

Adriano Moratelli Fonini

**RESPOSTAS DE ACLIMATAÇÃO DE *Acrostichum
danaeifolium* Langsd. & Fisch. (POLYPODIOPSIDA,
PTERIDACEAE) À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Dra. Áurea Maria Randi

Co-orientadora: Dra. Ana Claudia Rodrigues

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fonini, Adriano Moratelli

RESPOSTAS DE ACLIMATAÇÃO DE *Acrostichum danaeifolium*
Langsd. & Fisch. (POLYPODIOPSIDA, PTERIDACEAE) À RADIAÇÃO
ULTRAVIOLETA B / Adriano Moratelli Fonini ; orientadora,
Áurea Maria Randi ; coorientadora, Ana Claudia
Rodrigues. - Florianópolis, SC, 2015.
76 p.

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

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. Anatomia
foliar. 3. *Acrostichum*. 4. Fluorescência da clorofila. I.
Randi, Áurea Maria . II. Rodrigues, Ana Claudia . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

Nome completo do autor

TÍTULO: SUBTÍTULO (SE HOVER)

Este (a) Dissertação/Tese foi julgado (a) adequado (a) para obtenção do Título de “...”, e aprovad(o)a em sua forma final pelo Programa ...

Local, x de xxxxx de xxxx.

Prof. xxx, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^axxxx, Dr.^a
Orientadora
Universidade xxxx

Prof.^axxxx, Dr.^a
Corientadora
Universidade xxxx

Prof.xxxx, Dr.
Universidade xxxxxx

Este trabalho é dedicado aos meus
colegas de mestrado e aos meus
pais.

AGRADECIMENTOS

À minha família que sempre me apoiou e me auxiliou da maneira que foi possível.

Às minhas orientadoras Dra. Áurea Maria Randi e co-orientadora Dra. Ana Claudia Rodrigues pela grande paciência e dedicação despendida para com a minha dissertação. Ao Dr. José Bonomi Barufi pelo auxílio na montagem e execução do experimento.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal e de Laboratório de Ficologia por ceder o espaço e pelo auxílio prestado na execução dos experimentos.

Ao Dr. Marcelo Maraschin por ceder o espaço e equipamentos de seu laboratório para que as análises fossem feitas e a Mestra Eva Regina de Oliveira Rodrigues que me ajudou com as análises.

Ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas pela prorrogação e apoio necessário para que este trabalho fosse finalizado. Aos professores pelos conhecimentos compartilhados durante o curso. A todos os colegas do curso que sempre foram amigáveis e cooperativos.

A CAPES que tornou viabilizou economicamente esta pós-graduação através da bolsa.

“Em vez de amor, de dinheiro, de fama, me dê a verdade.”

(Henry David Thoreau)

RESUMO

A destruição da camada de ozônio na estratosfera principalmente pela liberação de clorofluorcarbonos (CFCs) na atmosfera teve como consequência o aumento da incidência de radiação UV. Neste trabalho avaliou-se o efeito da radiação ultravioleta B no desenvolvimento de gametófitos, na anatomia foliar, no conteúdo de clorofilas e carotenoides, além da fluorescência da clorofila em frondes de esporófitos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch. (Polypodiopsida, Pteridaceae) submetidos a tratamentos agudos (8 horas sob RUVB) e tratamentos crônicos de RUVB (1 hora diária durante 45 dias). Os gametófitos de *A. danaeifolium* que receberam radiação UVB, quando comparados aos gametófitos controles mostraram-se susceptíveis a danos e alterações morfológicas quando cultivados sob o tratamento crônico, sofrendo atraso no desenvolvimento, perda da dominância apical, anomalias no desenvolvimento, e por fim senescência e morte quase total dos gametófitos. Os esporófitos mostraram menor sensibilidade à RUVB. A anatomia foliar de plantas foi afetada pela RUVB. As frondes de plântulas expostas ao tratamento crônico apresentaram enrolamento semelhante ao observado para outras espécies. Apresentaram ainda estômatos mal formados na face abaxial e perda das sinuosidades das paredes das células epidérmicas adaxiais quando observados em MEV. Em secções transversais de frondes submetidas ao tratamento crônico, coradas com azul de toluidina, os cloroplastos apresentaram-se concentrados juntamente com o núcleo, na parede interna da célula. Esse efeito foi observado apenas em células epidérmicas, indicando mecanismo de proteção. Não houve diferença estatisticamente significativa entre plantas controle e cultivadas sob RUVB na concentração de clorofila *a*, clorofila *b*, concentração de carotenóides, Houve aumento ETR_{Max} , α_{ETR} e E_k . É possível que essa espécie possua mecanismos para evitar os danos aos fotossistemas e a degradação das clorofilas por ser uma planta que ocorre geralmente em ambiente ensolarado nos manguezais.

Palavras-chave: Anatomia foliar, *Acrostichum*, Fluorescência da clorofila.

ABSTRACT

The destruction of ozone in the stratosphere mainly by the release of chlorofluorocarbons (CFCs) in the atmosphere has led to an increased incidence of UV radiation. In this paper we evaluate the effect of ultraviolet B radiation in the gametophyte development and in leaf anatomy, the contents of chlorophyll and carotenoids, in addition to chlorophyll fluorescence in fronds of sporophytes of *Acrostichum danaeifolium* Langsd. Fisch &. (Polypodiopsida, Pteridaceae) exposed to acute treatment (8 hours under UVB) and chronic UVB radiation treatments (1 hour daily for 45 days). The gametophytes of *A. danaeifolium* which received UVB radiation, when compared to control gametophytes proved to be more susceptible to damage and morphological changes when grown under chronic treatment, suffering from developmental delay, loss of apical dominance, abnormal development, and finally senescence and almost total gametophyte death. The sporophytes showed less sensitivity to UVB radiation. The leaf anatomy was affected. The sporophyte fronds exposed to chronic treatment showed curling similar to that observed for other species. Still showed malformed stomata on the abaxial face and loss of sinuosity of epidermal cells on the adaxial face when observed under SEM. Sections of fronds subjected to chronic treatment, stained with toluidine blue presented chloroplasts densely stained and concentrated against the inner wall of the cell. This effect was observed only in epidermal cells, indicating protection mechanism. No statistically significant difference was observed between control and plants grown under RUVB in the concentration of chlorophyll a, chlorophyll b, concentration of carotenoids, ETR_{max} , α_{ETR} and E_k . It is possible that this species presents mechanisms to prevent photosystem damage and degradation of chlorophylls since it is a species that grows in sunny environment in the mangrove.

Key words: Leaf anatomy, *Acrostichum*, fluorescence of chlorophyll a

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esporófito de <i>Acrostichum danaeifolium</i> Langed & Fisch. encontrado no manguezal de Itacorubi, Florianópolis-SC.....	25
Figura 2. Diagrama mostrando os procedimentos desenvolvidos na fase gametofítica.....	31
Figura 3. Aspecto geral das bandejas montadas com esporófitos jovens durante o período do experimento.....	34
Figura 4. Diagrama mostrando os procedimentos desenvolvidos na fase esporofítica sob tratamento crônico.....	36
Figura 5. Diagrama mostrando os procedimentos desenvolvidos na fase esporofítica sob tratamento agudo.....	38
Figura 6. Fases do desenvolvimento de gametófitos de <i>Acrostichum danaeifolium</i> cultivados sob PAR. A. Gametófitos com oito dias. B. Gametófito com 14 dias. C. Gametófito com 28 dias, seta apontando para o meristema(m). D. Anterozóide (az) aos 77 dias. E. Anterídios (at) aos 77 dias. F. Arquegônio (ar) possivelmente fecundado fotografado aos 91 dias.....	47
Figura 7. Esporófitos jovens de <i>Acrostichum danaeifolium</i> cultivados sob PAR ainda ligados ao gametófito. A. Esporófito (esp) recém-formado surgindo a partir do gametófito aos 85 dias de cultivo. B. Esporófito aos 85 dias com sua primeira fronde. C. Estômatos (est) na primeira fronde aos 91 dias de cultivo.....	48
Figura 8. Fases do desenvolvimento dos gametófitos de <i>Acrostichum danaeifolium</i> cultivados sob PAR+RUVB. A. Gametófito com oito dias. B. Gametófito com 14 dias. C. Gametófito com 28 dias. D. Gametófito com 83 dias.....	49
Figura 9. Esporófitos de <i>Acrostichum daneifolium</i> após um mês e meio de cultivo sob PAR e PAR+RUVB. A. Plantas cultivadas sob PAR. B. Plantas cultivadas sob PAR+RUVB.....	50
Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura da face adaxial de frondes de esporófitos de <i>Acrostichum daneifolium</i> após um mês e meio de cultivo sob PAR (esquerda) e PAR+RUVB (direita). A e C. Células epidérmicas de plantas crescidas sob PAR, com paredes anticlinais sinuosas. B e D. Células epidérmicas de plantas crescidas sob PAR+RUVB, com alteração do formato da célula e apresentando lesões nas células epidérmicas.....	52

Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura da face abaxial de frondes de esporófitos de <i>Acrostichum daneifolium</i> após um mês e meio de cultivo sob PAR (esquerda) e PAR+RUVB (direita). A, C e E. Células epidérmicas de plantas crescidas sob PAR, com paredes anticlinais sinuosas, estômatos (est) anomocíticos. B, D e F. Células epidérmicas de plantas crescidas sob PAR+RUVB, com células anticlinais sinuosas, estômatos fechados, muitos deles com malformação, muito pequenos ou sem o ostíolo.....	53
Figura 12. Secções transversais de frondes de esporófitos de <i>Acrostichum danaeifolium</i> e cultivados sob PAR (esquerda) e 45 dias sob PAR+RUVB (direita), corados com azul de toluidina. A e C. Aspecto de frondes cultivadas sob PAR. B e D. Aspecto de frondes cultivadas por 45 dias sob PAR+RUVB. E e F- Feixe vascular destacando a endoderme (e), periciclo (p), floema (f), e xilema(x) em plantas controle (e) e cultivadas sob PAR+RUVB (F). ad = epiderme adaxial, ab = epiderme abaxial, aer = aerênquima.....	56
Figura 13. Secções transversais de frondes de esporófitos de <i>Acrostichum danaeifolium</i> cultivados sob PAR (esquerda) e 45 dias sob PAR+RUVB (direita), corados com azul de toluidina. aer = aerênquima, cl = cloroplasto, cst = câmara subestomática, n = núcleo celular, seta preta grande indicando estômato, seta preta pequena indicando cloroplasto.....	57
Figura 14. Secções transversais de frondes de esporófitos de <i>Acrostichum danaeifolium</i> cultivados sob PAR (esquerda) e 45 dias sob PAR+RUVB (direita), corados com lugol. aer = aerênquima, cl = cloroplastos. cst = câmara subestomática, seta preta indicando estômato, seta branca indicando cloroplasto com grão de amido.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituição química do meio de Dyer(1979).....	32
Tabela 2. Valores de irradiância absoluta, irradiância efetiva, dose absoluta e dose efetiva de PAR, RUVA, RUVB para plantas de esporófitos e gametófitos cultivados sob tratamento crônico.....	37
Tabela 3. Valores de irradiância absoluta, irradiância efetiva, dose absoluta e dose efetiva de PAR, RUVA, RUVB para plantas de esporófitos cultivados sob tratamento agudo.....	39
Tabela 4. Conteúdo de clorofilas a , b e carotenoides em esporófitos de <i>Acrostichum danaeifolium</i> cultivados durante 45 dias sob PAR e PAR+RUVB (1 hora diária). Médias seguidas por letras iguais não diferiram pelo teste “t” de Student ($p>0,05$).....	59
Tabela 5. Resultados da análise multifatorial (ANOVA) para os resultados de α_{ETR} , ETR_{max} e E_k em esporófitos expostos à uma hora diária de RUVB durante 45 dias, foram consideradas as diferenças apenas do efeito Tempo x Radiação.....	60
Tabela 6. Resultados da análise multifatorial (ANOVA) para os resultados de α_{ETR} , ETR_{max} e E_k em esporófitos expostos à RUVB durante 8 horas durante a exposição, foram consideradas as diferenças apenas do efeito Tempo x Radiação.....	62
Tabela 7. Resultados da análise multifatorial (ANOVA) para os resultados de α_{ETR} , ETR_{max} e E_k em esporófitos expostos à RUVB durante 8 horas após a exposição, foram consideradas as diferenças apenas do efeito Tempo x Radiação.....	63
Tabela 8. Resultados da análise multifatorial (ANOVA) para os resultados da concentração de clorofila a, b e carotenóides em esporófitos expostos à RUVB durante 8 horas após a exposição, foram consideradas as diferenças apenas do efeito Tempo x Radiação.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- α – Eficiência da fotossíntese
- ANOVA – Análise de variância
- ATP – Trifosfato de adenosina
- Chl *a* – Clorofila *a*
- Chl *b* – Clorofila *b*
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- DP – Desvio padrão
- E_k - Irradiância mínima e saturação
- ETR – Taxa de transporte de elétrons
- LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
- LA - Luz actínica
- LS - Luz saturante
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MO - Microscópio óptico
- MS – Massa seca
- NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido
- PAM - Pulso de Amplitude Modulada
- PAR – Radiação fotossinteticamente ativa
- PSI – Fotossistema I
- PSII – Fotossistema II
- Φ PSII - Rendimento quântico efetivo do Fotossistema II
- RLC - Rapid Light Curve ou Curvas rápidas de Luz
- RUVA – Radiação ultravioleta-A
- RUVB – Radiação ultravioleta-B
- RUVC – Radiação ultravioleta-C
- UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. MÉTODOS.....	29
2.1 LOCAL DE COLETA.....	29
2.2 ACONDICIONAMENTOS DE ESPOROS.....	29
2.3 GERMINAÇÃO DE ESPOROS E DESENVOLVIMENTO DE GAMETÓFITOS SOB PAR (CONTROLE) E PAR+RUVB (TRATAMENTO CRÔNICO).....	30
2.4 CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DOS GAMETÓFITOS CULTIVADOS SOB PAR (CONTROLE) E PAR+RUVB (TRATAMENTO CRÔNICO).....	33
2.5 DESENVOLVIMENTO DE ESPORÓFITOS JOVENS CULTIVADOS SOB PAR (CONTROLE) E EXPOSIÇÕES DIÁRIAS DE RUVB (PAR+RUVB: TRATAMENTO CRÔNICO).....	33
2.6 EFEITO DE EXPOSIÇÕES AGUDAS À RUVB EM ESPORÓFITOS JOVENS.....	38
2.7 ANÁLISE MICROSCÓPICA DE GAMETÓFITOS E ESPORÓFITOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO CRÔNICO DE RUVB.....	45
2.7.1 Análise morfológica de gametófitos por meio de microscopia de luz (ML).....	40
2.7.1 Análise de frondes por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	40
2.7.3 Análise de frondes por meio de microscopia de Luz (ML).....	40
2.8 CURVAS RÁPIDAS DE LUZ (RLC) ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A DOS ESPORÓFITOS...41	
2.9 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA DE ESPORÓFITOS.....	42
2.10 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS E CAROTENÓIDES EM FRONDES DE ESPORÓFITOS.....	42
2.10.1 Extração e quantificação de clorofilas.....	43
2.10.2 Extração e quantificação de carotenóides.....	43
2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44

3. RESULTADOS.....	45
3.1 DESENVOLVIMENTO DE GAMETÓFITOS DE <i>ACROSTICHUM DANAEIFOLIUM</i> CULTIVADOS SOB PAR E TRATAMENTO CRÔNICO DE PAR + RUVB.....	45
3.2 EFEITO DE PAR E TRATAMENTO CRÔNICO DE PAR + RUVB EM FRONDES DE ESPORÓFITOS DE <i>ACROSTICHUM DANAEIFOLIUM</i>	50
3.2.1 Morfologia externa.....	50
3.2.2 Análise de frondes por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	50
3.2.3 Análise morfológica de esporófitos por meio de microscopia de luz (ML).....	54
3.3 EFEITO DE PAR E TRATAMENTO CRÔNICO DE PAR + RUVB NOS VALORES CLOROFILAS, CAROTENÓIDES E PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS.....	58
3.4 EFEITO DE PAR E TRATAMENTO AGUDO DE PAR + RUVB NOS VALORES DE CLOROFILAS, CAROTENÓIDES E PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS.....	61
5. DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

As samambaias existentes atualmente estão classificadas dentro de um único grupo monofilético (monilófitas) divididas em quatro grandes classes: Polypodiopsida, Marattiopsida, Equisetopsida e Psilopsida (Smith *et al.* 2006). Autores divergem quanto ao número de espécies de samambaias conhecidas, para Moran (2008) 13.600 espécies, 13.000 espécies para Prado (2003) 9600 para Smith *et al.* (2006). Novas espécies continuam a ser descritas apesar do declínio abundante e da extirpação de algumas espécies e de habitats, devido aos fatores naturais como: fogo, inundações, furacões e principalmente fatores antrópicos (Arcand & Ranker 2008).

As monilófitas possuem ampla distribuição mundial, sendo que desenvolveram adaptações marcantes em meios extremos, sendo encontradas nos mais distintos ambientes, desde ambientes tropicais a temperados, de terras baixas a regiões alpinas, de ambientes xéricos a aquáticos (Rathinasabapathi 2006). Por possuírem esporos muito pequenos, geralmente dispersos pelo vento, além da possível autofertilização e reprodução vegetativa dos gametófitos, foi possível às samambaias colonizarem e se reproduzirem com sucesso até mesmo em ilhas oceânicas distantes (Kessler 2010).

Os manguezais ocorrem em regiões costeiras abrigadas como estuários, baías e lagunas e apresentam condições propícias para alimentação, proteção e reprodução de muitas espécies animais, sendo considerados importantes transformadores de nutrientes em matéria orgânica e geradores de bens e serviços (Schaeffer-Novelli 1995). Na Ilha de Santa Catarina, localizada próxima ao limite austral de distribuição dos manguezais do Oceano Atlântico sul-ocidental, são encontrados cinco ecossistemas de manguezal: Ratones, Saco Grande, Itacorubí, Rio Tavares e Tapera. Devido às suas localizações contíguas aos centros urbanos ou próximos a estes, os manguezais da Ilha de Santa Catarina vêm sofrendo o impacto de uma antropização crescente, determinando a desestruturação dos ecossistemas e até a eliminação de importantes setores destes, mesmo considerando-se que os manguezais sejam amparados pela legislação ambiental vigente (Resolução nº 303 de 20 de março de 2002 do CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente). (Froidefond & Soriano-Sierra 1996).

Uma das características que diferem os manguezais de outros Biomas, como a Floresta Atlântica, por exemplo, é a ausência de sub-bosque. Os manguezais mundiais não apresentam espécies herbáceas, arbustivas ou lianas (Janzen 1985). Dados da FAO (2007) mostram que a vegetação do manguezal é composta por poucas espécies, todas com adaptações estruturais e fisiológicas para sobreviver nesse ambiente de solo pouco compactado, pouco oxigenado e frequentemente inundado pelas marés. Portanto, a caracterização estrutural dessa vegetação é uma ferramenta valiosa na identificação das respostas desse ecossistema aos processos de alteração do meio ambiente, auxiliando dessa forma, estudos que objetivam a conservação desse ecossistema. Park *et al.* (1998) afirmam que, a conservação de recursos genéticos vegetais dos biomas tropicais e a proteção de espécies frente à iminente extinção são questões prioritárias para a biologia do desenvolvimento e da conservação.

As samambaias de manguezais, pertencentes ao gênero *Acrostichum* L. (“giant leather fern”) são as plantas que mais se aproximam das herbáceas de manguezais, mas mesmo sendo halófitas, são dependentes de manchas de luz solar direta para a reprodução nos substratos salinos e geralmente crescem expostas à luz solar plena (Gomez 1983, Janzen 1985) sendo endêmicas na vegetação dos manguezais (Hietz 2010). Existem somente duas espécies desse gênero nos Neotrópicos: *Acrostichum aureum* L. e *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch. Ambas são citadas para Santa Catarina (Reitz 1961, Souza *et al.* 1991, Souza *et al.* 1994) tendo esse gênero surgido no registro fóssil no cretáceo superior (Bonde & Kumaran 2002). *Acrostichum* L. é reconhecido por suas frondes pinadas de dois a quatro metros de altura, com nervuras reticuladas e esporângios que recobrem toda a superfície abaxial das pinas (Moran 1995).



Figura 1. Esporófito de *Acrostichum danaeifolium* Langed & Fisch. encontrado no manguezal de Itacorubi, Florianópolis-SC.

A espécie *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch é conhecida popularmente como samambaia do mangue (“giant leather fern”) pertence à Divisão Tracheophyta, Subdivisão Euphyllophytina, Infradivisão Moniliformopses (Kenrick & Crane 1997), Classe Polypodiopsida, ordem Polypodiales, família Pteridaceae (Smith *et al.* 2006). Segundo Mehlreter & Palacios-Rios (2003) a fenologia de *A. danaeifolium* está estreitamente sujeita às oscilações climáticas e ambientais. Mehlreter & Palacios-Rios (2003) detectaram fortes padrões sazonais em plantas de um manguezal do golfo do México, que apresentaram aumento do crescimento foliar durante a estação chuvosa. Além disso, esses autores observaram que frondes férteis só cresceram de abril a agosto e os esporos só foram liberados durante as estações mais úmidas. Sharpe (2009) analisou, durante aproximadamente três anos, o crescimento de plantas de *A. danaeifolium* no manguezal da Reserva Nacional de Pesquisas Estuarinas da Baía de Jobos, em Porto Rico, antes e após o aumento da salinidade provocado pelo Furacão Georges, em 1998, e observou

que em condições adversas de hiper-salinidade as plantas mantiveram o mesmo número médio de frondes por planta, bem como a taxa de produção de frondes, mas produziram frondes mais curtas. As observações mais notáveis, segundo a autora, foram o aumento da mortalidade e a diminuição do tamanho das plantas após o distúrbio. Por outro lado, o aumento da fertilidade relativa de 10% antes do furacão para 50% após o furacão, em maio de 2000, e o aumento na produção de biomassa, foram as respostas positivas mais significantes. Após o furacão, a produção de biomassa diminuiu nos primeiros oito meses, mas após dois anos superou os níveis de pré-furacão. Algumas possíveis causas para o aumento da biomassa podem ser o aumento da disponibilidade hídrica, aumento de nutrientes provindos da queda de serapilheira e aumento da radiação em decorrência aos danos sofridos pela vegetação.

A radiação ultravioleta solar é dividida em três faixas: radiação ultravioleta A (RUVA entre 315 a 400 nm), radiação ultravioleta B (RUVB entre 280 a 315 nm) e radiação ultravioleta C, biologicamente mais ativa (RUVB entre 100 a 280 nm). A camada de ozônio absorve muito pouca RUVA, uma quantidade considerável de RUVB e toda a RUVB. A RUVB é efetiva em induzir efeitos sobre a fisiologia causando alterações na transpiração, nos pigmentos relacionados à fotossíntese, morfologia e anatomia, com frequência causando encurtamento e espessamento de entrenós, redução do crescimento em área das folhas, aumento no crescimento de ramos laterais, folhas enroladas, diminuição na altura da planta e diminuição da capacidade fotossintética, além de outros danos à bioquímica, danos ao DNA, proteínas e membranas e à proteção contra a própria RUVB (Greenberg *et al.* 1989, Hilal *et al.* 2004, Schulze *et al.* 2005, Tevini & Teramura 1989, Ranjbarfordoei *et al.* 2009), A diminuição da expansão celular pode estar relacionada à diminuição da fotossíntese, mas também pode estar relacionada com efeitos diretos na divisão celular e danos ao DNA (Lambers *et al.* 2008). A RUVB pode desencadear mudanças no acúmulo de compostos fenólicos, carotenóides e glucosinolatos, podendo causar alterações tróficas alterando a resistência das plantas a herbívoros (Schreiner *et al.* 2012). Por exemplo, Teklemariam & Blake (2003) observaram aumento da

resistência ao estresse causado por calor em plantas de *Cucumis sativus* L. quando as plantas eram previamente expostas a RUVB.

A quantidade e qualidade da exposição à radiação ultravioleta dependem da época do ano, da latitude, da altitude, das nuvens e aerossóis. O principal interesse nas pesquisas sobre os efeitos da radiação ultravioleta B sobre as plantas e outros organismos foi gerado pelo aumento da exposição à radiação ultravioleta B do ambiente, causado pela destruição da camada de ozônio na estratosfera principalmente devido à liberação de clorofluorcarbonos (CFCs) na atmosfera, utilizados principalmente em sistemas de refrigeração e em latas de spray. Isto levou a muitos estudos sobre os efeitos do aumento da radiação RUVB, tanto ao ar livre, como em estufas e em ambientes controlados (Aphalo *et al* 2012). Em 2006 o buraco na camada de ozônio situada sob o pólo sul bateu recorde, alcançando 29,5 milhões de km² de extensão superando a marca registrada no ano 2000 de 29,4 milhões de km² (NASA 2014).

As clorofilas e os carotenoides absorvem a radiação visível, que durante o processo de fotossíntese, é convertida em energia química redutora na forma de ATP e NADPH essenciais à sobrevivência dos organismos fotossintetizantes (Seiferman-Harms 1987). 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). Sendo a fotossíntese um processo vital que pode ser afetado pela exposição à radiação RUVB a análise de desempenho fotossintético pode levar a resultados conclusivos sobre seus efeitos em organismos fotossintetizantes (Brandle *et al.* 1977, Jayakumar *et al.* 2002.). A quantificação de fluorescência da clorofila *a* para avaliar a eficiência fotossintética tem sido há muito tempo utilizada em estudos de ecofisiologia. A energia da luz absorvida pelas moléculas de clorofila pode ter três destinos: 1) reações fotoquímicas; 2) dissipação em forma de calor, 3) emissão de fluorescência; estes ocorrem concomitantemente, de modo que qualquer aumento na eficácia de um vai resultar numa diminuição do rendimento dos outros dois (Maxwell & Johnson, 2000). Os fluorímetros de pulso de amplitude modulada, comumente chamados de PAM, permitem medidas 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) expressas como fotossíntese (P) *versus* irradiância (E) é mais simples para análise de fotossíntese quando comparada às análises utilizando-se eletrodos de oxigênio, fixação de ¹⁴C ou analisadores de gás infravermelho (IRGA). De acordo com White & Critchley (1999), análises que utilizam curvas rápidas de luz são muito úteis na investigação da integridade do aparato fotossintético das plantas. 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).

Estudos sobre os efeitos da RUVB no desenvolvimento de gametófitos de *A. danaeifolium* foram realizados por Freitas (2012) e por Randi *et al.* (2014). Nesses trabalhos os autores observaram retardo na germinação de esporos submetidos à RUVB, redução de crescimento de gametófitos bem como o surgimento de ramificações anômalas, alterações ultra-estruturares no sistema de membranas dos cloroplastos, maior presença de grãos de amido e plastoglóbulos em cloroplastos de gametófitos submetidos à RUVB.

O presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos de exposições crônicas de RUVB no desenvolvimento de gametófitos e exposições crônicas e agudas em esporófitos jovens de *A. danaeifolium* a fim de gerar conhecimentos sobre os efeitos estressantes dessa radiação bem como possíveis estratégias adaptativas utilizadas por essas plantas que vivem em ambientes de intensa insolação diária e, portanto, expostas aos altos níveis de radiação UVB em determinadas épocas do ano.

2.MÉTODOS

2.1 LOCAL DE COLETA

Frondes férteis de *Acrostichum danaeifolium* foram coletadas no dia 21/08/2012 na área de preservação permanente (APP) do manguezal do Itacorubi, situado na região centro-oeste da Ilha de Santa Catarina. Criado pelo Decreto Municipal 1529/2002, o manguezal do Itacorubi possui uma área de 150 hectares, com coordenadas 27° 34' 14" – 27° 35' 31" Sul e 48° 30' 07" 48° 31' 33" Oeste (Soriano-Sierra 1993).

2.2 ACONDICIONAMENTOS DE ESPOROS

Após a coleta, as frondes férteis de *A.danaeifolium* foram colocadas sobre papel de filtro para secagem em temperatura ambiente, para induzir deiscência e liberação de esporos. Esses foram separados dos esporângios pela filtragem em papel de entretela (ou papel de lente). Os esporos obtidos foram armazenados em frascos de vidro a $7 \pm 1^{\circ}\text{C}$ no dia 05/09/2012.

2.3 GERMINAÇÃO DE ESPOROS E DESENVOLVIMENTO DE GAMETÓFITOS SOB PAR (CONTROLE) E PAR+RUVB (TRATAMENTO CRÔNICO)

Os experimentos foram conduzidos em câmara de germinação a 25°C e fotoperíodo de 12h de PAR. Foram utilizadas oito caixas gerbox preenchidas com 180 gramas de solo de mangue autoclavado e peneirado coberto com uma fina camada (60 mL) de solução de Dyer (Tabela 1) com adição de Agar a 0,8%. As caixas foram tampadas com filme de PVC. Após a solidificação do meio, 20 mg de esporos foram espalhados sob a superfície do substrato e em duas prateleiras da câmara de germinação foram colocadas quatro bandejas por tratamento, uma contendo duas lâmpadas com emissão de RUVB (Philips, Ultravioleta-B, TL 20 W/12RS, K4, Holanda) e quatro lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W como fontes de PAR. A outra prateleira recebeu apenas quatro lâmpadas fluorescentes (OSRAM, L30w/765, Alemanha). Ambas as prateleiras receberam aproximadamente $13\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR. A média de exposição à RUVB dos quatro pontos da prateleira onde foram cultivados os gametófitos e posteriormente os esporófitos foi de 0,73 w.m (Tabela 2), sendo que as caixas foram numeradas e semanalmente suas posições eram trocadas. Os esporos e gametófitos foram expostos à RUVB, durante 1 hora por dia no período correspondente ao período de maior incidência (11:30h às 12:30h). As doses de radiação biologicamente efetivas foram calculadas para os danos em cloroplastos e no DNA, de acordo com Jones & Kok (1966) e Setlow (1974) (Tabela 2). O desenvolvimento foi acompanhado semanalmente, observando-se o desenvolvimento dos gametófitos, até o aparecimento dos primeiros esporófitos através de microscópio óptico (Figura 2).

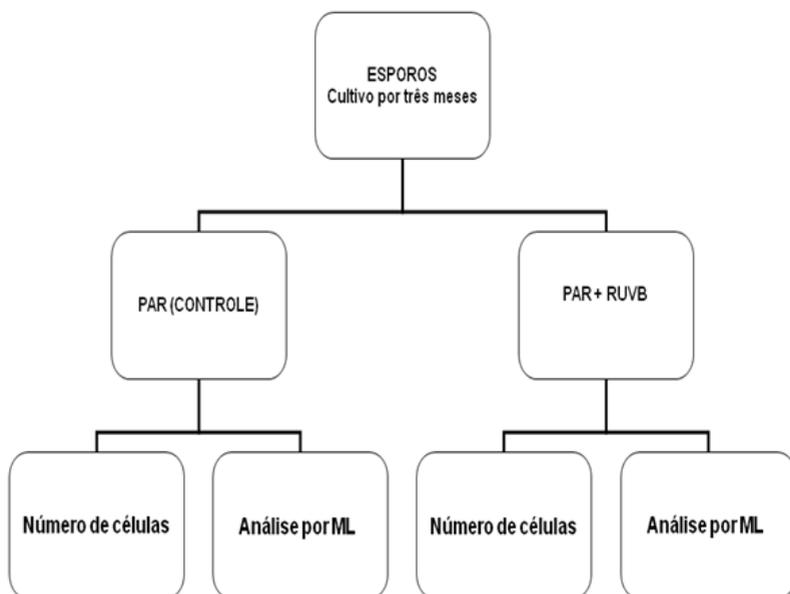


Figura 2 – Diagrama mostrando os procedimentos desenvolvidos na fase gametofítica.

Tabela 1- Constituição química do meio de Dyer(1979).

Solução A	Volume final 1L
Reagentes	Concentração (mg/L)
Sulfato de Magnésio (Mg SO ₄).	510 mg/L
Nitrato de Potássio (KNO ₃).	120 mg/L
Nitrato de Cálcio (Ca(NO ₃) ₂)	1440 mg/L
Fosfato de Potássio Dibásico (K ₂ HPO ₄).	250 mg/L
Solução B	Volume final 1L
Solução de FeSO₄.7H₂O em NaEDTA	
Reagentes	Concentração (g/L)
NaEDTA	33,2 g/L
Hidróxido de Sódio (NaOH)	3,65 g/L
Sulfato de Ferro (FeSO ₄)	25 g/L
Diluir 1mL da solução B em 1 L da solução A	

2.4 CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DOS GAMETÓFITOS CULTIVADOS SOB PAR (CONTROLE) E PAR+RUVB (TRATAMENTO CRÔNICO).

A contagem do número de células dos gametófitos foi feita após 12 dias de cultivo. As contagens foram efetuadas tanto para as amostras crescidas sob PAR quanto para crescidas sob PAR+RUVB, coletando-se dois gametófitos de cada caixa gerbox retirados de pontos diferentes. Os gametófitos foram lavados em água destilada, colocados sobre lamina, recobertos com lamínula e observados ao microscópio óptico. Em seguida pontos aleatórios da lamina foram fotografados para contagem posterior. As células foram contadas de 20 indivíduos de cada tratamento.

2.5 DESENVOLVIMENTO DE ESPORÓFITOS JOVENS CULTIVADOS SOB PAR (CONTROLE) E EXPOSIÇÕES DIÁRIAS DE RUVB (PAR+RUVB: TRATAMENTO CRÔNICO).

Esporófitos desenvolvidos a partir de gametófitos cultivados sob PAR como descrito em 3.3 foram transplantados para bandejas de plástico preenchidas com 100 gramas de solo de mangue autoclavado em um número de até nove plântulas por bandeja, sendo que os esporófitos tinham em torno de nove meses de cultivo a partir da inoculação dos esporos. A altura das plantas variou entre 1 a 1.5 cm e 3 a 4 frondes pequenas (0,5 cm de comprimento).

As doses de radiação biologicamente efetivas foram calculadas para os danos em cloroplastos e no DNA, de acordo com Jones & Kok (1966) e Setlow (1974)(Tabela 2).



Figura 3 – Aspecto geral das bandejas contendo esporófitos jovens durante o período do experimento.

A seguir as bandejas foram colocadas dentro de um segundo recipiente plástico transparente tampado com filme plástico de PVC que permite a passagem da maioria da RUVB. Estes receberam uma pequena quantidade de água em sua base a fim de simular um ambiente úmido parecido com o do manguezal e evitar a perda de água pelas plântulas, que são muito sensíveis à dessecação. Após o transplante esperou-se em torno de um mês até que as plantas se desenvolvessem o suficiente para iniciar os experimentos. Esporófitos jovens foram distribuídos em quatro caixas como descrito acima contendo 21 plântulas cada. Tanto o desenvolvimento quanto os experimentos foram conduzidos em câmara de germinação a 25 °C e fotoperíodo de 12h de PAR. No tratamento de RUVB as lâmpadas ficaram diariamente ligadas durante 1 hora e o experimento teve duração de 45 dias.

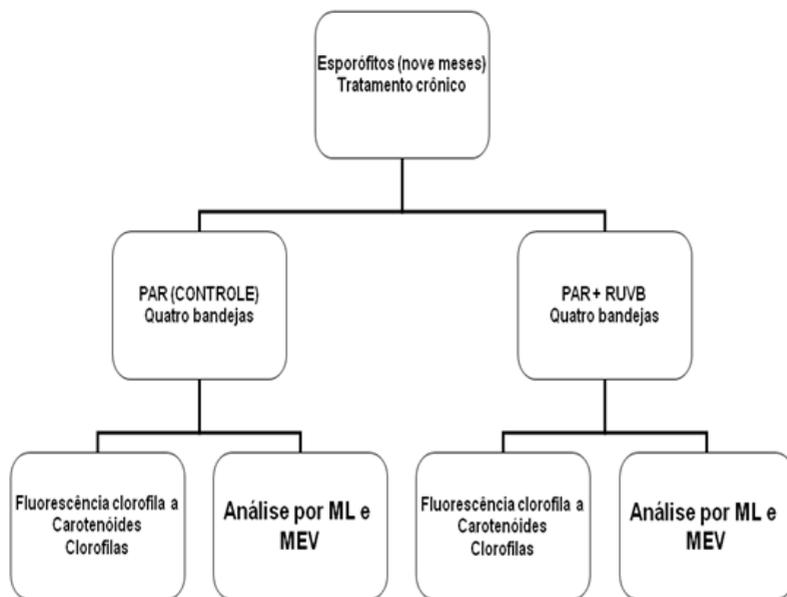


Figura 4 - Diagrama mostrando os procedimentos desenvolvidos na fase esporófitica sob tratamento crônico.

Tabela 2 – Valores de irradiância absoluta, irradiância efetiva, dose absoluta e dose efetiva de PAR, RUVA, RUVB para plantas de esporófitos e gametófitos cultivados sob tratamento crônico. Os valores de RUVA para dose absoluta e dose efetiva correspondem as 12 horas totais de exposição a luz.

Espectros	Irradiância absoluta (W/m ²)	Irradiância efetiva(W/m ²)		Dose absoluta (KJ/m ²)	Dose efetiva(KJ/m ²)	
		DNA	Cloroplastos		DNA	Cloroplastos
PAR	13,26	-	-	572,69	-	-
RUVA(1h sob lâmpadas RUV+PAR)	0,62	-	0,11	12,11*	-	0,82*
RUVA(11 h sob lâmpadas PAR)	0,25	-	0,01			
RUVB	0,73	0,04	0,36	2,64	0,16	1,28

2.6 EFEITO DE EXPOSIÇÕES AGUDAS À RUVB EM ESPORÓFITOS JOVENS

Esporófitos jovens foram distribuídos em três caixas conforme a descrição de 3.5, contendo em cada caixa 21 plântulas com cinco meses de idade, a partir da germinação dos esporos. Após o transplante esperou-se em torno de um mês até que as plantas se desenvolvessem o suficiente para iniciar os experimentos, ou seja, foram utilizadas plântulas com seis meses de idade. Estas foram expostas à RUVB durante 8 horas contínuas. Os experimentos foram conduzidos em câmara de germinação a 25°C e fotoperíodo de 12h de PAR. As doses de radiação biologicamente efetivas foram calculadas para os danos em cloroplastos e no DNA, de acordo com Jones & Kok (1966) e Setlow (1974)(Tabela 3).

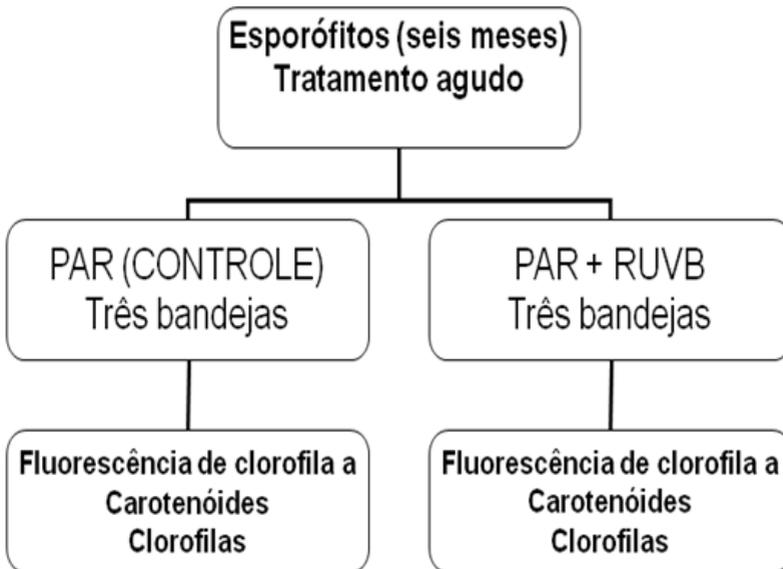


Figura 5 - Diagrama mostrando os procedimentos desenvolvidos na fase esporófitica sob tratamento agudo.

Tabela 3 – Valores de irradiância absoluta, irradiância efetiva, dose absoluta e dose efetiva de PAR, RUVA, RUVB para plantas de esporófitos cultivados sob tratamento agudo.

Espectros	Irradiância absoluta (W/m^2)	Irradiância efetiva (W/m^2)		Dose absoluta (KJ/m^2)	Dose efetiva (KJ/m^2)	
		DNA	Cloroplastos		DNA	Cloroplastos
PAR	13,26	-	-	381,80	-	-
RUVA	0,62	-	0,11	17,95	-	3,06
RUVB	0,73	0,04	0,36	21,12	1,25	10,24

2.7 ANÁLISE MICROSCÓPICA DE GAMETÓFITOS E ESPORÓFITOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO CRÔNICO DE RUVB

2.7.1 Análise morfológica de gametófitos por meio de microscopia de luz (ML).

Imagens de gametófitos ‘in vivo’ cultivados sob PAR (controle) ou PAR+RUVB (tratamento crônico) foram registradas semanalmente em microscópio óptico (Leica, DM 2500) com câmera fotográfica digital (Leica, DFC 295) acoplada.

2.7.2 Análise de frondes por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras da região mediana de frondes de esporófitos jovens cultivados sob PAR ou sob PAR+RUVB durante 45 dias foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato pH 7,0 (Feder & O'Brien, 1968) ”overnight”, posteriormente lavadas 3 vezes no mesmo tampão, desidratadas em série etílica gradual até álcool 100° GL e submetidas ao ponto crítico de CO₂ (EM-CDP-030). As amostras de frondes foram colocados sobre suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face e revestidos com 20 nm de ouro, em metalizador (Leica, modelo EMSCD 500). A análise e documentação foram efetivadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol XL30) pertencente ao LCME da UFSC.

2.7.3 Análise de frondes por meio de microscopia de Luz (ML)

As amostras de regiões mediana de frondes de esporófitos jovens cultivados sob PAR (controle) ou sob PAR+RUVB (tratamento crônico) foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato pH 7,0 (Feder & O'Brien, 1968) ”overnight” posteriormente lavadas 3 vezes no mesmo tampão, desidratadas em serie etílica até álcool 96° GL e .

Secções de frondes foram emblocadas em hidroxietilmetacrilato (historesina) segundo as técnicas usuais do fabricante. Os blocos foram seccionados com espessura de 5 μm em micrótomo de rotação Leica RM 2125 RT, e as secções foram coradas com lugol (Johansen 1940) para detecção de grãos de amido e azul de toluidina (O'Brien *et al.* 1965) as lâminas foram montadas em Verniz vitral transparente (Paiva *et al.* 2006).

2.8 CURVAS RÁPIDAS DE LUZ (RLC) ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A DOS ESPORÓFITO

A emissão de fluorescência da clorofila *a* dos esporófitos cultivados sob PAR (controle) ou sob PAR+RUVB (tratamento crônico e agudo) foi avaliada com auxílio de um fluorímetro de pulso com amplitude modulada (Diving-PAM, Underwater Fluorometer; Walz, Effeltrich, Alemanha) equipado com uma fibra óptica de 5,5 mm de diâmetro e um diodo azul (470 nm) como fonte de luz. Para esporófitos submetidos ao tratamento crônico, as avaliações foram feitas antes da exposição, após uma, duas, cinco, e seis semanas de tratamento, sendo utilizadas quatro bandejas por tratamento com nove plântulas cada. Foram realizadas duas curvas de luz em plantas escolhidas aleatoriamente em cada bandeja somando-se 36 plantas de cada tratamento. Para esporófitos submetidos ao tratamento agudo de RUVB, curvas rápidas de luz foram realizadas antes da exposição, após 2, 4, 6 e 8 horas de exposição à radiação. Essas mesmas medidas foram realizadas também após 24, 48 e 168 horas do término do tratamento agudo.

Para fazer as medições foram utilizadas frondes que possuíssem 6 a 7 cm de comprimento e que não estivessem sombreadas por outras frondes sempre utilizando as porções centrais da face adaxial da fronde.

Para o tratamento agudo, foram utilizadas três bandejas com sete plantas cada uma, somando-se 21 plantas por tratamento. Usando a opção “Rapid Light Curve” (RLC), as curvas de luz foram obtidas com a aplicação de uma série de oito pulsos de luz saturante (LS) com duração de 0,8 segundos, cada um deles seguidos de uma exposição de luz actínica (LA) crescente (2–2250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

A taxa de transporte de elétrons (ETR) é uma estimativa da fotossíntese bruta e é definida como: $ETR = \Phi_{PSII} \times PAR \times (0,5) \times$ (absortância), onde, Φ_{PSII} é o rendimento quântico efetivo do Fotossistema II, PAR é a radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) utilizada, 0,5 é o coeficiente padrão para a absorção estimada de luz de entre o PSI/PSII, considerando-se que 50% dos fótons são absorvidos pelo PSII. Os fatores de absortância padrão foram calculados para frondes de esporófitos de *Acrostichum daneifolium* sendo encontrados: para o experimento agudo: $PAR+UV=0,89462$, $PAR=0,898116$, e para o experimento crônico: $PAR+UV=0,929739$, $PAR=0,898499$). O valor padrão (0,50) para a absorção estimada de luz pelo PSI e PSII foi utilizado para calcular a taxa relativa de transporte de elétrons (Figueroa *et al.* 2003).

Os parâmetros do PAM foram calculados utilizando-se o software WINCONTROL (V.3.18) (WALZ, Alemanha) (Genty *et al.* 1989). A partir das curvas obtidas, foram analisados os seguintes parâmetros com ajuste das curvas às equações de Platt & Gallegos (1980): taxa máxima de transporte de elétrons (ETR_{max}), eficiência fotossintética (α_{ETR}) e irradiância mínima de saturação (E_k). O valor de E_k foi obtido pela equação $ETR_{\text{max}} / \alpha_{\text{ETR}}$ (Ralph & Gademann 2005).

2.9 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA DE ESPORÓFITOS

A determinação da massa seca, utilizada para calcular a concentração de clorofilas e carotenoides, de frondes de esporófitos de *A. daneifolium* foi feita pesando-se três alíquotas de 2,0 g de frondes, que secaram em estufa a 60 °C. As alíquotas foram pesadas diariamente em balança de precisão até a estabilização da massa.

2.10 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS E CAROTENÓIDES EM FRONDES DE ESPORÓFITOS

As clorofilas foram extraídas e quantificadas de frondes de esporófitos cultivados sob PAR (controle) ou sob PAR+RUVB (tratamento crônico e agudo). As amostras foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido. Para o tratamento crônico

(PAR+RUVB) foram obtidas quatro amostras de 500 mg e para o controle, cujas plantas cresceram sob PAR somente, foram obtidas seis amostras de 500 mg. Para o tratamento agudo foram obtidas duas amostras entre 350 a 400 mg para as análises no tempo 0, após 8 horas de exposição ao RUVB e 24 horas após o término da exposição de 8 horas à radiação RUVB, quando também foram coletadas amostras de plantas cultivadas somente sob PAR (controle).

2.10.1 Extração e quantificação de clorofilas

O teor de clorofilas dos esporófitos foi estimado conforme metodologia descrita por Hiscox & Israelstam (1979), com modificações. Foram utilizadas três amostras de 100 mg para cada extração. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para cada 100mg e mantidos em estufa a 45°C durante 45 minutos. Após a incubação, o extrato foi centrifugado a 4.000 RPM por 5 minutos e em seguida, a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-vis (Hitachi U – 1800), em 645 e 663 nm. Para a quantificação das clorofilas foi utilizada a equação de Arnon (1949):

$$\text{mg.mL de clorofila a} = 0,0127.D663 - 0,00269.D645$$

$$\text{mg.mL de clorofila b} = 0,0229.D645 - 0,00468.D663$$

Os teores de clorofilas foram expressos em mg.g^{-1} de peso seco de tecido.

2.10.2 Extração e quantificação de carotenóides

A extração de carotenóides seguiu o protocolo descrito por Kuhnen et al. (2009) com modificações. Amostras foram imersas em N₂ líquido, maceradas em 1mL de álcool metílico (P.A) para cada 100 mg de massa fresca e incubadas durante 1h no escuro. O extrato organossolvente foi centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi levado a espectrofotômetro UV – Vis (Hitachi U – 1800) para leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda de 200-700 nm. Os valores de absorbância a 450 nm foram selecionados para posterior quantificação do teor total de carotenoides, utilizando curva padrão de β -caroteno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA - 0,5

a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $y = 0.167x$, $r^2 = 0,99$). As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco de tecido.

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando-se os programas computacionais Excel, Statistica 7.0, BioEstat 5.3 utilizando-se o teste “t” de Student para comparação entre dois grupos de dados e análise multifatorial (ANOVA) quando as análises envolviam mais de um fator. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise de variância Multifactor ANOVA foi seguida pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade para os dados com distribuição normal e homoscedasticidade (Zar 1996).

3. RESULTADOS

3.1 DESENVOLVIMENTO DE GAMETÓFITOS DE *ACROSTICHUM DANAEIFOLIUM* CULTIVADOS SOB PAR E TRATAMENTO CRÔNICO DE PAR + RUVB.

Os gametófitos cultivados sob PAR eram filamentosos com oito dias de cultivo e apresentaram de 4 a 8 células protonemais e dois rizóides (Figura 6A). Aos 14 dias de cultivo o gametófito apresentou mais de 20 células protonemais e encontrava-se na forma espatulada (Figura 6B). Aos 28 dias de cultivo os gametófitos apresentaram uma forma ovalada, característica da espécie e um meristema lateral (Figura 6C). O aparecimento das primeiras estruturas reprodutivas ocorreu aos 70 dias, observando-se anterozóides, anterídios e arquegônios fecundados (Figura 6D-6E-6F). Aos 85 dias foram visualizados os primeiros esporófitos emergindo dos gametófitos. Observou-se um pequeno primórdio de esporófito surgindo de um gametófito (Figura 7A) além de uma fronde apresentando estômatos em formação na epiderme foliar (Figura 7C).

Em comparação ao tratamento controle, houve retardo no desenvolvimento dos gametófitos cultivados sob PAR+ RUVB (Figura 8). Gametófitos com oito dias de cultivo sob PAR+ RUVB apresentaram apenas um rizóide e uma célula protonemal (Figura 8A). Um gametófito com 14 dias de idade, mostrou quatro células protonemais e dois rizóides muito curtos (Figura 8B). Alguns gametófito cultivados sob PAR+RUVB mostraram projeções laterais que normalmente não ocorrem em gametófitos crescidos sob PAR, além de alterações no desenvolvimento que se acentuavam no decorrer do experimento terminando com a morte de quase a totalidade dos gametófitos, restando apenas alguns indivíduos nas regiões laterais que receberam menor incidência de RUVB (Figura 8C). Estes indivíduos apresentam sinais de senescência células com núcleo evidente e cloroplastos acumulados ao redor do núcleo. Não houve desenvolvimento de esporófitos ou estruturas reprodutivas nos gametófitos cultivados sob PAR+RUVB. (Figura 8).

Os resultados do teste “t” de Student mostram que existe diferença estatisticamente significativa (“t”= 6,2434) entre o número de células de gametófitos cultivados sob PAR e PAR+RUVB aos 12 dias de cultivo, sendo grande a diferença entre as médias dos tratamentos, $20,05 \pm 11,88$ para gametófitos crescidos sob PAR e $3,10 \pm 2,51$ para gametófitos crescidos sob PAR+RUVB.

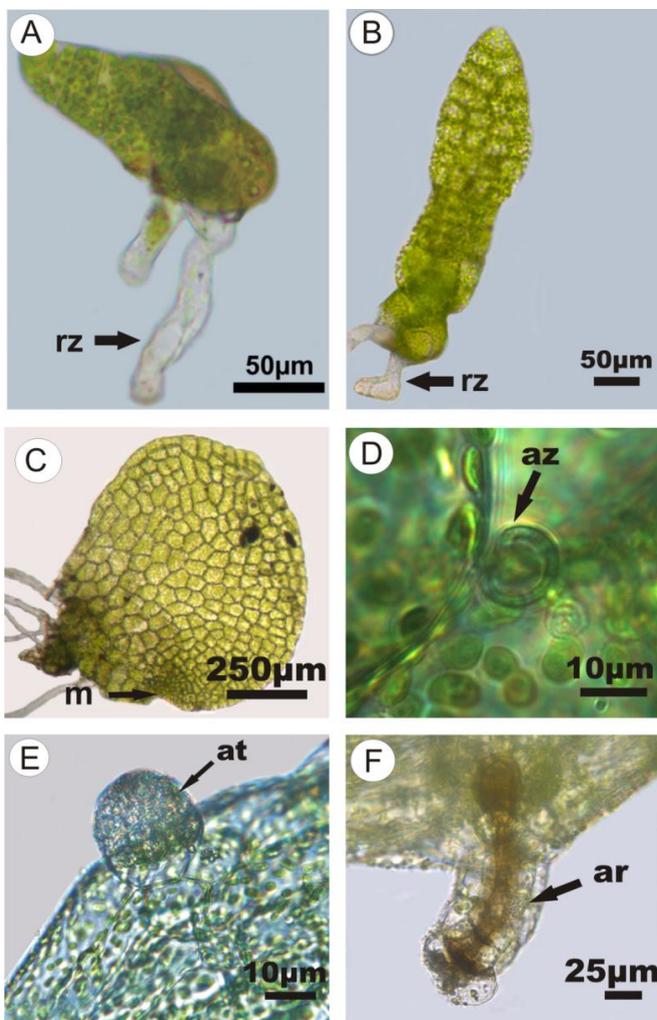


Figura 6. Fases do desenvolvimento de gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* cultivados sob PAR. A. Gametófitos com oito dias. B. Gametófito com 14 dias. C. Gametófito com 28 dias, seta apontando para o meristema(m). D. Anterozóide (az) aos 77 dias. E. Anterídios(at) aos 77 dias. F. Arquegônio(ar) possivelmente fecundado fotografado aos 91 dias.

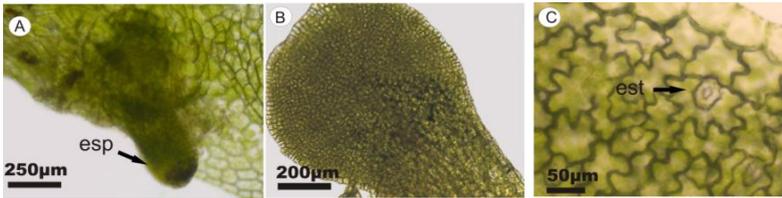


Figura 7. Esporófitos jovens de *Acrostichum danaeifolium* cultivados sob PAR ainda ligados ao gametófito. A. Esporófito (esp) recém-formado surgindo a partir do gametófito aos 85 dias de cultivo. B. Esporófito aos 85 dias com sua primeira fronde. C. Estômatos(est) na primeira fronde aos 91 dias de cultivo.

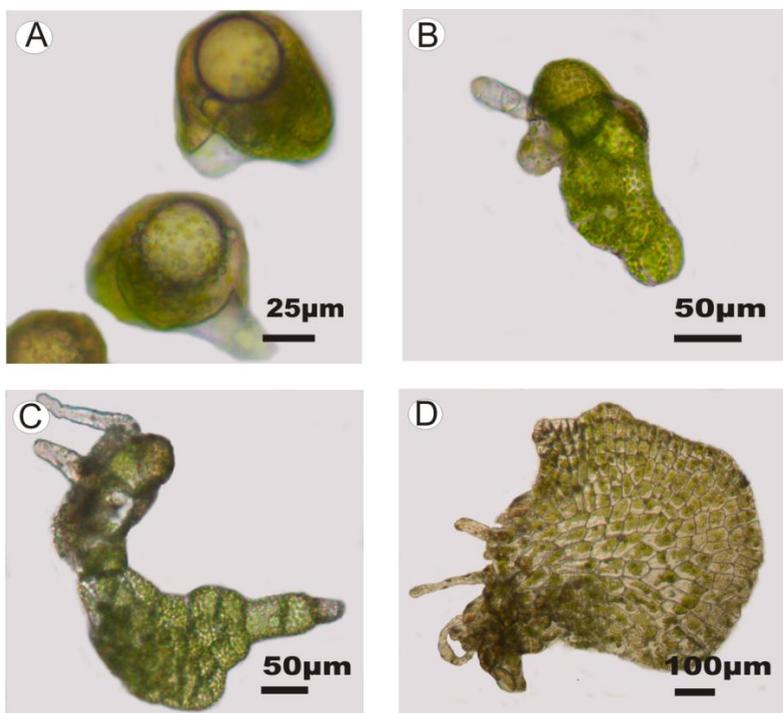


Figura 8. Fases do desenvolvimento dos gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* cultivados sob PAR+RUVB. A. Gametófito com oito dias. B. Gametófito com 14 dias. C. Gametófito com 28 dias. D. Gametófito com 83 dias.

3.2 EFEITO DE PAR E TRATAMENTO CRÔNICO DE PAR + RUVB EM FRONDES DE ESPORÓFITOS DE *ACROSTICHUM DANAEIFOLIUM*.

3.2.1 Morfologia externa

Os esporófitos de *Acrostichum daneifolium* expostos durante 45 dias ao tratamento PAR+RUVB mostraram as frondes enrugadas e necrosadas nas áreas mais afetadas pela RUVB (Figura 9B), enquanto que as plantas mantidas sob PAR apresentaram frondes expandidas, com coloração homogênea e bem hidratadas (Figura 9A).

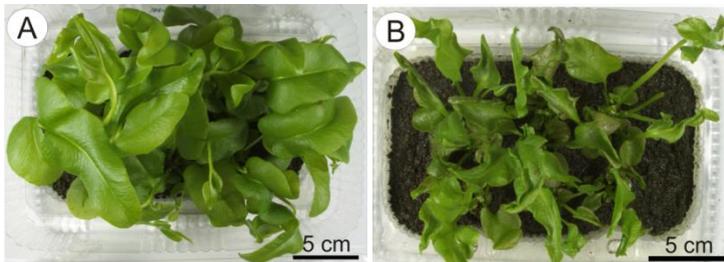


Figura 9. Esporófitos de *Acrostichum daneifolium* após um mês e meio de cultivo sob PAR e PAR+RUVB. A. Plantas cultivadas sob PAR. B. Plantas cultivadas sob PAR+RUVB.

3.2.2 Análise de frondes por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As células epidérmicas da face adaxial de frondes de esporófitos de *Acrostichum danaeifolium* cultivados sob PAR, vistas sob microscopia eletrônica de varredura, apresentaram paredes anticlinais sinuosas e paredes periclinais convexas (Figuras 10A e 10C) enquanto que em frondes de esporófitos cultivados durante 45 dias sob PAR + RUVB, as sinuosidades da parede periclinial

desapareceram ficando essas células com aspecto arredondado e além disso, muitas se apresentaram rompidas (Figura Figuras 10B e 10C).

As células epidérmicas da face abaxial de frondes de esporófitos de *Acrostichum daneifolium* cultivados sob PAR apresentaram paredes anticlinais bastante sinuosas e paredes periclinais convexas; os estômatos são do tipo anomocítico medindo aproximadamente 48 μm , apresentando células guardas homogêneas e alongadas e um poro estomático bastante evidente nas imagens (Figuras 11A, 11C e 11E). As células epidérmicas de frondes de esporófitos de *Acrostichum daneifolium* após 45 dias de cultivo sob PAR+RUVB apresentaram sinuosidade na parede anticlinal e parede periclinal convexa quando expostas a RUVB, porém muitos estômatos ($n=20$) mostraram-se mal formados, às vezes sem ostíolo (de tamanho normal) e outras de tamanho muito pequeno medindo em torno de 20 μm (Figura 11B, 11D e 11F). Essas células mostraram também a presença de cristais de substâncias que podem ser ceras, somente na epiderme adaxial.

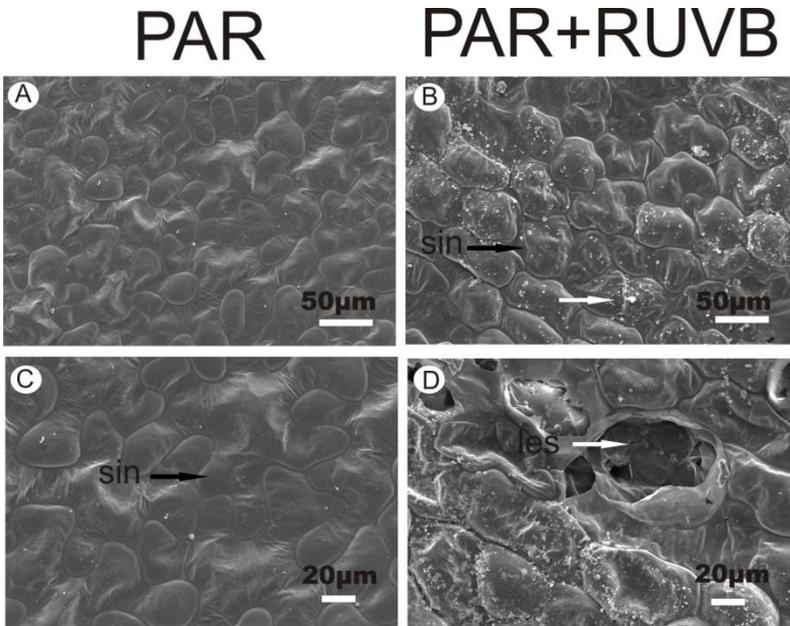


Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura da face adaxial de frondes de esporófitos de *Acrostichum daneifolium* após um mês e meio de cultivo sob PAR (esquerda) e PAR+RUVB(direita). A e C. Células epidérmicas de plantas crescidas sob PAR, com paredes anticlinais sinuosas. B e D. Células epidérmicas de plantas crescidas sob PAR+RUVB, com alteração do formato da célula e apresentando lesões nas células epidérmicas.

PAR

PAR+RUVB

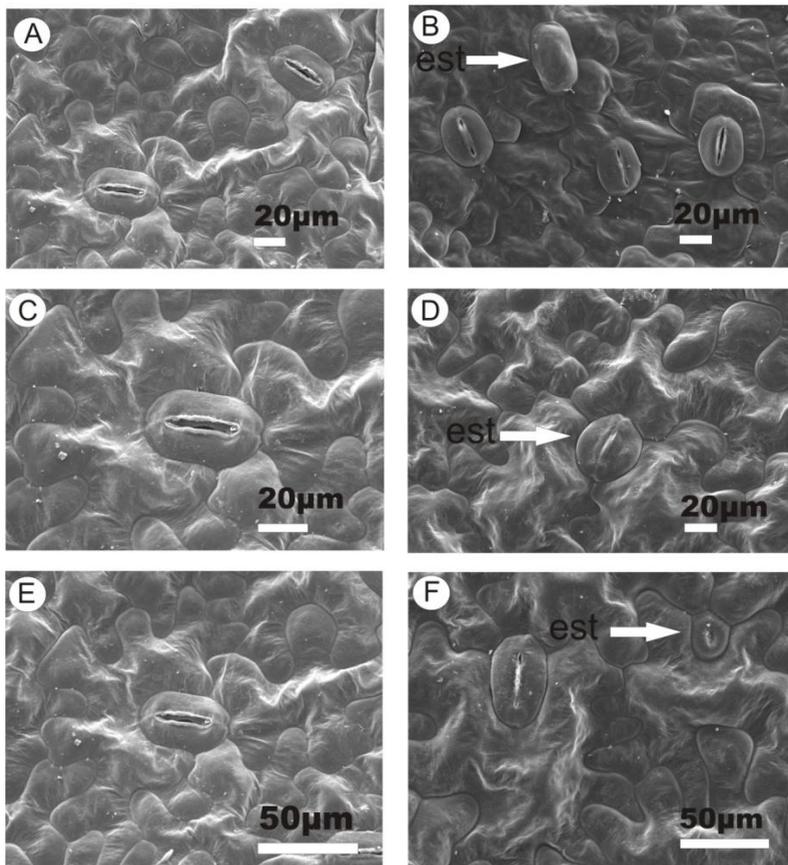


Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura da face abaxial de frondes de esporófitos de *Acrostichum daneifolium* após um mês e meio de cultivo sob PAR(esquerda) e PAR+RUVB(direita). A, C e E. Células epidérmicas de plantas crescidas sob PAR, com paredes anticlinais sinuosas, estômatos(est) anomocíticos. B, D e F. Células epidérmicas de plantas crescidas sob PAR+RUVB, com células anticlinais sinuosas, estômatos fechados, muitos deles com malformação, muito pequenos ou sem o ostíolo.

3.2.3 Análise morfológica de esporófitos por meio de microscopia de luz (ML)

Em secção transversal, na região da raque, de frondes de *Acrostichum danaeifolium*, corados com azul de toluidina (Figura 12) observam-se três feixes vasculares (Figura 12A-12B) e a epiderme unisseriada em ambas as faces formadas por células arredondadas e isodiamétricas (Figura 12C-12D). Em detalhe, na região da raque (Figura 12C-12D), observa-se o parênquima de preenchimento constituído de células com paredes finas e espaços intercelulares conspícuos. Próximo à face adaxial as células tendem a ter tamanho homogêneo e menor em relação às células próximas à face abaxial as quais apresentam tamanhos maiores e variados principalmente nas plantas cultivadas no PAR (Figura 12C). Os feixes vasculares são colaterais e delimitados pelo periciclo formado por uma camada de células e a pela endoderme, fortemente corada de azul, formada por células bastante homogêneas entre si (Figura 12D e 12F). Em secção transversal na região do limbo foliar (Figura 13A e 13F) observa-se a epiderme unisseriada, em ambas as faces, constituída por células grandes arredondadas e/ou alongadas principalmente na face adaxial das plantas cultivadas sob PAR+RUVB (Figura 13A-13B). Observam-se ainda cloroplastos nas células epidérmicas de ambas as faces (Figura 13D e 13F). Nas células epidérmicas da face abaxial das plantas cultivadas sob PAR (Figura 13E) observam-se o núcleo e cloroplastos distribuídos uniformemente ao redor do vacúolo. Já, na epiderme abaxial de planta cultivada sob PAR+RUVB os cloroplastos estão mais densamente corados e acham-se acumulados contra a parede interna da célula, bem como o núcleo celular (Figura 13F). O mesófilo é constituído por células alongadas paralelamente ao limbo foliar, com amplos espaços intercelulares, o qual pode ocupar toda a espessura foliar em frondes de ambos os tratamentos (Figura 13A-13D). Em 13C observam-se detalhes do aerênquima, câmara subestomática e estômato na epiderme abaxial em secções de frondes de *Acrostichum danaeifolium* cultivadas sob PAR. Em 13D observam-se detalhes de aerênquima de esporófitos cultivados sob PAR+RUVB, durante 45 dias.

Secções de frondes de *Acrostichum danaeifolium* coradas com lugol são mostradas na Figura 14. O lugol reagiu positivamente aos grãos de amidos dos cloroplastos evidenciando uma coloração marrom escura nas secções de frondes cultivadas sob PAR (Figura 14A e 14C). Já em secções de esporófitos cultivados sob PAR+RUVB a reação ao lugol foi muito menos.(Figura 14B e 14D).

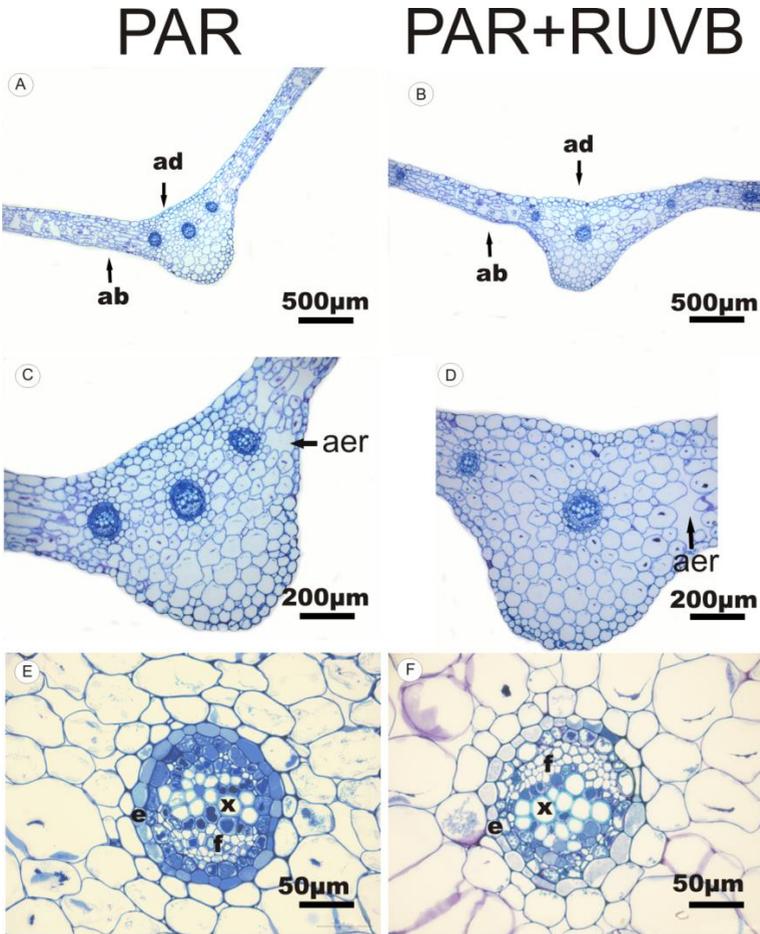


Figura 12. Secções transversais de frondes de esporófitos de *Acrostichum danaeifolium* e cultivados sob PAR (esquerda) e 45 dias sob PAR+RUVB (direita), corados com azul de toluidina. A e C. Aspecto de frondes cultivadas sob PAR. B e D. Aspecto de frondes cultivadas por 45 dias sob PAR+RUVB. E e F- Feixe vascular destacando a endoderme (e), periciclo (p), floema (f), e xilema(x) em plantas controle (e) e cultivadas sob PAR+RUVB (F). ad = epiderme adaxial, ab = epiderme abaxial, aer = aerênquima.

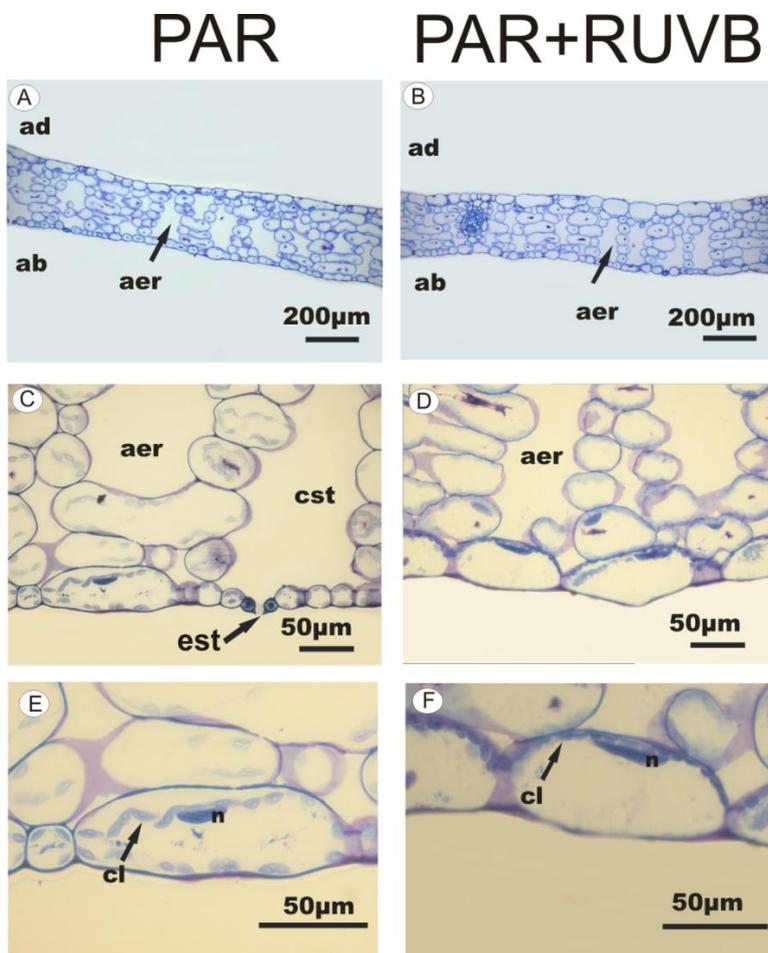


Figura 13. Secções transversais de frondes de esporófitos de *Acrostichum danaeifolium* cultivados sob PAR (esquerda) e 45 dias sob PAR+RUVB (direita), corados com azul de toluidina. aer = aerênquima, cl = cloroplasto, cst = câmara substomática, n = núcleo celular, seta preta grande indicando estômato, seta preta pequena indicando cloroplasto.

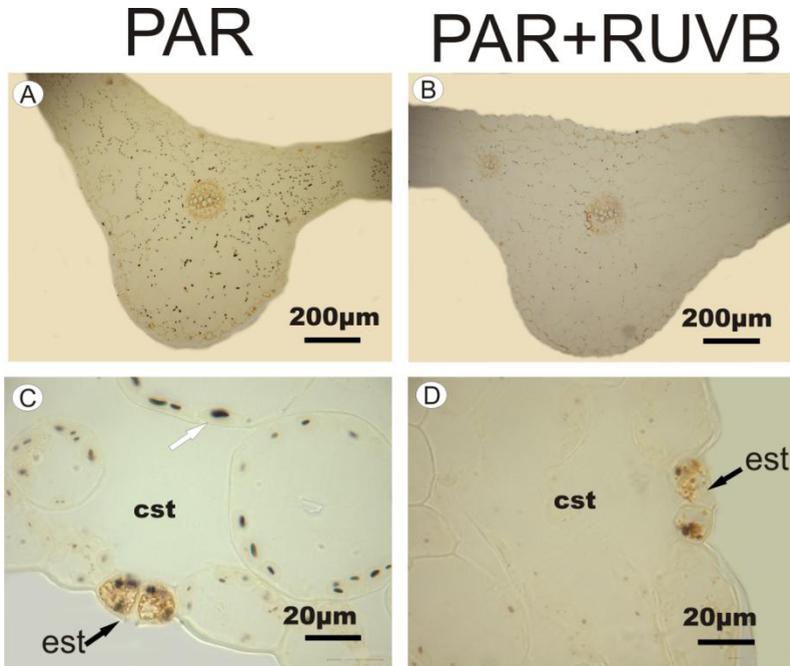


Figura 14. Secções transversais de frondes de esporófitos de *Acrostichum danaeifolium* cultivados sob PAR (esquerda) e 45 dias sob PAR+RUVB (direita), corados com lugol. aer = aerênquima, cl = cloroplastos. cst = câmara subestomática, seta preta indicando estômato, seta branca indicando cloroplasto com grão de amido.

3.3 EFEITO DE PAR E TRATAMENTO CRÔNICO DE PAR + RUVB NOS VALORES CLOROFILAS, CAROTENÓIDES E PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS

A tabela 3 apresenta os valores de conteúdos de clorofilas **a**, **b** e carotenoides em esporófitos crescidos sob PAR e sob exposição à PAR+RUVB. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

Tabela 3. Conteúdo de clorofilas **a**, **b** e carotenoides em esporófitos de *Acrostichum danaeifolium* cultivados durante 45 dias sob PAR e PAR+RUVB (1 hora diária). Médias seguidas por letras iguais não diferiram pelo teste “t” de Student ($p>0,05$).

	Tratamento		Estatística
	PAR	PAR+UV	“t”
	mg.g ⁻¹ OS		
	Média ± Desvio padrão		
Clorofila a	4,75±0,11	4,75±0,10	-0,0239
Clorofila b	4,93±1,44	3,89±0,37	1,2115
Carotenoides	138,07±21,20	134,55±8,80	0,2493

As análises da fluorescência da clorofila *a* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto aos parâmetros fotossintéticos analisados: α_{ETR} , ETR_{max} e E_k ao final de 45 dias (tabela 5).

Tabela 5. Resultados da análise multifatorial (ANOVA) para os resultados de α_{ETR} , ETR_{max} e E_k em esporófitos expostos a uma hora diária de RUVB durante 45 dias, foram consideradas as diferenças apenas do efeito Tempo x Radiação.

Tempo de exposição	Tratamentos					
	PAR	PAR+RUVB	PAR	PAR+ RUVB	PAR	PAR+ RUVB
Semanas	α_{ETR}		ETR_{max} ($\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		E_k ($\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	
	Média \pm Desvio padr\~ao					
1	0,22 \pm 0,02	0,22 \pm 0,03	18,95 \pm 1,81	22,78 \pm 4,81	86,79 \pm 3,22a	100,97 \pm 13,97ab
2	0,25 \pm 0,03	0,25 \pm 0,02	25,74 \pm 4,47	22,80 \pm 4,22	101,60 \pm 6,03ab	92,45 \pm 11,52ab
5	0,23 \pm 0,04	0,25 \pm 0,04	25,90 \pm 4,65	24,66 \pm 3,84	109,79 \pm 11,91b	97,52 \pm 2,17ab
6	0,24 \pm 0,04	0,28 \pm 0,02	25,90 \pm 6,21	29,01 \pm 3,232	102,24 \pm 12,35ab	102,44 \pm 4,54ab
F(Tempo x Radiação)	0,810		1,6004		3,249	
P	0,500682		0,215441		0,039439	
F(Tempo)	2.322		2.8014		1.928	
P	0.100607		0.061556		0.152030	
F(Radiação)	1.719		0.0541		0.287	
P	0.202210		0.817969		0.597298	

3.4 EFEITO DE PAR E TRATAMENTO AGUDO DE PAR + RUVB NOS VALORES DE CLOROFILAS, CAROTENÓIDES E PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS

A tabela 8 apresenta os valores de conteúdos de clorofilas **a**, **b** e carotenóides em esporófitos de *Acrostichum danaeifolium* mantidos sob PAR, submetidos à exposição de RUVB durante 8 horas e 24 horas após o término do tratamento. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos para as variáveis clorofila a, clorofila b e carotenóides.

As análises da fluorescência da clorofila *a* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto aos parâmetros fotossintéticos analisados: α_{ETR} , ETR_{max} e E_k em esporófitos de *Acrostichum danaeifolium* mantidos sob PAR, expostos à RUVB durante 2, 4, 6, 8 horas de exposição (Tabela 6) e 24, 48 e 168 horas após o término de exposição à RUVB (Tabela 7).

Tabela 6- Resultados da análise multifatorial (ANOVA) para os resultados de α_{ETR} , ETR_{max} e E_k em esporófitos expostos á RUVB durante 8 horas durante a exposição, foram consideradas as diferenças apenas do efeito Tempo x Radiação.

Tempo de exposição	Tratamentos					
	PAR	PAR+ RUVB	PAR	PAR+ RUVB	PAR	PAR+ RUVB
Horas	α_{ETR}		ETR_{max} ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{s}^{-1}$)		E_k ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{s}^{-1}$)	
	M\u00e9dia \pm Desvio padr\u00e3o					
2	0,28 \pm 0,02	0,25 \pm 0,02	42,29 \pm 5,57	36,43 \pm 5,30	150,78 \pm 10,23	143,54 \pm 8,23
4	0,27 \pm 0,01	0,27 \pm 0,04	40,91 \pm 2,42	41,46 \pm 6,06	150,12 \pm 3,52	151,83 \pm 0,19
6	0,25 \pm 0,03	0,26 \pm 0,04	40,07 \pm 6,00	41,02 \pm 7,34	157,23 \pm 7,07	159,36 \pm 10,56
8	0,24 \pm 0,05	0,26 \pm 0,01	40,25 \pm 7,45	39,89 \pm 4,94	168,75 \pm 5,30	154,58 \pm 15,99
F(Tempo X Radia\u00e7\u00e3o)	0,585		0,304		1,264	
P	0,633268		0,822267		0,320045	
F(Tempo)	0.691		0.057		2.997	
P	0.570864		0.981471		0.061690	
F(Radia\u00e7\u00e3o)	0.002		0.143		1.168	
P	0.969307		0.710678		0.295901	

Tabela 7- Resultados da análise multifatorial (ANOVA) para os resultados de α_{ETR} , ETR_{max} e E_k em esporófitos expostos á RUVB durante 8 horas após a exposição, foram consideradas as diferenças apenas do efeito Tempo x Radiação.

Tempo de exposição	Tratamentos					
	PAR	PAR+ RUVB	PAR	PAR+ RUVB	PAR	PAR+ RUVB
Horas	α_{ETR}		ETR_{max} ($\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^2 \text{s}^{-1}$)		E_k ($\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^2 \text{s}^{-1}$)	
	Média \pm Desvio padr\~ao					
8	0,24 \pm 0,05	0,26 \pm 0,01	40,25 \pm 7,45	39,89 \pm 4,94	168,75 \pm 5,3	154,58 \pm 15,99
24	0,24 \pm 0,05	0,23 \pm 0,03	40,35 \pm 8,72	31,17 \pm 3,04	153,66 \pm 9,59	135,92 \pm 8,28
48	0,26 \pm 0,04	0,22 \pm 0,02	36,99 \pm 5,06	31,43 \pm 5,3	146,01 \pm 5,09	143,71 \pm 13,63
168	0,30 \pm 0,00	0,25 \pm 0,03	44,11 \pm 2,87	33,88 \pm 6,12	151,42 \pm 8,07	135,30 \pm 11,53
F(Tempo X Radiação)	1,204222		0,906613		0,689311	
P	0,340076		0,4597		0,571696	
F(Tempo)	1,207217		1,34806		4,248464	
P	0,339047		0,294131		0,021832	
F(Radiação)	2,952525		7,297257		8,898872	

Tabela 8. Resultados da análise multifatorial (ANOVA) para os resultados da concentração de clorofila a, b e carotenoides em esporófitos expostos á RUVB durante 8 horas após a exposição, foram consideradas as diferenças apenas do efeito Tempo x Radiação.

Tempo após exposição	Tratamentos					
	PAR	PAR+ RUVB	PAR	PAR+ RUVB	PAR	PAR+ RUVB
Horas	Clorofila <i>a</i>		Clorofila <i>b</i>		<i>Carotenoides</i>	
	Média ± Desvio padrão					
8	4,82±0,09	4,85±0,15	4,64±0,16b	4,07±0,05a	160,60±2,79	158,11±2,5
24	4,55±0,07	4,61±0,22	5,86±0,08c	6,17±0,08d	155,78±3,69	158,22±4,84
F(Tempo X Radiação)	0,038722		54,31		1,315871	
P	0,848908		0,000078		0,284481	
F(Tempo)	9,37678		786,93		0,000117	
P	0,015531759		0		0,99161803	
F(Radiação)	0,305342286		4,838613488		1,436772897	
P	0,595649936		0,059022906		0,264961545	

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, a idade em que a maturação sexual foi alcançada pelos gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* diferiu do descrito por Lloyd & Gregg (1975), porém esta diferença pode ser explicada pelo método de cultivo utilizado, iluminação, temperaturas, além do local e do período de coleta. Esses autores conseguiram gametófitos sexualmente maduros aos 23 dias, muito antes dos 70 dias neste experimento. A idade, os locais de coleta, a época de coleta, as condições de armazenamento e condições de cultura, têm uma grande influência sobre a germinação de esporos de samambaias (Camloh & Gogala 1992, Camloh 1993, Camloh 1999, Sheffield *et al.* 2001). Diferenças no tempo de formação do esporófito e nos percentuais de formação de esporófitos também são comuns em estudos sobre desenvolvimento gametofítico e esporofítico (Sheffield *et al.* 2001).

Os gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* que cresceram a partir de esporos que germinaram sob PAR+RUVB mostraram um menor número de células após 12 dias de cultivo, projeções laterais anormais e houve morte de quase a totalidade dos gametófitos, não havendo surgimento de estruturas reprodutivas, confirmando os resultados de Randi *et al.* (2014). Esses autores também observaram deformações e atraso no desenvolvimento gametofítico quando esporos de *A. danaeifolium* germinaram em meio líquido durante 30 dias sob PAR + RUVB (10 W m^{-2} durante 30 minutos por dia). Esses resultados foram semelhantes aos observados por Kato (1964), que analisou somente a morfologia de gametófitos de *Pteris vittata* L. (Polypodiopsida, Pteridaceae) e *Osmunda japonica* Thunb. (Polypodiopsida, Osmundaceae), e *Dryopteris varia* (Linnaeus) Kuntze (Polypodiopsida, Dryopteridaceae), submetidos à RUVB através de uma lâmpada UV germicida de 15 W (Toshiba Electric Co.) 30 cm acima das amostras ocorreu a inversão da polaridade do protonema e a presença de protonemas filamentosos.

Quando esporófitos de *Acrostichum danaeifolium* foram expostos durante 45 dias ao tratamento PAR+RUVB mostraram as frondes enroladas e necrosadas nas áreas mais afetadas pela radiação UVB. O enrolamento das folhas de plantas expostas a RUVB pode indicar uma estratégia de proteção da face abaxial da folha à radiação ultravioleta ou ser um efeito colateral da ação nociva desta radiação. Diversos trabalhos têm tratado do enrolamento das folhas de plantas expostas a RUV, dentre elas estão *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Boeger & Poulson, 2006), Lariço (*Larix occidentalis* Nutt.) e Abeto

(*Picea glauca x Picea engelmannii*) (Krol *et al.* 2000) e *Brassica napus* L. (Wilson & Greenberg 1993). Estes últimos autores citam três possíveis causas para este enrolamento. A primeira seria pelo desencadeamento de um fotorreceptor para UVB, a segunda pela degradação das auxinas, e a terceira pela degradação de proteínas, DNA ou fotossistemas (Wilson & Greenberg, 1993).

No presente trabalho observou-se através da microscopia eletrônica de varredura, que nas frondes de esporófitos de *Acrostichum danaeifolium* expostos durante 45 dias ao tratamento PAR+RUVB muitos estômatos mostraram-se mal formados, às vezes sem ostíolo e outros mostraram tamanho muito reduzido. Na epiderme adaxial, as sinuosidades da parede periclinal desapareceram ficando essas células com aspecto arredondado. Em *Arabidopsis thaliana* foi descoberta uma proteína denominada de *UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8)* que atua como fotorreceptora de UVB (Cloix *et al.* 2012). Segundo Hayes *et al.* (2014) o receptor UVR8 pode antagonizar os efeitos de auxinas e giberelinas, afetando sua síntese e degradação. Assim a RUVB também pode interferir no alongamento celular e por consequência no formato das paredes celulares epidérmicas devido à redução nos níveis desses hormônios, causando também o enrolamento das folhas. Saibo *et al* (2003) afirmam que as giberelinas são as principais indutoras na formação de estômatos, o que significa que a inibição de sua sinalização pode ter contribuído para a má formação dos estômatos. Então a RUVB poderia induzir a má formação dos estômatos por meio de mecanismos semelhantes aos encontrados em *Arabidopsis thaliana* via interação de proteínas UVR8+COP1 sob RUVB conforme sugerido por Kang (2009).

Quando secções de frondes de esporófitos de *Acrostichum danaeifolium* cultivados sob PAR+RUVB, foram analisadas sob microscopia de luz observou-se que os cloroplastos da epiderme abaxial estavam mais densamente corados pelo corante azul de toluidina e achavam-se acumulados contra a parede interna da célula, o mesmo ocorrendo com o núcleo celular. A movimentação dos cloroplastos induzida pela luz azul e RUV tem como função a proteção contra a fotodegradação (Haupt & Scheuerlein, 1990) O deslocamento dos cloroplastos e núcleo deve indicar um tipo de proteção contra os danos causados por RUVB.

Nas secções de frondes de esporófitos de *Acrostichum danaeifolium* cultivados sob PAR+RUVB, analisadas sob microscopia de luz e corada com lugol, observou-se grânulos de amido menos evidentes nos cloroplastos quando comparadas com frondes de esporófitos cultivados sob PAR. He *et al.* (1994) observaram aumento

da quantidade de grãos de amido em plantas de *Pisum sativum* L. cultivadas sob RUVB, que não foram formados pela síntese de amido mas sim pela imobilização dos açúcares celulares. Randi *et al.* (2014) ao analisarem gametófitos de *A. danaeifolium* irradiados com RUVB observaram aumento no tamanho dos grânulos de amido, porém os autores expuseram os gametófitos há apenas 30 minutos de RUVB diária, durante um mês.

Os conteúdos de clorofilas a, b e carotenoides em esporófitos de *Acrostichum danaeifolium* cultivados sob PAR e PAR+RUVB foram semelhantes tanto no tratamento crônico quanto no tratamento agudo. Em gametófitos de *A. danaeifolium* cultivados durante 30 dias sob PAR+RUVB, Randi *et al.* (2014) observaram redução nos teores de clorofila a, aumento no teores de clorofila b, aumentos no trans- β -caroteno e nos compostos fenólicos. Já, plantas de *Gnaphalium luteoalbum* L. (Asteraceae) expostas a RUVB aumentaram suas concentrações de clorofilas a e b, sendo que o maior aumento foi nas concentrações de clorofila b (Cuadra *et al.* 1997). Plantas de *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae), ao receberem doses adicionais de RUVB sofreram redução significativa do crescimento e dos pigmentos fotossintéticos, porém os conteúdos de antocianinas e flavonóides aumentaram (Balakrishnan *et al.* 2005). Ranjbarfordoei *et al.* (2009) trabalhando com *Prunus dulcis* (Miller) D. Webb observaram reduções no conteúdo de carotenoides em plantas exposta à UVB. Boeger & Poulson (2006) encontraram concentrações maiores de clorofilas totais e compostos fenólicos em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Cuadra *et al.* (2004) observaram diminuição das clorofilas e aumento de fenilpropanóides, compostos capazes de absorver RUV, ao submeterem plantas de *Jaborosa magellanica* Brisben. a RUVB. Singh *et al.* (2011) observaram a diminuição da clorofila total e da razão clorofila a/b em plantas de *Dolichos lablab* L. expostas a RUVB.

As análises da fluorescência da clorofila a não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto aos parâmetros fotossintéticos analisados em esporófitos de *Acrostichum danaeifolium* expostos à RUVB tanto no tratamento crônico quanto no agudo. Espécies diferentes tendem a responder de maneira diferente a RUVB. Por exemplo, Fv/Fm e ETR não foram afetados pela exposição de três espécies de briófitas do sub-ártico: *Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp, *Polytrichum commune* Hedw. e *Barbilophozia lycopodioides* (Wallr.) Loeske. à RUVB, mas a exposição de longo prazo causou resultados mais significativos quando à dessecação das mesmas (Arróniz-Crespo *et al.* 2011). Segundo Hu *et al.* (2013) a adição de uma

fonte artificial de radiação UVB em cultivos de *Glycine max* (L.) Merrill causou a diminuição da variável F_v/F_m e E_k , sugerindo que RUVB causa diminuição na atividade do PS II diminuindo a eficiência fotossintética das plantas de soja. Em *Azolla microphylla* Kaulf. (Polypodiopsida, Salviniaceae), uma pteridófito aquática, irradiações com RUVB intermitentes durante 12 dias, causaram redução na atividade do PSII, mostrando que essa espécie é sensível à RUVB (Jayakumar *et al.* 2002).

Dados da literatura (Caldwell *et al.* 2003, Caldwell *et al.* 2007) mostraram mudanças nos níveis de clorofilas, carotenóides, rendimento reprodutivo, massa foliar por unidade de área foliar, fotossíntese líquida e atividade do fotossistema II, não foram suficientemente robustas para serem significativas. Apesar de alguns resultados apontarem diferenças em alguns estudos, um grande número de estudos com plantas superiores mostram que a fotossíntese (fixação de CO₂ por unidade de área foliar) não é significativamente afetada por mudanças na radiação UV-B, quando as plantas são cultivadas em condições naturais. Embora a fotossíntese de plantas superiores e musgos seja raramente afetada pela RUVB aumentada ou reduzida, na maioria dos estudos de campo os efeitos sobre o crescimento e morfologia das plantas superiores e musgos são manifestados.

Para Reboredo & Lidon (2012) embora a radiação UV-B possa ter efeitos inibitórios sutis sobre o acúmulo de biomassa, sua principal conclusão, derivada de estudos com plantas terrestres, é que a fotossíntese não é significativamente afetada por mudanças na radiação UV-B, quando as plantas crescem sob condições encontradas no ambiente natural. Newsham & Robinson (2009) em uma meta-análise avaliando respostas de plantas em regiões polares chegou à conclusão de que parâmetros fotossintéticos (F_v/F_m e Φ_{PSII}) e as concentrações de pigmentos associados (carotenóides totais e clorofilas) não foram afetadas pela exposição aos raios UV-B, e conclui que apesar de ser dominada por briófitas, a vegetação de regiões polares responde de uma forma semelhante a plantas de latitudes mais baixas.

Neste trabalho, os gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* não sobreviveram à exposição diária de RUVB. Já, os esporófitos expostos a RUVB mostraram alterações nas epidermes foliares, nos estômatos, e aparentemente menor deposição de amido nos cloroplastos, mas não nos parâmetros fotossintéticos analisados.

6. CONCLUSÃO

Gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* foram susceptíveis ao tratamento de RUVB e responderam de forma semelhante a outros casos reportados na literatura. Esporófitos não sofreram efeitos causados pela exposição à RUVB nas variáveis relacionadas à fotossíntese, nas concentrações de clorofilas a e de carotenoides tanto nos tratamentos crônicos quanto agudos, porém a RUVB causou enrolamento das frondes, malformação de estômatos no tratamento crônico. Em termos gerais a planta apresentou-se sensível em sua fase gametofítica e esporofítica, mostrando, na fase esporofítica, alterações nas células epidérmicas, porém manteve o desempenho fotossintético dos esporófitos, após exposições crônicas e agudas à RUVB.

REFERÊNCIAS

- Aphalo, P. J.; Albert, A.; Björn, L. O.; Lasse Ylianttila, Figuraeroa, F. L.; Huovinen, P.. Introduction. In: **Beyond the visible: A handbook of best practice in plant UV photobiology**. Helsinki: University of Helsinki, Division of Plant Biology. p. 176, 2012.
- Arcand, N.N.; Ranker, T.A. Conservation Biology. In: **The biology and evolution of ferns and lycophytes**. Cambridge University Press, p.468, 2008.
- Arnon, Daniel I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant physiology**, v. 24, n. 1, p. 1, 1949.
- Arróniz-Crespo, M., Gwynn-Jones, D., Callaghan, T. V., Núñez-Olivera, E., Martínez-Abaigar, J., Horton, P., Phoenix, G. K. Impacts of long-term enhanced UV-B radiation on bryophytes in two sub-Arctic heathland sites of contrasting water availability. **Annals of Botany**, v. 108, n. 3, p. 557-565, 2011.
- Balakrishnan V., Venkatesan K., Ravindran K.C., Kulandaivelu G.. Protective mechanism in UV-B treated *Crotalaria juncea* L. seedlings. **Plant Protection Science-Prague**. v. 41, n. 3, p. 115, 2005.
- Bilger, W.; Schreiber, U.; Bock, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**. v.102, n.4, p.425-432, 1995.
- Bonde, S. D.; Kumaran, K. P. N. The oldest macrofossil record of the mangrove fern *Acrostichum* L. from the Late Cretaceous Deccan Intertrappean beds of India. **Cretaceous Research**, v. 23, n. 1, p. 149–152, fev. 2002.
- Brandle, J.R.; Campbell, W.F.; Sisson, W.B.; Caldwell, M.M. Net photosynthesis, electron transport capacity, and ultrastructure of *Pisum sativum* L. exposed to ultraviolet-B radiation. **Plant Physiology**, v.60, p.165-169, 1977.
- Boeger, M. R. T.; Poulson, M. E. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). **Acta Botanica Brasílica**, v. 20, n. 2, p. 329-338, 2006.
- Caldwell, M. M., Bornman, J. F., Ballaré, C. L., Flint, S. D., Kulandaivelu, G. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change

- factors. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 252-266, 2007.
- Caldwell, M. M., Ballaré, C. L., Bornman, J. F., Flint, S. D., Björn, L. O., Teramura, A. H., Tevini, M. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 29-38, 2003.
- Camloh, M.; Gogala, N. In vitro culture of *Platycerium bifurcatum* gametophytes. **Scientia Horticulturae**. v.51, p.343-346, 1992.
- Camloh, M. Spore germination and early gametophyte development of *Platycerium bifurcatum*. **American Fern Journal**. v.83, p.79-85, 1993.
- Camloh, M. Spore age and sterilization affect germination and early gametophyte development of *Platycerium bifurcatum*. **American Fern Journal**. v.89, p.124-132, 1999.
- Cloix, C., Kaiserli, E., Heilmann, M., Baxter, K. J., Brown, B. A., O'Hara, A., Jenkins, G. I. C-terminal region of the UV-B photoreceptor UVR8 initiates signaling through interaction with the COP1 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 40, p. 16366-16370, 2012.
- Cuadra, P.; Harborne, J. B.; Waterman, P. G. Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. **Phytochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1377-1383, 1997.
- Cuadra, P.; Herrera, R.; Fajardo, V.. Effects of UV-B radiation on the Patagonian *Jaborosa magellanica* Brisben. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 76, n. 1, p. 61-68, 2004.
- Dyer, A. F. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. **The experimental biology of ferns**, v. 253, p. 305, 1979.
- FAO. The world's mangroves, 1980-2005: a thematic study prepared in the framework of the global forest resources assessment 2005. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome. p.89, 2007.
- Feder, Ned; O'Brien, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, p. 123-142, 1968.
- Figuroa, F.L.; Conde-Álvarez, R. & Gómez, I. Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated

- chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. **Photosynthesis Research**, v.75 p.259-275, 2003.
- Freitas, M. C. De A. De. **Influência de fatores exógenos na germinação de esporos e da radiação Itravioleta b (ruv b) no desenvolvimento de gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch. (polypodiopsida, pteridaceae): uma pteridófito do manguezal.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- Froidfond, J.; Soriano-Sierra, E. Sensoriamento remoto sobre ecossistemas de manguezal da Ilha de Santa Catarina, Brasil. I: Adequação da técnica. **Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, p. 157–163, 1996.
- Genty, B.; Briantais, J. M. Baker, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, V. 900, p.87-92, 1989.
- Gloag, R. S.; Ritchie, R. J.; Chen, M.; Larkum, A. W. D.; Quinnell, R. G. Chromatic photoacclimation, photosynthetic electron transport and oxygen evolution in the chlorophyll d-containing oxyphotobacterium *Acaryochloris marina*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1767, n.2, p.127-135, 2007.
- Gomez, L. D. *Acrostichum aureum*. In: **Costa Rican natural history**. University of Chicago Press, p. 185-187, 1983.
- Greenberg, B. M. et al. Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction center protein in the visible and UV spectral regions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 17, p. 6617–20, set. 1989.
- Hayes, S., Velanis, C. N., Jenkins, G. I., & Franklin, K. A. UV-B detected by the UVR8 photoreceptor antagonizes auxin signaling and plant shade avoidance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 32, p. 11894-11899, 2014.
- Haupt, W.; Scheuerlein, R. Chloroplast movement. **Plant, Cell & Environment**, v. 13, n. 7, p. 595-614, 1990.
- He, J.; Huang, L. K.; Whitecross, M. I. Chloroplast ultrastructure changes in *Pisum sativum* associated with supplementary ultraviolet (UV-B) radiation. **Plant, Cell & Environment**, v. 17, n. 6, p. 771-775, 1994.

- Hilal, M. et al. Epidermal lignin deposition in quinoa cotyledons in response to RUVB radiations. **Photochemistry and Photobiology**, v. 79, n. 2, p. 205–10, fev. 2004.;
- Hietz, P. Fern adaptations to xeric environments. In: **Fern ecology**. Cambridge University Press. p. 444, 2010.
- Hiscox, J.D.; Israelstam, G.F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**. v.57, p.1332-1334, 1979.
- Hu, Z., Li, H., Chen, S., & Yang, Y. Chlorophyll content and photosystem II efficiency in soybean exposed to supplemental ultraviolet-B radiation. **Photosynthetica**, v. 51, n. 1, p. 151-157, 2013.
- Jayakumar, M.; Eyini, M.; Lingakumar, K.; Kulandaivelu, G. Effects of enhanced ultraviolet-B (280-320 nm) radiation on growth and photosynthetic activities in aquatic fern *Azolla microphylla* Kaulf. **Photosynthetica**. v.40, p.85-89, 2002.
- Janzen, Daniel H. Mangroves: where's the understory?. **Journal of Tropical Ecology**, v. 1, n. 01, p. 89-92, 1985.
- Jones, L.W. & Kok, B.. Photoinhibition of chloroplast reactions. I. Kinetics and action spectra. **Plant Physiol.** v. 41, p.1037-1043, 1966.
- Johansen, D.A. **Plant Microtechnique**. McGraw Hill, New York .1940.
- Kang, C. Y., Lian, H. L., Wang, F. F., Huang, J. R., & Yang, H. Q. Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in Arabidopsis. **The Plant Cell Online**, v. 21, n. 9, p. 2624-2641, 2009.
- Kato, Y. Consequences of ultraviolet radiation on the differentiation and growth of fern gametophytes. **New Phytologist**, v. 63, n. 1, p. 21-27, 1964.
- Kessler, M. Biogeography of ferns. in: **Fern ecology**. p. 22-60, 2010.
- Kenrick, P.; Crane, P. R. The origin and early evolution of plants on land. **Nature**. v. 389, n. 6646, p. 33-39, 1997.
- Krause, G. H.; Weis, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics. **Annual Review of Plant Physiology**. v.42, p.313-349, 1991.
- Krol, P.M.; Ormrod, D.P.; Binder, W.D. & L'Hirondelle, S.J. Effects of ultraviolet-B radiation on needle anatomy and morphology of Western Larch, Interior Spruce and Lodgepole Pine. **Journal of Sustainable Forestry**. v.10, p141-148, 2000.
- Kuhnen S, Lemos P.M.M., Campestrini L.H., Ogliari J.B., Dias P.F., Maraschin M, Antiangiogenic properties of carotenoids: a potential

- role of maize as functional food. **Journal of Funtional Foods** v.1, n.3, p.284–290, 2009.
- Lambers, H., Chapin, F. S., III. and Pons, T. L. **Plant Physiological Ecology**, 2nd edn. New York: Springer-Verlag. 2008.
- Lloyd, R. M.; Gregg, T. L.. Reproductive biology and gametophyte morphology of *Acrostichum danaeifolium* from Mexico. **American Fern Journal**, p. 105-120, 1975.
- Marengo, R. A.; Lopes, N. F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Viçosa - MG, Editora UFV, p.451, 2005
- Maxwell, K.; Johnson, G. N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of experimental botany**. v. 51, n. 345, p. 659–68, abr. 2000.
- Mehlreter, K.; Palacios-Rios, M. Phenological studies of *Acrostichum danaeifolium* (Pteridaceae, Pteridophyta) at a mangrove site on the Gulf of Mexico. **Journal of Tropical Ecology**, v. 19, n. 02, p. 155–162, 10 fev. 2003.
- Moran, RC., 2008. Diversity, biogeography, and floristics. In RANKER, TA. and Haufler, C.H. (Eds.), **Biology and evolution of ferns and lycophytes**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 367-394.
- Moran, R. C. Clave para las familias de pteridofitas. **Flora Mesoamericana**, v. 1, p. 1-2, 1995.
- Newsham, K. K.; Robinson, S.A. Responses of plants in polar regions to UVB exposure: a meta-analysis. **Global Change Biology**, v. 15, n. 11, p. 2574-2589, 2009.
- O'Brien T.P.; Feder N.; McCully M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** v.59, p.368-73, 1965.
- Paiva, J. G. A., Fank-de-Carvalho, S. M., Magalhães, M. P., & Graciano-Ribeiro, D. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasilica**. v.20, n.2, p.257-264, 2006
- Park, Y. S.; Barrett, J. D.; Bonga, J. M. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.34, n. 3, p. 231-239, 1998.
- 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, p.78-79, 2003.

- Platt, T.; Gallegos, C.L. Harrison, W.G. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. **Journal of Marine Research**, v.38, p.687-701, 1980.
- Ranjbarfordoei, A.; Samson, R.; Van Damme, P. Photosynthesis performance in sweet almond [*Prunus dulcis* (Mill) D. Webb] exposed to supplemental UV-B radiation. **Photosynthetica**, v. 49, n. 1, p. 107-111, 2011.
- Randi, A. M., Freitas, M. C. A., Rodrigues, A. C., Maraschin, M., Torres, M. A. Acclimation and photoprotection of young gametophytes of *Acrostichum danaeifolium* to UV-B stress. **Photosynthetica**, v. 52, n. 1, p. 50-56, 2014.
- Ralph, P.J.; Gademann, R. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. **Aquatic Botany**, v. 82, n. 3, p. 222-237, 2005.
- Ranjbarfordoei, A.; van Damme, P.; Samson, R. Elevated ultraviolet-B radiation influences photosynthetic pigments and soluble carbohydrates of sweet almond *Prunus dulcis* (Miller) D. Webb. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**. v.8, p1077-1084, 2009.
- Rathinasabapathi, B. Ferns represent an untapped biodiversity for improving crops for environmental stress tolerance. **New Phytologist**, v.172, n.3, p. 385-390, 2006.
- Reboredo, F.; Jc Lidon, F. UV-B radiation effects on terrestrial plants–A perspective. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 24, n. 6, 2012.
- Reitz, R. Vegetação da zona marítima de Santa Catarina. **Sellowia**, v.13, n.13 p.17-115, 1961.
- Ritchie, R. J. Fitting light saturation curves measured using modulated fluorometry. **Photosynthesis Research**, v.96, n.3, p.201-215, 2008.
- Saibo, N. J., Vriezen, W. H., Beemster, G. T., & Van Der Straeten, D. Growth and stomata development of *Arabidopsis* hypocotyls are controlled by gibberellins and modulated by ethylene and auxins. **The Plant Journal**, v. 33, n. 6, p. 989-1000, 2003.
- Setlow, R.B. 1974. The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. Proc. atl. Acad. Sci. USA. v.71.p. 3363-3366.
- Sharpe, J. M. Responses of the mangrove fern *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch. (Pteridaceae, Pteridophyta) to disturbances resulting from increased soil salinity and Hurricane Georges at the Jobos Bay National Estuarine Research Reserve,

- Puerto Rico. **Wetlands Ecology and Management**, v. 18, n. 1, p. 57–68, 18 jun. 2009.
- Singh, R., Singh, S., Tripathi, R., Agrawal, S. B. Supplemental UV-B radiation induced changes in growth, pigments and antioxidant pool of bean (*Dolichos lablab*) under field conditions. **Journal of Environmental Biology/Academy of Environmental Biology, India**, v. 32, n. 2, p. 139-145, 2011.
- Souza, M.L.D'El R.; Falkenberg, D.B. de; Amaral, L. da G.; Fronza, M.; Araújo, A.C.; Sá, M.R.de. Vegetação Do Portal Da Daniela, Florianópolis, SC, Brasil. I. Levantamento Florístico E Mapa Fitogeográfico. **Insula Revista de Botânica**, v. 21, p. 87-117, 1991.
- Souza, M.L.D.E.R., Falkenberg, D.B., Amaral, L.G., Fronza, M. Fitossociologia do manguezal do Rio Tavares (Ilha de Santa Catarina, Florianópolis, SC-Brasil). **Insula Revista de Botânica**, v. 23, p. 99-119, 1994.
- Smith, A. R. Pryer, K. M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H., Wolf, P. G. Classification for extant ferns. **Taxon**, v. 55, n.3, p. 705–731, August. 2006.
- Schaeffer-Novelli, Y. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. **Caribbean ecological Research**, São Paulo. p. 64, 1995.
- Sheffield, E., G. E. Douglas, S. J. Hearne, S. Huxham, J. M. Wynn. Enhancement of fern spore germination and gametophyte growth in artificial media. **American Fern Journal**. v.91, p.179-186, 2001.
- Schreiner, M., Mewis, I., Huyskens-Keil, S., Jansen, M. A. K., Zrenner, R., Winkler, J. B. Krumbein, A. UV-B-induced secondary plant metabolites-potential benefits for plant and human health. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, n. 3, p. 229-240, 2012.
- Schulze, D-E.; Beck, E. Müller-Hohenstein, K. **Plant ecology**. Berlin/Heidelberg: Springer. p. 702, 2005.
- Siefermann-Harms, D. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. **Physiologia Plantarum**, v. 69, n. 3, p. 561-568, 1987.
- Soriano-Sierra, E. J. Caracterização ecológica dos biótopos e sua ocupação pelas comunidades vegetais no manguezal do Itacorubi (Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil). **Trab. Concurso Público Professor Adjunto UFSC**. p.124, 1993.
- Teklemariam, T.; Blake, T. J. Effects of UVB preconditioning on heat tolerance of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Environmental and experimental botany**, v. 50, n. 2, p. 169-182, 2003.

- Tevini, M.; Teramura, A. H. RUVB Effects on Terrestrial Plants. **Photochemistry and Photobiology**, v. 50, n. 4, p. 479–487, out. 1989.
- Wilson, M.I.; Greenberg, B.M. Specificity and photomorphogenic nature of ultraviolet-B-induced cotyledon curling in *Brassica napus* L. **Plant Physiology**. v.102, p.671-677, 1993.
- White, A. J.; Critchley, C. Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. **Photosynthesis Research**, v.59, n.1, p.63–7, 1999.
- Van Kooten, O.; Snel, J. F. H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v.25, n.3, p.147-150, 1990.
- Zar, J. H. **Biostatistical Analysis**, 3 ed. Prentice Hall, New Jersey. 662p. 1996.

Sites consultados:

<http://visibleearth.nasa.gov/view.php?id=7044>, site consultado em 05/07/14