Hídrico	ABA
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
E_{optimum} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fótons)	1.208 $\pm$ 81 a	884 $\pm$ 67 b	1.004 $\pm$ 33 b
ETR_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ elétrons)	76 $\pm$ 9 a	37 $\pm$ 8 b	51 $\pm$ 2 b
Alfa (α)	0,172 $\pm$ 0,008 a	0,110 $\pm$ 0,01 b	0,137 $\pm$ 0,001 c
(A)	196 $\pm$ 35	102 $\pm$ 24	139 $\pm$ 6
(k_w)	0,0008 $\pm$ 0,0001	0,0011 $\pm$ 0,0001	0,0001 $\pm$ 0,00004
Correlação r	0,978	0,956	0,966
n amostral / n° curvas	3 / 30	3 / 30	3 / 30

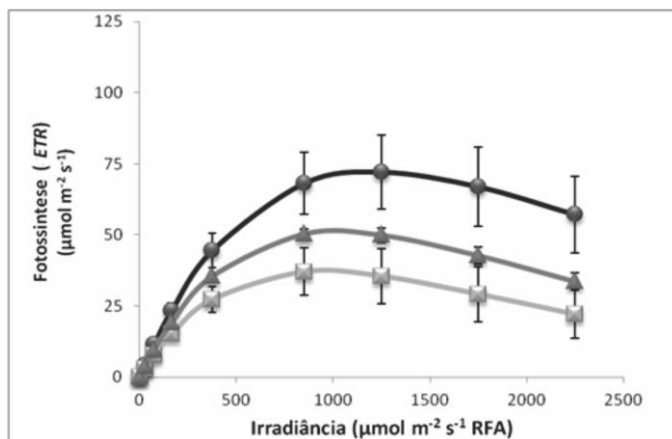


Figura 13 - Curva Rápida de Luz (RLC) Fotossíntese (ETR) versus Irradiância (E) de *Elaphoglossum luridum* sob diferentes tratamentos: (●) controle, (□) Estresse Hídrico (Δ) Aplicação de ABA. Média $\pm$ DP ($n = 3$).

Na espécie *V. lineata*, os tratamentos de estresse hídrico e aplicação de ABA ocasionaram uma redução no E_{optimum} de 19,4% e 29,1%, respectivamente. Observou-se também uma redução no parâmetro ETR_{max} nos tratamentos de estresse hídrico (26,2%) e aplicação de ABA (19,4%). No parâmetro α , a redução foi de 13,1% para o tratamento de estresse hídrico, e no tratamento com ABA, ocorreu um aumento de 13,7%. Todos os acréscimos e reduções dos valores apresentadas foram relacionados com o tratamento controle.

Outro aspecto relevante são os valores dos parâmetros fotossintéticos entre as espécies estudadas. No tratamento controle, a espécie *V. lineata* demonstrou melhores rendimentos nos pontos cardinais (E_{optimum} , ETR_{max} e α) (Tab. 1 e 2) e por consequência nas curvas rápidas de luz (Fig. 15). Essa constatação também pode ser extrapolada para ambos os tratamentos de estresse. Além da diferença significativa nos parâmetros fotossintéticos,

entre as plantas do tratamento controle e as demais estressadas e observando a comparação entre RLC's de *E. luridum* e *V. lineata*, nota-se nas curvas da primeira espécie, um decaimento mais vigoroso na amplitude da curva em resposta aos tratamentos de estresse hídrico e aplicação de ABA. Este fato sugere que a espécie *V. lineata* é menos suscetível ao estresse hídrico e à aplicação de ABA, quando comparada à espécie *E. luridum*.

Li *et al.* (2008) analisando a eficiência fotoquímica em *Cucumis sativus* L. sob estresse hídrico e elevadas concentrações de CO₂, verificaram um comportamento semelhante ao obtido no presente estudo, onde plantas submetidas ao estresse hídrico severo demonstraram redução significativa nos parâmetros ETR_{max} e RFA_{sat}, com reduções de 21% e 24% respectivamente, quando comparado aos tratamentos controle. Com respeito ao efeito de altas concentrações de CO₂, Li *et al.* (2008) observaram um incremento significativo nos parâmetros ETR_{max} e RFA_{sat}, de 8% e 7% respectivamente, quando comparados com as plantas mantidas em concentrações ambientais de CO₂.

Tabela 2 Parâmetros da Curva Rápida de Luz (RLC) plotadas com ETR (P) versus irradiância (E) em esporófitos de *Vittaria lineata*, sob diferentes tratamentos: Controle, Estresse hídrico e aplicação de ABA, usando o modelo de curva *Waiting-in-line*. Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes. (ANOVA seguida por teste de *Tukey* $p>0,05$). Média $\pm$ DP ($n = 3$).

	Controle	Estresse Hídrico	ABA
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
E_{optimum} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fótons)	1.653 $\pm$ 59 a	1.332 $\pm$ 83 b	1.172 $\pm$ 23 b
ETR_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ elétrons)	97 $\pm$ 4 a	72 $\pm$ 6 b	78 $\pm$ 4 b
Alfa (α)	0,16 $\pm$ 0,006 a	0,14 $\pm$ 0,003 b	0,18 $\pm$ 0,006 c
(k_w)	0,0006 $\pm$ 0,0001	0,0007 $\pm$ 0,0001	0,0008 $\pm$ 0,0001
(A)	259 $\pm$ 14	190 $\pm$ 22	220 $\pm$ 19
Correlação r	0,978	0,986	0,974
n amostral / n° curvas	3 / 30	3 / 30	3 / 30

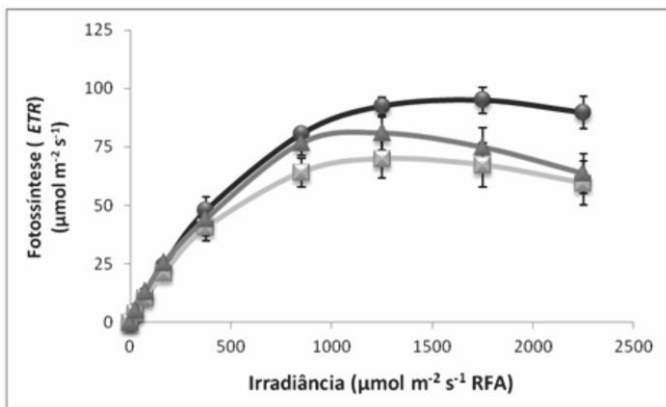


Figura 14 - Curva Rápida de Luz (RLC) Fotossíntese (ETR) versus Irradiância (E) de *Vittaria lineata* sob diferentes tratamentos: (●) controle, (□) Estresse Hídrico (Δ) Aplicação de ABA. Média $\pm$ DP ($n = 3$).

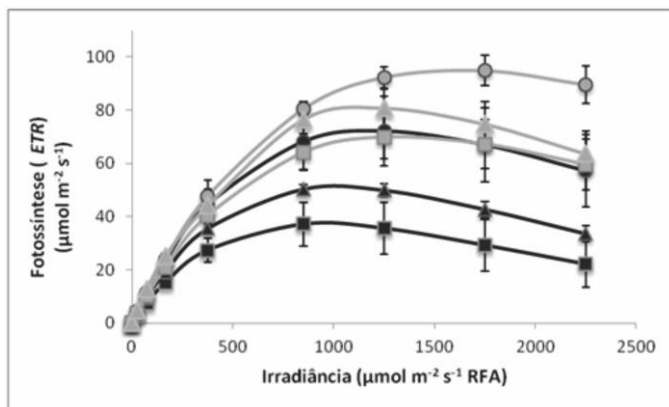


Figura 15 - Curva Rápida de Luz (RLC) Fotossíntese (ETR) versus Irradiância (E) de *Elaphoglossum luridum* (curvas em preto) e *Vittaria lineata* (curvas em cinza) sob diferentes tratamentos: (●) controle, (□) Estresse Hídrico (Δ) Aplicação de ABA. Média $\pm$ DP ($n = 3$).

No geral, o estresse hídrico pode limitar a fotossíntese por meio do fechamento estomático e através do comprometimento metabólico (Lawlor 2002), efeitos ocasionados também pela aplicação de ABA. No presente trabalho, o estresse hídrico e a aplicação de ABA levaram a queda nos valores de clorofilas, ETR_{max} e $E_{optimum}$. Resultado semelhante foi obtido por Li *et al.* (2008). Pelos dados obtidos no presente trabalho, podemos sugerir que o estresse hídrico e a aplicação de ABA exógeno, regulam negativamente a fotossíntese ou a taxa linear de transporte de elétrons nas folhas de *E. luridum* e *V. lineata* (Fig. 15).

Os resultados obtidos por Downton *et al.* (1988), analisando os efeitos do ácido abscísico na inibição da fotossíntese através do fechamento estomático, demonstram que em folhas de *Vitis vinifera* L. tratadas com este hormônio, a queda na taxa de fotossíntese chegou a 80%, quando comparada à de plantas não tratadas.

A obtenção de parâmetros fotossintéticos ($E_{optimum}$, ETR_{max} e α) a partir de uma curva rápida de luz (RLC), permite a descrição de suas características e possibilita a análise estatística dos dados para posteriores comparações. As curvas rápidas de luz de *E. luridum* e *V. lineata* referentes aos tratamentos controle, estresse hídrico (sete dias) e aplicação de ABA (10 μ m), demonstram claramente as diferenças entre as plantas controle e as plantas submetidas aos dois tratamentos de estresse, quando se analisam os parâmetros fotossintéticos ($E_{optimum}$, ETR_{max} e α). Este fato comprova a efetividade dos tratamentos de estresse aos quais ambas as plantas foram submetidas.

Os pontos cardinais obtidos a partir de uma RLC ($E_{optimum}$, ETR_{max} e α) descrevem a capacidade fotossintética foliar e suas adaptações aos possíveis estresses ambientais como seca e alta irradiância (Ralph & Gademann 2005).

No presente trabalho, ambas as espécies estudadas *E. luridum* e *V. lineata* demonstraram uma queda na capacidade de tolerar altos níveis de irradiância quando submetidas ao estresse hídrico e aplicação de ABA, comparados ao tratamento controle. Os dois tratamentos de estresse, hídrico e ABA, ocasionaram uma queda significativa nos pigmentos fotossintéticos em ambas as espécies estudadas. O decréscimo na capacidade de tolerar altos níveis de irradiância está diretamente relacionado com a queda nos teores de clorofila *a*, uma vez que as respostas obtidas através do PAM dependem diretamente dos níveis deste pigmento (Genty *et al.* 1989). Em contrapartida, não ocorreram alterações no CRA no decorrer dos tratamentos em ambas as espécies, sugerindo uma preferência pela manutenção osmótica, durante o estresse hídrico e aplicação de ABA.

Segundo Ralph & Gademann (2005), as curvas rápidas de luz (RLC) apresentam três regiões distintas: a região limitada pela luz, região saturada pela luz e a região de irradiância supra-ótima. Em baixas irradiâncias, a fotossíntese é limitada pela irradiância e a ascensão da curva na região limitada pela luz é proporcional à eficiência de captura de luz (Schreiber 2004). E_{optimum} é relacionada com o quenching da fluorescência, onde o quenching fotoquímico (qP) domina abaixo da E_{optimum} enquanto o quenching não fotoquímico (qN) domina acima da E_{optimum} (Henley 1993). Sob irradiância moderada, a capacidade de transporte de elétrons se torna um fator limitante para a fotossíntese, e a curva atinge seu ponto máximo, quando ocorre a taxa de transporte de elétrons máxima (ETR_{max}) (Schreiber 2004). Sabendo disso, nota-se que em ambas as espécies estudadas a região de irradiância supra-ótima foi mais rapidamente pronunciada nos tratamentos de estresse. Isto se relaciona com o fato de que, sob estresse, ambas as espécies apresentaram valores significativamente menores no teor de clorofila *a*, reduzindo o qP. Porém não houveram diferenças

significativas no teor de carotenoides, o que explica a precocidade do domínio de qN nas plantas submetidas ao estresse hídrico e aplicação de ABA. Este decaimento é referido na literatura como parâmetro β , que caracteriza o ângulo de declive do Fotossistema II, também chamado de fotoinibição nas tradicionais curvas de luz, considerada também como fotoproteção em equipamentos que expõe os organismos aos curtos períodos de luz (Ralph & Gademann, 2005).

Os valores de ETR foram plotados em Curvas Rápidas de Luz (RLC) taxa fotossintética (P) *versus* irradiância (E). Isto resulta da constatação de que o rendimento quântico efetivo do PSII (Φ PSII) *versus* a irradiância (E) obedecem a uma função de decaimento exponencial simples, onde parcelas de ETR contra irradiância (E) devem obedecer a uma função exponencial da forma $Y = x \cdot e^{-x}$. Este modelo de equação é conhecido como *Waiting-in-Line* (função de densidade probabilística). O modelo de equação *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 determinada densidade de substrato, podendo ser completamente inibida quando ocorre aumento no substrato (Ritchie 2008).

A equação descrita por Gloag *et al.* (2007), demonstra que ETR_{max} (Taxa máxima de transporte de elétrons) é equivalente a A/e , assim uma forma equivalente desta equação é descrita como: $P = ETR_{max} \cdot k_w \cdot E \cdot e^{1 - k_w \cdot E}$, a ETR_{max} ocorre em um valor de irradiância de $1/k_w$ ($E_{optimum} = 1/k_w$). A eficiência fotossintética máxima (α) é a inclinação inicial da curva em $E = 0$ ($\alpha = ETR_{max} \cdot e \cdot k_w$). Portanto, para a obtenção dos parâmetros fotossintéticos ($E_{optimum}$, ETR_{max} e α), nota-se uma relação direta entre as duas constantes (A , k_w) obtidas a partir desta equação. No presente estudo, os valores ajustados para

constantes (A) e (k_w) foram determinados utilizando a equação descrita por Gloag *et al.* (2007).

Segundo Ritchie (2008), o modelo de curva *Waiting-in-line* é um ótimo modelo para plotar curvas de Fotossíntese (P) *versus* Irradiância (E), mesmo quando os valores de irradiância supra-ótima não são incluídos. Esta curva apresenta parâmetros que podem ser comparados aos obtidos em outros modelos como Michaelis-Menten, saturação exponencial e tangente hiperbólica, todos estes com assintótica sob luz infinita não levando em conta a região da curva chamada de irradiância supra-ótima, onde ocorre o decaimento da ETR em resposta aos altos níveis de irradiância. O modelo capaz de descrever a fotossíntese em irradiância subótima, ótima e supra-ótima é superior aos modelos que não os fazem. O modelo de Michaelis-Menten, muito utilizado na enzimologia, tem suas justificativas para ser utilizado como um modelo potencialmente útil para as reações de luz da fotossíntese, porém as reações que ocorrem durante o processo de fotossíntese envolvem muitas enzimas dispostas em uma série complexa. Por esta razão, não é um bom modelo para o estudo da fotossíntese, pois a saturação ocorre muito lentamente e a eficiência fotossintética (α) é superestimada (Ritchie 2008).

Ritchie (2008) trabalhando com diversos organismos modelo, notou que a utilização do modelo de equação *Waiting-in-line* para plotar gráficos (P) *versus* (E), gerou dados muito próximos à realidade e também próximos aos dados obtidos com outros modelos matemáticos como saturação exponencial e tangente hiperbólica. Já com o modelo Michaelis-Menten, ele notou que os parâmetros ETR_{max} e a eficiência fotossintética (α) foram superestimados.

A interpretação cuidadosa dos dados obtidos através de uma curva rápida de luz (RLC) pode fornecer uma visão detalhada a respeito da cinética da fotossíntese em plantas submetidas aos diferentes tipos de estresse,

como o evidenciado no presente estudo. Para a caracterização ecofisiológica da capacidade fotossintética de uma planta, as RLC's e os parâmetros fotossintéticos, fornecem informações rápidas e interessantes a respeito do processo (Rascher *et al.* 2000).

4.6 Análise da concentração de malato foliar

Na espécie *Elaphoglossum luridum*, os resultados obtidos no presente trabalho não demonstram evidências do metabolismo CAM, pois não houve diferença significativa na concentração de malato entre noite/dia entre o tratamento controle, estresse hídrico e ABA (Fig. 16), indicando a ausência de acidificação noturna nas frondes desta espécie. Plantas que apresentam o metabolismo CAM são caracterizadas por abrirem os estômatos durante a noite, fixar o CO₂ atmosférico durante o período noturno e por apresentar flutuações diurnas no conteúdo de malato vacuolar (Kluge & Ting 1978).

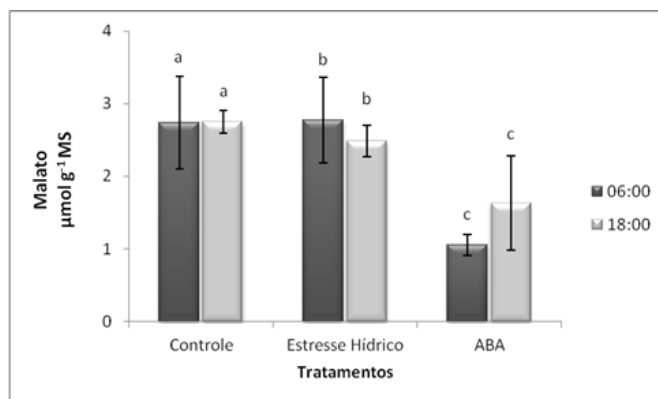


Figura 16 - Flutuação diária (06h00min – 18h00min) na Concentração de Malato em frondes de *Elaphoglossum luridum* em três diferentes tratamentos: Controle, Estresse Hídrico e aplicação de ABA. Letras iguais acima das

barras indicam equidade entre os horários das coletas de um mesmo tratamento $p < 0,05$. Média $\pm$ DP ($n = 3$).

Outro aspecto a ser considerado é a concentração do malato encontrado na espécie *E. luridum* que parece ser muitas vezes inferior à concentração encontrada em plantas que apresentam o metabolismo CAM (Chu *et al.* 1990; Freschi *et al.* 2010a; Freschi *et al.* 2010b) e também a obtida neste estudo para a espécie *Vittaria lineata* (Fig. 17). Possivelmente, a baixa concentração de malato encontrada nas folhas de *E. luridum* faz parte do metabolismo respiratório, onde o malato sofre ação da malato desidrogenase, originando NADH^+ , a partir do NAD^+ , ocorrendo assim a regeneração do oxaloacetato. Reforçando esta hipótese, nota-se uma redução na concentração de malato nas plantas tratadas com ABA (10 μM) durante quinze dias. A aplicação exógena de ABA leva ao fechamento estomático e dificulta as trocas gasosas, podendo diminuir as taxas fotossintéticas e respiratórias e por consequência, alterar negativamente a síntese de macromoléculas (Downton *et al.* 1988).

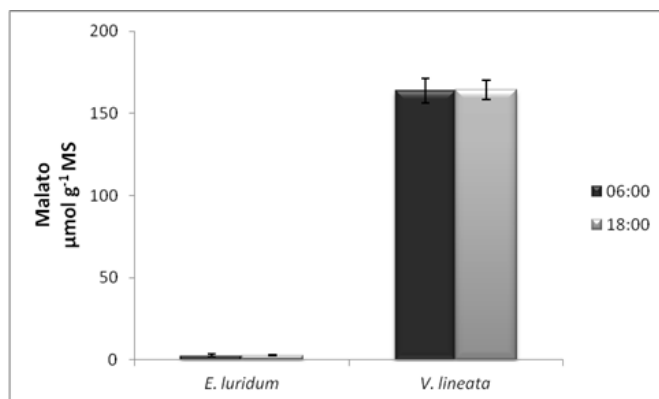


Figura 17 - Flutuação diária (06h00min – 18h00min) na Concentração de Malato em frondes dos esporófitos de

Elaphoglossum luridum e *Vittaria lineata* sob o tratamento Controle. Média $\pm$ DP ($n = 3$).

Na espécie *V. lineata*, as plantas submetidas ao tratamento controle não apresentaram diferença significativa no conteúdo de malato entre as amostras coletadas às 06h00min e às 18h00min (Fig. 18), apresentando um baixo valor de Δ Malato ($0,65 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$) (Fig. 19). Este resultado não demonstra evidências do metabolismo CAM nas plantas submetidas ao tratamento controle. Por outro lado, quando as plantas foram submetidas ao estresse hídrico por sete dias e aplicação exógena de ABA ($10 \mu\text{M}$) por um período de quinze dias, um aumento nas concentrações de Δ Malato foi evidenciado (Fig. 19), ou seja, ocorreram diferenças significativas entre noite-dia nas concentrações de malato em ambos os tratamentos de estresse, demonstrando uma acidificação noturna e revelando uma regulação positiva do metabolismo CAM em resposta aos diferentes tipos de estresse.

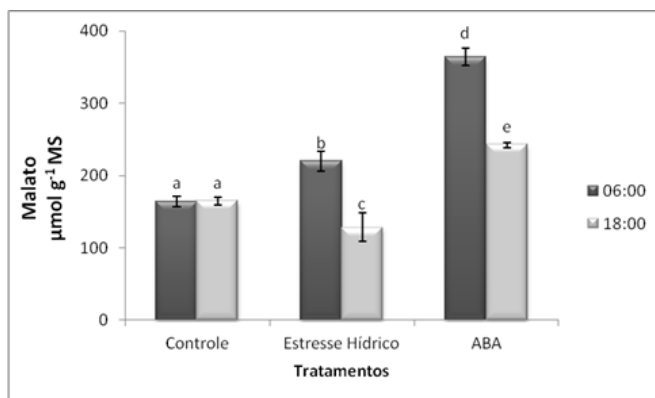


Figura 18 - Flutuação diária (06h00min – 18h00min) na Concentração de Malato em frondes de *Vittaria lineata* em três diferentes tratamentos: Controle, Estresse Hídrico e

aplicação de ABA. Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa entre os horários das coletas de um mesmo tratamento $p < 0,05$. Média $\pm$ DP ($n = 3$).

Nas folhas das plantas submetidas ao estresse hídrico e ao tratamento com a aplicação de ABA, a diferença na concentração noite-dia de malato (Δ Malato) foi 140 e 187 vezes maior, respectivamente (Fig 18). Portanto, em relação às plantas controle, as plantas tratadas com ABA demonstraram o maior acúmulo no conteúdo de malato durante o período noturno, indicando uma alta taxa de fixação noturna de CO_2 atmosférico. O acúmulo de malato durante o período noturno é uma evidência da presença do metabolismo CAM (Chu *et al.* 1990, Cushman & Borland 2002, Rut *et al.* 2008, Freschi *et al.* 2010).

Rut *et al.* (2008) analisando o conteúdo de malato em gametófitos, folhas da cobertura e folhas férteis de *Platycerium bifurcatum* (Cav.) C. Chr., uma samambaia epífita, verificaram que nas frondes da cobertura, a concentração de malato (Δ Malato) é aproximadamente quatorze vezes maior, quando comparada a concentração obtida em gametófitos e frondes férteis, sendo o metabolismo CAM evidenciado apenas nas frondes da cobertura.

Assim, foram encontradas evidências da possibilidade de alteração do modo de fixação de carbono da via C3 para o CAM, em resposta ao déficit hídrico e aplicação exógena de ABA, podendo, com isso, a espécie *V. lineata* apresentar o metabolismo CAM facultativo. As plantas que apresentam este comportamento são chamadas de CAM facultativas, em contraste com as plantas CAM obrigatórias, onde a expressão do metabolismo não depende de fatores ambientais ou de desenvolvimento (Chu *et al.* 1990). O emprego da opção facultativa do metabolismo CAM permite às plantas aumentarem as taxas

de crescimento em condições favoráveis através da assimilação de carbono via C3, e enfrentar condições de estresse através da mudança no modo de assimilação do carbono de C3 para CAM (Chu *et al.* 1990). Durante a transição C3 – CAM em plantas CAM facultativas ocorrem diversas alterações, dentre elas: incremento na atividade de enzimas chave da via C4 (PEPC), abertura noturna dos estômatos com consequente assimilação de CO₂ e flutuação na acidez foliar e no conteúdo de malato (Chu *et al.* 1990, Freschi *et al.* 2010b).

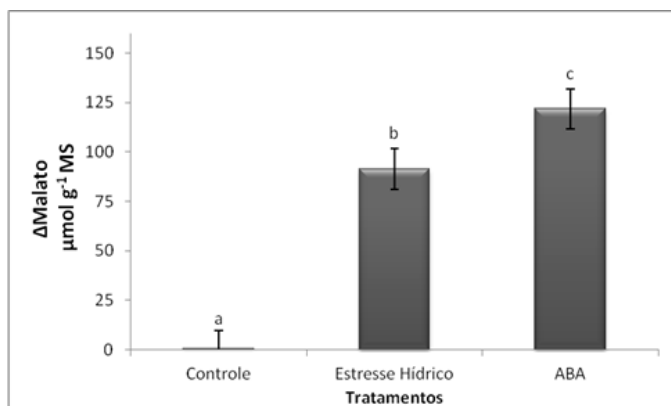


Figura 19 - Flutuação diária de Malato (Δ MALATO) em frondes de *Vittaria lineata* em três diferentes tratamentos: Controle, Estresse Hídrico e aplicação de ABA. Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos $p < 0,05$. Média $\pm$ DP ($n = 3$).

Neste estudo, também foi demonstrado que a aplicação de ABA exógeno, em concentrações micromolares, pode ser um substituto do estresse hídrico na indução do metabolismo CAM na espécie *V. lineata*. Comportamento semelhante também foi observado por Chu *et al.* (1990) na espécie facultativa,

Mesembryanthemum crystallinum L., onde a aplicação de ABA substituiu o estresse hídrico e salino na indução do metabolismo CAM.

Freschi *et al.* (2010a) trabalhando com o controle hormonal na indução do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) em plantas jovens de *Ananas comosus* L., notaram o mesmo comportamento obtido no presente estudo para a espécie *V. lineata*, entre plantas controle e as plantas tratadas com ABA (10 μ m), pois ambas mantiveram o CRA estável, indicando que a redução no CRA não é necessária para estimular a expressão do metabolismo CAM em resposta a aplicação de ABA exógeno. Reforçando este fato, *V. lineata* sob tratamento de estresse hídrico, não apresentou diferença significativa em seu CRA, contudo expressou CAM (Fig. 18).

Muitas espécies CAM facultativas passam por períodos intermitentes e imprevisíveis da seca, como é o caso de espécies epífitas, sugerindo que a modulação dinâmica de carboxilação C3 - C4 durante o ciclo diurno é uma peça chave no desempenho fisiológico destas espécies. Em condições naturais, a abordagem de marcação isotópica, demonstrou que as mudanças no metabolismo C3 - C4 ocorrem em uma base diária em resposta a mudanças ambientais, tais como disponibilidade de água e altos níveis de irradiância (Roberts *et al.* 1997).

Uma das adaptações mais importantes de algumas samambaias epífitas em resposta ao déficit hídrico é a via metabólica do metabolismo ácido das Crassuláceas (CAM). Ela permite a assimilação de CO₂ mesmo em condições de deficiência hídrica e/ou sob altas irradiâncias (Benzing 1986). Assim, as plantas CAM exibem uma forma altamente específica para concentrar o CO₂, permitindo um aumento na eficiência no uso da água. O CO₂ entra no mesofilo através dos poros estomáticos, abertos predominantemente durante a noite, e é fixado na reação catalisada pela fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) no citosol (Taiz & Zeiger 2010). Esta enzima

combina-se com fosfoenolpiruvato (PEP), levando à formação de oxaloacetato (OAA). O oxaloacetato então é reduzido ao ácido málico, o qual é acumulado nos vacúolos durante a noite (Luttge 1993). No período de transição noite-dia, os estômatos se fecham e gradualmente começa um efluxo de malato dos vacúolos (Luttge 1993). A descarboxilação do malato ocorre através de enzimas málicas ou via OAA pela PEP carboxiquinase (PEPCK) resultando em piruvato ou PEP e CO₂. Em consequência a esses fatos ocorrem alterações (dia/noite) nas concentrações de malato (Δ Malato) (Taiz e Zeiger, 2010).

A suculência foliar parece ser um pré-requisito aparente para a expressão do metabolismo CAM uma vez que muitos estudos indicaram uma forte correlação entre a espessura da folha e a magnitude da acumulação noturna de ácido málico (Borland *et al.*, 1998). Segundo os dados da morfologia foliar de *E. luridum* e *V. lineata* obtidos no presente estudo, a espessura foliar média é de 0,545 e 1,054 mm, respectivamente. Observando o CRA obtido para cada espécie, nota-se uma maior concentração relativa de água na espécie *V. lineata* (Fig. 8 e 9), corroborando com os dados obtidos por Borland *et al.* (1998). Segundo Rut *et al.* (2003), em *Platyserium bifurcatum* (Cav.) C. Chr., as folhas que produzem os esporos são as principais responsáveis pela fotossíntese, cuja epiderme é coberta por tricomas que diminuem a perda de água. Já as folhas da cobertura apresentam até 95% de água por unidade de massa fresca, sendo as únicas capazes de realizar o metabolismo CAM (Rut *et al.* 2002).

Outra aparente necessidade para o desenvolvimento do metabolismo CAM, sugerida por Jones (1975) é o tamanho do vacúolo e a necessidade de atingir um tamanho crítico para obter a capacidade de expressar o CAM. A idade da folha também parece ser importante, como observado por Libik *et al.* (2004) na espécie halófito facultativa *Mesembryanthemum crystallinum* L.. Sob estresse hídrico ou salino, a expressão

do metabolismo CAM é dependente da idade, pois após um determinado período de desenvolvimento (4-5 semanas), foi identificada a acidificação noturna. As plantas *E. luridum* e *V. lineata* nos diferentes tratamentos deste estudo foram coletadas em seus respectivos habitats naturais, devido à falta de protocolos para germinação de esporos destas espécies e a lentidão do desenvolvimento de esporófitos obtidos a partir de esporos. As plantas foram coletadas seguindo um padrão de tamanho, porém suas idades eram desconhecidas. Devido a este fato, essas plantas foram mantidas em aclimação por um período mínimo seis meses como o descrito por Ong *et al.* (1986).

Além de servir como um meio de armazenamento de CO₂, a acumulação noturna de ácidos orgânicos e o aumento concomitante da pressão osmótica dos vacúolos têm sido propostos como mecanismos de manutenção de água nas folhas (Smith & Lüttge 1985). A acumulação de ácidos orgânicos, em resposta a uma limitação de água, representa um possível mecanismo para o ajuste osmótico, com o metabolismo CAM como resultado final desta adaptação. Isto parece um cenário plausível nessas espécies (*M. crystallinum*) onde alterações durante o ciclo dia/noite em ácidos orgânicos induzidas por limitação de água são acompanhadas por um aumento global nos níveis de ácidos orgânicos foliares (Herppich *et al.* 1995).

A acumulação e remobilização de ácido málico por um período maior que um dia, alteram as trocas gasosas, influenciam a eficiência fotossintética no uso da luz, constituindo assim, uma função ecofisiológica direta para a sobrevivência das plantas CAM em ambientes xéricos (Lüttge 1987).

O metabolismo CAM já foi descrito em diferentes espécies de 328 gêneros incluídas em 33 famílias (Winter & Smith 1996). Na família Polypodiaceae, o metabolismo CAM foi encontrado em cinco espécies do gênero *Pyrrosia*, *P. confluens* R., *P. dielsii* C., *P. lanceolata* F., *P. piloselloides* L. e *P. longifolia* B. e uma espécie no gênero

Platyserium, *Platyserium bifurcatum* (Hew & Wong 1974, Wong & Hew 1976, Winter *et al.* 1983, Sinclair 1984, Ravensberg and Hennipmam 1986, Rut *et al.* 2008). Apenas a acidez titulável foi encontrada em uma espécie de *Dictymia* J. Sm. (Griffiths 1989) e na espécie *V. lineata* (Carter & Martin 1994). Recentemente duas espécies da família Vittariaceae (*Vittaria flexuosa* Fée e *Anetium citrifolium* (L.) Splitg.) apresentaram algumas evidências do metabolismo CAM (Martin *et al.* 2005).

Os dados de acidez titulável podem não ser suficientes para comprovar a presença do metabolismo CAM, pois outras substâncias além do malato podem estar influenciando o pH das amostras. Após Carter & Martin (1994) ter encontrado uma pequena flutuação diária na acidez titulável na espécie *V. lineata*, outros estudos foram feitos para tentar comprovar a presença do metabolismo ácido das crassuláceas nesta espécie.

Zotz & Ziegler (1997) estudando a ocorrência do metabolismo ácido das crassuláceas em diferentes epífitas vasculares em uma floresta central no Panamá, verificaram através da isomeria do ^{13}C a presença do metabolismo C3 na espécie *V. lineata*. Esses autores analisaram a isomeria de vinte e uma espécies da família Polypodiaceae, entre elas a espécie *V. lineata*, e concluíram que nenhuma espécie desta família apresentava o metabolismo CAM. Zotz (2004) ainda relaciona a espécie *V. lineata* como uma espécie C3.

Corroborando os dados obtidos por Zotz & Ziegler (1997), Martin *et al.* (2005) estudando a ocorrência do metabolismo CAM em samambaias epífitas, com ênfase na família Vittariaceae, verificaram a ausência de acidificação noturna nas folhas da espécie *V. lineata*. Após este resultado, Martin *et al.* (2005), decidiram aprofundar os estudos na espécie e realizaram novos experimentos analisando a acidez titulável e as trocas gasosas, onde mesmo sob estresse hídrico as plantas não apresentaram

acúmulo de acidez noturna e fixação de CO₂ durante este período.

Observando os resultados obtidos por Carter & Martin (1994), Martin *et al.* (2005) atribuíram a diferença entre os resultados destes dois trabalhos à característica esporádica da presença do metabolismo CAM na espécie *V. lineata*. As taxas foliares de isótopos de carbono para muitas plantas CAM facultativas, tendem a apresentar valores que indicam a presença do metabolismo C₃, valores que são relativamente constantes em toda uma gama de condições ambientais (Griffiths 1992).

Portanto, observando os fatos, pode-se concluir que todas as controvérsias discutidas a respeito do tipo de metabolismo fotossintético da espécie *V. lineata* (Carter & Martin 1994, Zotz & Ziegler 1997, Zotz 2004, Martin *et al.* 2005) se devem à possível presença do metabolismo CAM facultativo, dificultando a interpretação dos dados e necessitando de metodologia específica.

Em concentrações elevadas de CO₂ atmosférico, algumas espécies CAM demonstram um aumento médio de biomassa de aproximadamente 35%, valor normalmente observado em muitas espécies C₃ (Drennan & Nobel 2000). As tendências atuais demonstram o aumento de CO₂ na atmosfera, associado ao aquecimento global, juntamente com aumentos previstos em regiões áridas do planeta, levantam a possibilidade de que captação líquida de CO₂, a alta produtividade e a grande quantidade de possíveis habitats para espécies CAM, reforçarão o papel destas plantas no futuro (Cushman & Borland 2002).

5. CONCLUSÕES

Os estudos morfológicos de *Elaphoglossum luridum* e *Vittaria lineata* mostraram que os indivíduos analisados apresentam características relacionadas às condições xéricas ligadas ao hábito epifítico, possibilitando interpretações à cerca da adaptação destas plantas às peculiaridades do ambiente onde ocorrem. Em ambas espécies destacam-se como características xeromórficas, relacionadas à economia hídrica: suculência da lâmina foliar, cutícula espessa e estômatos restritos à face abaxial. Em *E. luridum* ocorre a presença de tricomas do tipo escama, em ambas as faces foliares. *V. lineata* apresenta estômatos restritos ao interior dos sulcos lineares, permitindo a criação de um microclima úmido. As características estruturais encontradas em ambas espécies relacionam-se com adaptações que favorecem a economia hídrica.

Os estudos fisiológicos evidenciaram aspectos xéricos nas espécies estudadas, pois, em ambas as espécies, o tratamento de estresse hídrico e aplicação de ABA, não ocasionaram alterações no CRA das frondes, quando comparados ao tratamento controle. Apesar de não haver alterações significativas no CRA nas plantas submetidas aos estresses induzidos, notaram-se alterações na concentração das clorofilas *a* e *b* e consequentemente, redução nos parâmetros fotossintéticos (α , E_{optimum} e ETR_{max}). Estes resultados demonstram a prioridade destas plantas em manter o equilíbrio hídrico mesmo em condições adversas. Quanto à concentração de ácido málico foliar, a espécie *E. luridum* não apresentou acidificação noturna em nenhum dos tratamentos. Já a espécie *V. lineata* apresentou acidificação noturna somente nos tratamentos de estresse induzido, indicando evidências do metabolismo CAM facultativo para a espécie, a primeira espécie Polypodiaceae a apresentar este comportamento. Também foi demonstrado que a aplicação

exógena de ABA pode substituir o tratamento de estresse hídrico durante a tentativa de indução da expressão do metabolismo CAM e que o mesmo pode ser induzido mesmo que não ocorra redução no CRA nas frondes de *V. lineata*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ashraf, M.Y.; Azmi, A. R.; Khan, A. H.; Ala, S. A. 1994. Effect of water stress on total phenols, peroxidase activity and chlorophyll content in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Acta. Physiol. Plant.** 16(3): 185-191.

Atkinson, C. J.; Mansfield, T. A.; McAinsh, M. R.; Brownlee C.; Hetherington A.M. 1990. Interactions of calcium with abscisic-acid in the control of stomatal aperture. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen.** 186: 333-339.

Bano, A.; Aziz, N. 2003. Salt and drought stress in wheat and the role of abscisic acid. **Pak. J. Bot.** 35, (5): 871-883.

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

Beer, S.; Vilenkin, B.; Weil, A. 1998. Measuring photosynthetic rates in seagrasses by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. **Mar. Ecol.-Prog. Ser.** 174: 293-300.

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

Benzing, D. H. 1986. **The vegetative basis of vascular epiphytism.** Selbyana 9: 23-43.

Benzing, D. H. 1990. **Vascular epiphytes.** Cambridge University Press, Cambridge.

Benzing, D. H. 1995. Vascular Epiphytes. In: M. D. Lowman, N. M. Nadikarni (Eds.). **Forest Canopies.** Academic Press, New York. 225-251.

Bilger, W.; Björkman, O. 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynth. Res.** 25: 173-185

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-2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77-K among vascular plants of diverse origins. **Planta**. 170:489-504.

Black, C. C.; Osmond, C. B. 2003. Crassulacean acid metabolism photosynthesis; “working the night shift”. **Photosynth. Res.** 76: 329–341

Bondada, B.; Tu, C.; Ma, L. 2006. Surface structure and anatomical aspects of Chinese brake fern (*Pteris vittata*; Pteridaceae). **Brittonia**. 58(3): 217-228.

Borland, A. M.; Tecsí, L. I.; Leegood, R. C.; Walker, R. P. 1998. Inducibility of crassulacean acid metabolism (CAM) in *Clusia* species: physiological/biochemical characterisation and intercellular localization of carboxylation and decarboxylation processes in three species which exhibit different degrees of CAM. **Planta**. 205: 342-351.

Bukatsch, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**. 61: 255.

Carter, J. P.; Martin, C.E. 1994. The occurrence of crassulacean acid metabolism among epiphytes in a high-rainfall region of Costa Rica. **Selbyana** 15: 104-106.

Chu, C., Dai, Z., Ku, M. S. B.; Edwards, G. E. 1990. Induction of Crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* by abscisic acid. **Plant. Physiol.** 93: 1253–1260.

Collinson, M. E. 1996. “What use are fossil ferns?” 20 years on: with a review of the fossil history of extant pteridophyte families and genera. *Apud*: Camus, J. M.; Gibby, M. & Johns, R. J. (ed.). **Pteridology in Perspective**. Royal Botanic Gardens, Kew. 349-394.

Costa, A. F. 1982. **Farmacognosia**. 3(2). Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.

Coutinho, L. M. 1962. Contribuição ao conhecimento da mata pluvial tropical. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Botânica**. 18: 1-219.

Cowan, I. R. 1982. Water use and optimization of carbon assimilation. In: Lange, *et al.* (Eds.), **Physiological Plant Ecology II**, vol. II. Springer-Verlag, Berlin, p. 589–613.

Cushman, J. C.; Borland, A. M. 2002. Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. **Plant Cell Environ.** 25: 295-310.

DeLucia, E. H.; Nelson, K.; Vogelmann, T. C. & Smith, W. K. 1996. Contribution of intercellular reflectance to photosynthesis in shade leaves **Plant Cell Environ.** 19: 159-170.

- Dodd, A. N.; Borland, A. M.; Haslam, R. P.; Griffiths, H.; Maxwell, K. 2002. Crassulacean acid metabolism; plastic, fantastic. **J. Exp. Bot.** 53: 569-580.
- Downton, W. J. S.; Loveys, B. R.; Grant, J. R. 1988. Stomatal closure fully accounts for the inhibition of photosynthesis by abscisic acid. **New Phytol.** 108: 263-266.
- Drennan P. M.; Nobel P. S. 2000. Responses of CAM species to increasing atmospheric CO₂ concentrations. **Plant Cell Environ.** 23: 767-781.
- Duarte, C. C. 2003. **Detecção óptica da eficiência quântica da fotossíntese.** 109 p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- 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. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.** 3(1): 39-45.
- Engwald, S.; Schimit-Newerburg V.; Barthlott, W. 2000. Epiphytes in rain forests of Venezuela – diversity and dynamics of a biocenosis. *Apud*: S. W. Breckle, B. Schweizer, U. Arndt (Ed.). *Proceedins of the first symposium.* **A. W. F. Schimper Foundation.** 425-435.
- Erdtman, G. 1952. **Pollen morphology and plant taxonomy - Angiosperms.** Almquist & Wiksell, Stockholm.
- Fahn, A. 1990. **Plant anatomy.** 4th ed. Pergamon Press, Oxford.
- Farooq, U.; Bano, A. 2006. Effect of abscisic acid and chlorocholine chloride on nodulation and biochemical

content of *Vigna radiata* L. under water stress. **Pak. J. Bot.** 38(5): 1511-1518.

Ferrari, F. B. **Anatomia foliar de espécies de aspleniaceae e polypodiaceae (monilófitas) ocorrentes no parque estadual da serra do brigadeiro, MG, BRASIL.** 2009. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa.

Freschi, L.; Rodrigues, M. A.; Domingues, D. S.; Purgatto, E.; Sluys, M. A.; Magalhães, J. R.; Kaiser, W. M.; Mercier, H. 2010a. Nitric Oxide Mediates the Hormonal Control of Crassulacean Acid Metabolism Expression in Young Pineapple Plants. **J. Plant Physiol.** 152: 1971-1985.

Freschi, L.; Rodrigues, M. A.; Tiné, M. A. S.; Mercier, H. 2010b. Correlation between citric acid and nitrate metabolisms during CAM cycle in the atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana*. **J. Plant Physiol.** 167: 1577-1583.

Fryns-Claessens, E. & Van Cotthem, W. 1973. **A new classification of the ontogenetic types of stomata. The Botanical Review.** Springer New York. 39(1): 71-138.

Gadallah, M. A. A. 1995. Effect of water stress, abscisic acid and proline on cotton plants. **J. Arid Environ.** 30: 315-325.

Garcia-Mata C.; Lamattina L. 2009. Nitric Oxide Induces Stomatal Closure and Enhances the Adaptive Plant Responses against Drought Stress. **Plant Physiol.** 150: 531-531.

Genty, B.; Briantais, J. M.; Baker, N. R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic

electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochim. Biophys. Acta.** 900: 87-92.

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

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*. **Biochim. Biophys. Acta** 1767(2): 127-35.

Griffiths, H. 1989. Carbon dioxide concentrating mechanisms and the evolution of CAM in vascular epiphytes. In: Lüttge, U. (ed.): Vascular Plants as Epiphytes: Evolution and Eco-physiology. **Springer-Verlag**, Berlin – Heidelberg – New York – London – Paris – Tokyo – Hong Kong. 42-86.

Griffiths H. 1992. Carbon isotope discrimination and the integration of carbon assimilation pathways in terrestrial CAM plants. **Plant Cell Environ.** 15: 1051-1062.

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

Haslam, E. 1988. Plant polyphenols (syn. Vegetable tannins) and chemical defense - a reappraisal. **J. Chem. Ecol.** 14: 1789-1805.

Henley, W. J. 1993. Measurement and Interpretation of Photosynthetic Light-Response Curves in Algae in the Context of Photoinhibition and Diel Changes. **J. Phycol.** 29(6): 729-739.

Hernández, V.; Terrazas, T.; Angeles, G. 2006. Anatomía de seis especies de helechos del género *Dryopteris* (Dryopteridaceae) de México. **Int. J. Trop. Biol.** 54(4): 1157-1169.

Herppich, M.; Herppich, W.B.; Willert, D.J. 1995. Diurnal rhythm in citric acid content preceded the onset of night-time malic acid accumulation during metabolic changes in C3 to CAM in salt-stressed plants of *Mesembryanthemum crystallinum*. **J. Plant Physiol.** 147: 38-42.

Hew, C. S.; Wong, Y. S. 1974. Photosynthesis and respiration of ferns in relation to their habitat. **Am. Fern J.** 64: 40-48.

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

Hoagland, D. R.; Arnon D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. **Calif. Exp. Stn. Circ.** 347: 1-39.

Holt, N. E.; Fleming, G. R.; Niyogi, N. K. 2004. Toward an understanding of the mechanism of nonphotochemical quenching in green plants. **Biochemistry.** 43: 8281-8289.

Holtum, J. A. M.; Winter, K. 1999. Degrees of crassulacean acid metabolism in tropical epiphytic and lithophytic ferns. **Aust. J. Plant Physiol.** 26: 749-757.

Holtum, R. E. 1938. The ecology of tropical pteridophytes. Apud: VERDOORN, C. **Manual of Pteridology.** Hague, Martinus Nijhoff. 420-449.

Horton, R. F. 1971. Stomatal opening: the role of abscisic acid. **Can. J. Bot.** 49: 583-85.

Horton, R. F.; Moran, L. 1972. Absciscic acid inhibition of potassium flux into stomatal guard cells. **Z. Pflanzenphysiol.** 66: 193-196.

Jadhav, B.; Shaikh, S. D.; Dongare, M. 2011. Phytochemical Studies in Eleven Species of Ferns from Satara District of Maharashtra (India). **Sci. Technol.** 3(9): 20-21.

Jaing, Y.; Yang, W. Y.; Jiang, X.; Qiaoyon, C. 1994. Active oxygen demand and effect on chlorophyll degradation in rice seedling under osmotic stress. **Acta Bot. Sin.** 36: 289-295.

Jensen, W. A. 1962. **Botanical histochemistry: principles and practice.** San Francisco: W. H. Freeman & Co. 408 p.

Johansen, D. A. 1940. **Plant microtechnique.** New York: McGraw Hill Book. 523p.

Jones, D. L. 1987. **Encyclopaedia of ferns: an introduction to ferns, their structure, biology, economic importance, cultivation and propagation.** Lothian Publishing Company, Melbourne, Austrália.

Jones, M. B. 1975. The effect of leaf age on leaf resistance and CO₂ exchange of the CAM plant *Bryophyllum fedtschenkoi*. **Planta** 123: 91-96.

Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F.; Donoghue, M. J. 2009. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético.** 3 ed. Artmed, Porto Alegre, 632p.

Kluge, M.; Ting, I. P. 1978. **Crassulacean Acid Metabolism: Analysis of an Ecological Adaptation.** Berlin, Springer-Verlag.

Kluge, M., Avadhani, P. N.; Goh, C. J. 1989. Gas Exchange and water relations in epiphytic tropical ferns. In: U. Lüttge (ed.). **Vascular Plants as Epiphytes. Ecological Studies** 76. Spriger-Verlag, Berlin. p. 87-109.

Krause, G. H.; Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics. **Annu. Rev. Plant. Phys.** 42: 313-349.

Kress, W. J. 1986. A symposium: the biology of tropical epiphytes. **Selbyana**. 9: 1-22.

Lambers, H.; Stuart, F. & Pons, T.L.1998. **Plant Physiol. Ecol.** Springer-Verlag, New York. 540p.

Larcher, W. 2000. **Ecofisiologia Vegetal**. Editora Rima, São Carlos. 531p.

Lawlor, D. W. 2002. Limitation to Photosynthesis in Water-stressed Leaves : Stomata vs. Metabolism and the Role of ATP. **Ann. Bot-London**. 89: 871-885.

Lehn, C. R.; Schmitt, J. L.; Windisch, P. G. 2002. Aspectos de desenvolvimento vegetativo de *Rumohra adiantiformis* (Forst) Ching (Pteridophyta, Dryopteridaceae), em condições naturais. **Rev. Est.** 25: 21-28.

Li, Q. M.; Liu, B. B.; Wu, Y.; Zou, Z. R. 2008. Interactive Effects of Drought Stresses and Elevated CO₂ Concentration on Photochemistry Efficiency of Cucumber Seedlings. **Journal Integr. Plant Biol.** 50(10): 1307-1317.

Libik, M.; Pater, B.; Elliot, S.; Slesak, I.; Miszalski, Z. 2004. Malate accumulation in different organs of *Mesembryanthemum crystallinum* L. following age-dependent or salinity-triggered CAM metabolism. **Z. Naturforsch.** 59: 223-228.

Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Method. Enzymol.** 148: 350-382.

Liebsch, D.; Marques, M. C. M.; Goldenberg, R. 2008. **How long does the Atlantic Rain Forest take to recover after a disturbance? Changes in species composition and ecological features during secondary succession.** *Biological Conservation.* 141: 1717-1725.

Lüttge U. 1987. Carbon dioxide and water demand: Crassulacean acid metabolism (CAM), a versatile ecological adaptation exemplifying the need for integration in ecophysiological work. **New Phytol.** 106: 593-629.

Lüttge, U. 1993. The role of crassulacean acid metabolism (CAM) in the adaptation of plants to salinity. **New Phytol.** 125: 59-71.

Lüttge U. 1997. **Physiological ecology of tropical plants.** Springer Verlag: Berlin, Germany.

Lüttge, U.; Ball, E.; Kluge, M.; Ong, B. L. 1986. Photosynthetic light requirements of various tropical vascular epiphytes. **Physiol. Veg.** 24: 315-331.

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

Marenco, R. A.; Lopes, N. F. 2005. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Viçosa - MG, Editora UFV, 451 p.

Marrè, E. F. 1979. A tool in plant physiology. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 30: 273-289.

Martin, S. L.; Davis, R.; Protti, P.; Lin, T.; Lin, S.; Martin, C. E. 2005. The occurrence of crassulacean acid metabolism in epiphytic ferns, with an emphasis on the vittariaceae. **Int. J. Plant Sci.** 166(4): 1-9.

Mauseth, J. D. 1988. **Plant Anatomy**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California. 560p.

Maxwell, K.; Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence: A practical guide. **J. Exp. Bot.** 51(345): 659-668.

Mayaba, N.; Beckett, R. P.; Csintalan, Z.; Tuba, Z. 2001. ABA Increases the Desiccation Tolerance of Photosynthesis in the Afromontane Understorey Moss *Atrichum androgynum*. **Ann. Bot-London**. 88: 1093-1100.

Metcalfe, C. R.; Chalk, L. 1950. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press. v. 2.

Mickel, J. T.; Atehortu'a, L. 1980 Subdivision of the genus *Elaphoglossum*. **Am. Fern J.** 70: 47-68.

Mittermeier, R. A.; Gil, P. R.; Hoffmann, M.; Pilgrim, J.; Brooks, T.; Mittermeier, C. G.; Lamourex, J.; Fonseca, G. A. B. 2004. **Hotspots revisited**. Cemex, Mexico City, 392p.

- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci.** 7: 405-410.
- Morellato, L. P. C.; Haddad, C. F. B. 2000. The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica** 32: 786-792.
- Möllering, H. 1985. L(-) malate. In: Bergmeyer, H.U. (ed.): **Methods of Enzymatic Analysis**. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim. 3(7): 39-47.
- Moran, R. C. 2004. **A natural history of ferns**. Timber Press, Portland. 301p.
- Moran, R. C.; Hanks, J. G.; Rouhan, G. 2007. Spore morphology in relation to phylogeny in the fern genus *Elaphoglossum* (Dryopteridaceae). **Int. Journal Plant Science**. 168(6): 905-929.
- Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B.; Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. 403: 853-858.
- Muller, L.; Starnecker G.; Winkler S. 1981. Zur Ökologie epiphytischer Farne in Südbrasilien. I. Saugschuppen. **Flora**. 171: 55-63.
- Nadikarni, N. M. 1985. An ecological overview and checklist of vascular epiphytes in the Monteverde Cloud Forest Reserve, Costa Rica. **Brenesia**. 24: 55-62.
- Neales, T. F.; Hew, C. S. 1975. Two types of carbon fixation in tropical orchids. **Planta**. 123: 303-306.
- Neill, S. J.; Desikan, R.; Clarke, A.; Hancock, J. T. 2002. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. **Plant Physiol**. 128: 13-16.

Nieder, J. Prosperí, J.; Michaloud, G. 2001. Epiphytes and their contribution to canopy diversity. **Plant Ecol.** 153: 51-63.

Niewiadomska, E.; Miszalski, Z.; Silesak, I.; Ratajczak, R. 1999. Catalase activity during C3–CAM transition in *Mesembryanthemum crystallinum* L. leaves. **Free Radic. Res.** 31: 251-256.

Nimmo, H. G. (2000) The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. *T. Plant Sci.* 5: 75-80.

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

Ogura, Y. 1972. **Comparative anatomy of vegetative organs of the pteridophytes.** 2ed. Gebrüder Borntraeger, Berlin.

Ong, B. L.; Kluge, M.; Friemert, V. 1986. Crassulacean acid metabolism in the epiphytic ferns *Drymoglossum piloselloides* and *Pyrrosia longifolia*: studies on responses to environmental signals. **Plant Cell Environ.** 9: 547-557.

Page, C. N. 1979. The diversity of ferns. An ecological perspective. *Apud*: Dyer, A.F. **The experimental biology of ferns.** London, Academic Press. 18: 10-53.

Page, C. N. 2002. Ecological strategies in fern evolution: a neopteridological overview. **Rev. Paleobot. Palyno.** 119(1-2): 1-33.

Panteris, E.; Galatis, B. 2005. The morphogenesis of lobed plant cells in the mesophyll and epidermis: organization and distinct Phytologist. **New Phytol.** 167(3): 721-732.

Pierce, S.; Winter, K.; Griffiths, H. 2002. The role of CAM in high rainfall cloud forests: an *in situ* comparison of photosynthetic pathways in Bromeliaceae. **Plant Cell Environ.** 25: 1187-1189.

Poulson, M. E. T.; C. Vogelmann. 1990. Epidermal focusing and effects on photosynthetic light harvesting in leaves of *Oxalis*. **Plant Cell Environ.** 13: 803-811.

Prado, J. Revisões e monografias como base para análise da diversidade, o quanto conhecemos sobre a nossa flora. *Apud*: Jardim, M. A. G.; Bastos, M. N. C.; Santos, J. U. M. (Eds.). **Desafios da Botânica brasileira no novo milênio: inventário, sistematização e conservação da diversidade vegetal**. Belém: MPEG/UFRA/ EMBRAPA, 2003. 78-79.

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. **Am. J. Bot.** 91(10): 1582-1598.

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

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

Rascher, U.; Liebig, M.; Lüttge, U. 2000. Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence

parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. **Plant Cell Environ.** 23: 1397-1405.

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

Ravensberg, W. J.; Hennipman, E. 1986. The *Pyrrosia* species formerly referred to as *Drymoglossum* and *Saxiglossum*. **L. Bot. Ser.** 9: 281-310.

Ribeiro, M. C.; Metzger, J. P.; Martensen, A. C.; Ponzoni, F. J.; Hirota, M. M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biol. Conserv.** 142: 1144-1156.

Ritchie, R. J. 2008. Fitting light saturation curves measured using modulated fluorometry. **Photosynth. Res.** 96(3): 201-15.

Roberts A.; Borland A.M.; Griffiths H. 1997. Discrimination processes and shifts in carboxylation during the phases of crassulacean acid metabolism. **Plant Physiol.** 113: 1283-1291.

Ross, M. 1996. Mapping the worlds pteridophytes diversity – systematics and floras. In: Camus, J.M.; Johns, R.J. (Ed.). **Pteridology in Perspective**. Kew: Royal Botanical Gardens. 29-42.

Ruban, A. V.; Horton, P. 1999. The Xanthophyll Cycle Modulates the Kinetics of Nonphotochemical Energy Dissipation in Isolated Light-Harvesting Complexes, Intact Chloroplasts , and Leaves of Spinach. **Plant Physiol.** 119(50): 531-542.

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

Rut, G.; Krupa, J.; Rzepka, A. 2002. Effects of simulated osmotic drought on intensity of gaseous exchange in gametophytes of the fern *Platycerium bifurcatum*. In: **Ecophysiology of Plant Stress**. Proceedings of the 5th International Conference. 75-78.

Rut, G.; Krupa, J.; Rzepka, A. 2003. The influence of simulated osmotic drought on functioning of the photosynthetic apparatus in gametophytes of the epiphytic fern *Platycerium bifurcatum*. **Pol. J. Nature Sci.** 62(3): 114-115.

Rut, G.; Krupa, J.; Miszalski, Z.; Rzepka, A. 2008. Crassulacean acid metabolism in the epiphytic fern *Platycerium bifurcatum*. **Photosynthetica**. 46(1): 156-160.

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

Schimper, A. F. W. 1888. **Die epiphytische Vegetation Amerikas**. Jena: Gustav Fischer. 162p.

Schmidt, E. C. 2009. **Efeitos da Radiação Ultravioleta-B sobre a morfologia de *Kappaphycus alvarezzi* (Doty). Ex P.Silva (gigantinalis) variantes pigmentares verde e vermelha**, 2009, 140 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Schreiber, U. 2004. Pulse-amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method. In: Papageorgiou, G. and

Govindjee (Ed.) **Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration series.** Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

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 Physiol.** 36: 873-882.

Sehnem, A. 1977. As filicíneas do Sul do Brasil, sua distribuição geográfica, sua ecologia e suas rotas de imigração. **Pesquisas Botânica**, São Leopoldo. 31: 1-108.

Sehnem, A. 1979. Semelhanças e diferenças nas formações florestais do Sul do Brasil. **Acta Biol. Leopold.** 1: 111-135.

Seiferman-harms, D. 1987. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. **P. Plant.** 69: 561-568.

Shaikh, S. D.; Dongare, M. 2008. Analysis of Photosynthetic Pigments in *Adiantum lunulatum* B. at different localities of Sindhudurg District. **Ind. Fern J.** 25: 83-86.

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. 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 Regul.** 24: 203-210.

Sinclair, R. 1984. Water relations of tropical epiphytes. III. Evidence for Crassulacean acid metabolism. **J. Exp. Bot.** 35: 1-7.

Silveira, K.; Santiago, L. S.; Winter, K. 2005. Distribution of crassulacean acid metabolism in orchids of Panama: evidence of selection for weak and strong modes. **Funct. Plant Biol.** 32: 397-407.

Slatyer, R. O.; Taylor, S. A. 1960. Terminology in plant and 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(3): 705-731.

Smith, J. A. C.; Lüttge U. 1985. Day-night changes in leaf water relations associated with the rhythm of crassulacean acid metabolism in *Kalanchoë diargemontiana*. **Planta** 163: 272-282.

Sobral, M.; Stehmann, J. R. 2009. An analysis of new angiosperm species discoveries in Brazil (1990 - 2006). **Taxon** 58: 227-232.

Sota, E. R. 1965. Las especies escamosas del género *Polypodium* L. (S.Str.) en Brasil. Revista del Museo de La Plata: **Botanica**. 42: 243-271.

Stehmann J. R.; Forzza R. C.; Salino A.; Sobral M.; Costa D. P.; Kamino L. H. Y. 2009. Plantas da Floresta Atlântica. Rio de Janeiro: **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 516 p.

Stevenson, D. W.; Loconte, H. 1996. Ordinal and familial relationships of pteridophyte genera. In: Camus, J.M.;

Gibby, M. & Johns, R.J. (Ed.). **Pteridology in Perspective**. Royal Botanic Gardens, Kew. 435-467.

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

Tabarelli, M.; Pinto, L. P.; Silva, J. M. C.; Hirota, M. M. 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**. 1(1): 132-138.

Tamaki, V.; Mercier, H. 1997. Diurnal variation in vacuolar acidity and PEP-carboxylase activity in *Tillandsia pohliana* Mez (Bromeliaceae) grown in vitro. **Bromélia**. 4:16-23.

Taiz, L. & Zeiger, E. 2010. **Plant Physiology**. 5.ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 782 p.

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. **Aust. J. Plant Physiol**. 28: 775-783.

Thalooth, A. T.; Tawfik, M. M.; Mohamed, H. M. 2006. A Comparative Study on the Effect of Foliar Application of Zinc, Potassium and Magnesium on Growth, Yield and Some Chemical Constituents of Mungbean Plants Grown under Water Stress Conditions. **World J. Agricultural Sci**. 2(1): 37-46.

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

Tryon, R. M. 1985. Fern speciation and biogeography. In: Dyer, A.F.; Page, C.N. (Ed.). **Biology of pteridophyte**. The Royal Society of Edimburg. 353-360.

Tryon, R. M.; Tryon, A.F. 1982. **Ferns and allied plants with special reference to Tropical America**. New York: Springer-Verlag. 857 p.

Van Kooten, O.; Snel, J. F. H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynth. Res.** 25(3): 147-150.

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

Walton, D. C. 1980. Biochemistry and physiology of abscisic acid. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 31: 453-489.

Wang, Y. X.; Biao, S.; Zhao, P. F. 2011. Effect of Abscisic Acid Treatment on psbA Gene Expression in Two Wheat Cultivars during Grain Filling Stage under Drought Stress. **Acta Agron. Sin.** 37(8): 1372-1377.

Watson, R. W. 1942. The effect of cuticular hardening on the form of epidermal cells. **New Phytol.** 41: 223-229.

Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **J. Plant Physiol.** 144(3): 307-313.

White, A. J.; Critchley, C. 1999. Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. **Photosynth. Res.** 59(1): 63-72.

Windisch, P. G. 1992. **Pteridófitas da região Norte-Ocidental do Estado de São Paulo: guia para estudo e excursões**. São José do Rio Preto: UNESP. 110 p.

Windisch, P. G.; Nonato, F. R. 1999. Pteridófitas do estado de Mato Grosso, Brasil: Vittariaceae. **Acta Bot. Bras.** 13(3): 291-297.

Winter, K.; Smith, J. A. C. 1996. **Crassulacean acid metabolism; biochemistry, ecophysiology and evolution. Ecological studies**. 114. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Winter, K.; Wallace, B. J.; Stocker, G. C.; Roksandic, Z. 1983. Crassulacean acid metabolism in Australian vascular epiphytes and some related species. **Oecologia** 57: 129-141.

Wolf, F. T. 1958. Chlorophylls A and B in the Pteridophytes. Bulletin of the Torrey **Bot. Club**. 85(1): 1-4.

Wong, S. C.; Hew, C. S. 1976. Diffusive resistance, titratable acidity, and CO₂ fixation in two tropical epiphytic ferns. **Am. Fern. J.** 66: 121-124.

Yamasaki, S.; Dillenburg, L. R. 1999. Measurements of leaf relative water content in *Araucaria angustifolia*. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.** 11(2), 69-75.

Yang, J.; Zhang, J.; Wang, Z.; Zhu, Q.; Liu, L. 2001. Water Deficit-Induced Senescence and Its Relationship to the Remobilization of Pre-Stored Carbon in Wheat during Grain Filling. **Agron. J.** 93: 196-206.

Zambryski, P.; Crawford, K. 2000. Plasmodesmata: Gatekeepers for Cell-to-Cell Transport of Developmental Signals in Plants. **Annu. Rev. Cell Dev. Bio.** 16: 393-421.

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

Zhang, X.; Zhang, L.; Dong, F.C.; Gao, J.F.; Galbraith, D.W.; Song, C.P. 2001. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. **Plant Physiol.** 126: 1438-1448.

Zotz, G. 2004. How prevalent is crassulacean acid metabolism among vascular epiphytes? **Oecologia.** 138(2): 184-192.

Zotz, G.; Ziegler, H. 1997. The occurrence of crassulacean acid metabolism among vascular epiphytes from Central Panama. **New Phytologist.** 137(2): 223-229.