

Mestrado Profissional
Uso Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Tropicais

KEYVILLA DA COSTA AGUIAR

**REPRODUÇÃO E CRESCIMENTO DE *ISOETES* L. ENDÊMICAS DAS
SERRAS DE CARAJÁS**

Belém / PA

2020

Mestrado Profissional
Uso Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Tropicais

KEYVILLA DA COSTA AGUIAR

**REPRODUÇÃO E CRESCIMENTO DE *ISOETES* L. ENDÊMICAS DAS
SERRAS DE CARAJÁS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, do Programa de Mestrado Profissional em Uso Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Tropicais, do Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável (ITV DS).

Orientador: Cecílio Frois Caldeira Júnior, PhD.
Coorientador: Markus Gastauer, PhD.

Belém / PA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A282 Aguiar, Keyvilla da Costa
Reprodução e crescimento de *Isoetes L.* endêmicas das Serra de Carajás / Keyvilla da Costa Aguiar -- Belém-PA, 2020.
69 f.: il.

Dissertação (mestrado) -- Instituto Tecnológico Vale, 2020.
Orientador: Cecílio Frois Caldeira Júnior, PhD.
Coorientador: Markus Gastauer, PhD.

1. FLONA de Carajás. 2. Canga. 3. Licófitas da Amazônia. I. Caldeira Júnior, Cecílio Frois. II. Gastauer, Markus. III. Título.

CDD.23 ed. 622.752098115

Bibliotecário(a) responsável: Nisa Gonçalves CRB 2 - 525

KEYVILLA DA COSTA AGUIAR

**REPRODUÇÃO E CRESCIMENTO DE *ISOETES* L. ENDÊMICAS DAS
SERRAS DE CARAJÁS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, do Programa de Mestrado Profissional em Uso Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Tropicais, do Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável (ITV DS).

Data da aprovação:

Banca examinadora:

Cecílio Frois Caldeira Júnior

Orientador – Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável (ITV DS)

Silvio Junio Ramos

Membro interno – Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável (ITV DS)

Roberto Lisboa Cunha

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

DEDICATÓRIA

A minha família que sempre investiu em minha formação, pelo imensurável apoio e confiança. Em especial aos meus avós, que além de exercerem figuras de pais, sempre me ensinaram os valores e princípios que me definem hoje. A minha avó, Benedita, mãe e porto seguro, que me inspira sempre a ser melhor. A meu avô José que partiu dessa vida, mas foi o melhor pai que eu poderia ter.

A vocês meu amor e eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

A minha família, meu alicerce e fortaleza. Aos meus avós, mãe, tias, tios e irmãos que sempre me apoiam e me incentivam.

Aos meus avós, Benedita e José, os quais tenho como mãe e pai, que sempre deram o seu melhor para educar a mim e meus irmãos. A minha avó e mãe Benedita, meu porto seguro e minha referência. Ao meu avô e pai José que infelizmente partiu de nossas vidas esse ano, mas onde quer que esteja, com certeza está orgulhoso.

Às minhas tias Rosely e Rejane, que se tornaram mães e amigas, confiando e me motivando sempre a ser alguém melhor, contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional. A minha mãe Rosilene e irmãos, Kaio e Pablo pelo carinho e respeito. Ao Kaio pela confiança e amizade.

A Ana Carla, pelo lugar que construiu em minha vida. Por seu companheirismo, amizade, carinho e paciência e por ter feito parte dessa caminhada sempre ao meu lado. Ao incentivo e apoio diário para nunca desistir.

Ao meu orientador, Cecílio Caldeira, pela oportunidade concedida para poder desenvolver um trabalho tão importante e a cada dia poder aprender mais como pessoa e profissional. Pela confiança e responsabilidades que me fizeram e fazem amadurecer cada dia mais!

Aos meus coordenadores da Pós-Graduação, Tasso Guimarães e Markus Gastauer pela amizade. Ao Tasso Guimarães pelas responsabilidades a mim confiadas e conselhos que contribuíram para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

A Cinthia Abranches e Manoel Lopes, por terem me auxiliado com as atividades do laboratório, pelas conversas, companhias e principalmente, pela amizade que construímos.

A Nisa Gonçalves e Eddie Saraiva pelo apoio constante na biblioteca quando precisei e pela amizade que construímos.

Aos amigos que o ITV DS me proporcionou e que fizeram dos meus dias, dias de alegrias e muito aprendizado (aos que sabem que são verdadeiramente especiais, sintam seus nomes descritos aqui).

Ao ITV DS pela oportunidade, aprendizado e vivência!

RESUMO

As Serras de Carajás abrigam elevado número de espécies endêmicas. Dentre elas, duas pertencentes ao gênero *Isoetes* L. (*Isoetes serracarajensis* e *Isoetes cangae*) foram recentemente descritas. Considerada uma espécie vulnerável, populações de *I. serracarajensis* podem ser encontradas em lagos temporários da Serra Norte e Serra Sul. Porém, *I. cangae* foi descrita com uma única população ocorrendo apenas em um lago permanente, conhecido popularmente como lago do Amendoim e localizado no corpo de canga da Serra Sul, próximo à frente de lavra do Projeto de Ferro S11D. Recentemente, esta espécie foi listada como criticamente ameaçada segundo os critérios da IUCN. Ambas as espécies são objetos de estudo por requererem ações de conservação. Portanto, o presente trabalho, organizado sob a forma de dois Relatórios Técnicos, objetivou examinar as formas de reprodução de ambas as espécies e avaliar o crescimento de *I. cangae* em substratos oriundos dos lagos dos campos ruprestres de Carajás. Para tal, plantas de *I. serracarajensis* e *I. cangae* foram coletadas das áreas de ocorrência e cultivadas no ITV DS. Esporângios foram coletados da base foliar de cada espécie, esterilizados e posteriormente micrósporos e megásporos foram inoculados em água destilada. Foi observado que *I. cangae* se reproduz de forma sexuada (fecundação), ainda que não tenha sido evidenciada diferença significativa entre autofecundação e fecundação cruzada. Além disso, foi observada uma taxa de apenas 2% de megásporos de *I. cangae* que se reproduziram via apogamia. Enquanto isso, a reprodução de *I. serracarajensis* ocorreu através da produção de perfilhos que apresentaram alta taxa de sobrevivência quando cultivados separados da planta mãe. As diferentes estratégias de propagação podem advir de adaptações aos habitats de ambas as espécies. Para avaliar o crescimento de *I. cangae* em diferentes substratos, esporófitos foram cultivados por nove meses em sedimentos provenientes dos lagos de Carajás (TI3 e N6), bem como substrato orgânico comercial (Jiffy-7®). Todas as plantas cresceram e completaram o ciclo reprodutivo, marcado pelo desenvolvimento de esporângios na base das folhas mais externas. Segundo análises de fluorescência da clorofila 'a', todas as plantas de *I. cangae* apresentaram valores que apontam para boa eficiência quântica, sem sinais de estresses. Valores mais altos foram observados para estas plantas cultivadas nos substratos oriundos dos lagos de Carajás. No entanto, os melhores resultados de crescimento e produção de estruturas reprodutivas foram obtidos em plantas cultivadas no substrato do lago temporário de N6. Estes resultados reforçam o potencial de *I. cangae* poder se adaptar a outros ambientes além do lago Amendoim. No entanto, como este estudo foi realizado com plantas submersas, ensaios de tolerância a redução do nível de água são ainda necessários.

Palavras-chave: FLONA de Carajás. Canga. Licófitas da Amazônia.

ABSTRACT

The Carajás Mountains are home to a high number of endemic species. Among them, two belonging to the genus *Isoetes* L. (*Isoetes serracarajensis* and *Isoetes cangae*) were recently described. Considered a vulnerable species, populations of *I. serracarajensis* can be found in temporary lakes in Serra Norte and Serra Sul. However, *I. cangae* was described with a single population occurring only in a permanent lake, popularly known as Amendoim lake and located in the sarong body from Serra Sul, near the mining front of the S11D Iron Project. This species has recently been listed as critically endangered according to IUCN criteria. Both species are objects of study for requiring conservation actions. Therefore, the present work, organized in the form of two Technical Reports, aimed to examine the forms of reproduction of both species and to evaluate the growth of *I. cangae* in substrates from the lakes of the Carajás rock fields. For that, plants of *I. serracarajensis* and *I. cangae* were collected from the areas of occurrence and cultivated in the ITV DS. Sporangia were collected from the leaf base of each species, sterilized and subsequently microspores and megaspores were inoculated in distilled water. It was observed that *I. cangae* reproduces sexually (fertilization), although there was no significant difference between self-fertilization and cross-fertilization. In addition, a rate of only 2% of *I. cangae* megaspores that reproduced via apogamy was observed. Meanwhile, the reproduction of *I. serracarajensis* occurred through the production of tillers that showed a high survival rate when cultivated separately from the mother plant. The different propagation strategies can come from adaptations to the habitats of both species. To evaluate the growth of *I. cangae* in different substrates, sporophytes were cultivated for nine months in sediments from the lakes of Carajás (T13 and N6), as well as commercial organic substrate (Jiffy-7®). All plants grew and completed the reproductive cycle, marked by the development of sporangia at the base of the outermost leaves. According to fluorescence analyzes of chlorophyll 'a', all plants of *I. cangae* showed values that point to good quantum efficiency, with no signs of stress. Higher values were observed for these plants grown on substrates from the lakes of Carajás. However, the best results of growth and production of reproductive structures were obtained in plants grown on the substrate of the temporary N6 lake. These results reinforce the potential of *I. cangae* to be able to adapt to environments other than Lake Peanut. However, as this study was carried out with submerged plants, tolerance tests to reduce the water level are still necessary.

Keywords: Carajás FLONA. Canga. Lycophytes from the Amazon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Limitação da Floresta Nacional de Carajás (em cinza), com destaque para as Serras Norte e Sul. Em verde destaca-se o Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, com integração da Serra do Tarzan e Serra da Bocaina; em preto destacam-se as áreas remanescentes de canga e em vermelho as áreas suprimidas de canga.....**13**

Figura 2 – A) Limitação da Floresta Nacional de Carajás, com destaque para o B) lago N6 presente na Serra Norte, o C) complexo de lagos Três Irmãs (Serra Sul, S11A), e D) lago Amendoim (Serra Sul, S11B) na Serra Sul.....**15**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AM – Lago Amendoim do corpo de canga S11D

FLONA de Carajás – Floresta Nacional de Carajás

ITV DS – Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável

N6 – Lago Temporário da Região Norte N6

RT – Relatório Técnico

TI3 – Lago do Complexo Três Irmãs 3 no corpo de canga S11A

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	FLORESTA NACIONAL DE CARAJÁS.....	11
2.1.1	Lagos perenes e temporários.....	13
2.2	O GÊNERO <i>ISOETES</i>	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1	MATERIAL VEGETAL PARA REPRODUÇÃO E PROPAGAÇÃO.....	17
3.2	AVALIAÇÃO E CRESCIMENTO DE <i>ISOETES CANGAE</i>	18
4	RESULTADOS.....	18
5	CONCLUSÃO.....	19
	REFERÊNCIAS.....	20
	APÊNDICE.....	24
	APÊNDICE A - RELATÓRIO I - ESTRATÉGIAS DE REPRODUÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE ISOETES ENDÊMICAS DOS CAMPOS RUPESTRES DA AMAZÔNIA ORIENTAL.....	25
	APÊNDICE B - RELATÓRIO II - CRESCIMENTO DE <i>ISOETES CANGAE</i> EM SUBSTRATOS ORIUNDOS DE LAGOS DE CARAJAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

Duas espécies do gênero *Isoetes* L. foram descritas como endêmicas das Serras de Carajás: *Isoete serracarajensis* J.B.S. Pereira, Salino & Stutzel e *Isoetes cangae* J.B.S. Pereira, Salino & Stutzel. *Isoetes serracarajensis* pode ser encontrada em lagos e lagoas sazonais, ambientes terrestres com solos úmidos ou alagados nas Serras de Carajás (Serras Sul, Serra Norte, Serra do Tarzan e Serra da Bocaina) (PEREIRA; ARRUDA; SALINO, 2017). Porém, apenas uma única população, totalmente submersa de *I. cangae* foi encontrada no lago Amendoim localizado na Serra Sul (PEREIRA *et al.*, 2016). Devido as alterações que têm ocorrido no ciclo hidroclimático da bacia hidrográfica do rio Itacaiúnas (na qual está inserida as Serras de Carajás) por conversão da floresta em pastagens (SOUZA-FILHO *et al.*, 2016) e a expansão de atividades de mineração na região podem levar a deterioração da qualidade dos habitats destas espécies (PEREIRA *et al.*, 2016), sendo importante o desenvolvimento de estratégias para conservação. Além disso, atualmente *I. cangae* encontra-se listada como criticamente ameaçada (LANSDOWN, 2019), fato este que proporciona maior atenção para pesquisas que possam contribuir com iniciativas de conservação da espécie. Estudos que envolvem o crescimento e a biologia reprodutiva de espécies de *Isoetes* L., por exemplo, são importantes por fornecerem informações sobre a propagação e subsidiar estratégias de conservação *ex situ* (CALDEIRA, 2019; OH *et al.*, 2013, ABELI *et al.*, 2017).

A adaptação a novos ambientes pode ser uma alternativa para ampliar a ocorrência de *I. cangae* e reduzir o risco de perda da espécie. A reprodução de espécies de *Isoetes* L. pode ocorrer via sexuada, apogamia e reprodução assexuada ou vegetativa, e estudos iniciais apontaram que *I. cangae* consegue se propagar por via sexuada, apesar de que este fato ainda não foi descrito para *I. serracarajensis* (OH *et al.*, 2013; KARRFALT, 1999; TAYLOR; LUEBKE, 1986; CALDEIRA *et al.*, 2019). Estes resultados iniciais são importantes, pois o conhecimento sobre as formas de reprodução é de grande relevância para estudos de propagação, conseqüentemente estratégias de conservação, uma vez que contribuem para a manutenção da diversidade genética das espécies.

Estudos de propagação e desenvolvimento de espécies do gênero *Isoetes* L., têm sido realizados, a exemplo de pesquisas que envolvem *I. cangae*, desenvolvidos no Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável – ITV DS, como o

desenvolvimento de protocolos de propagação e cultivo de *I. cangae* em condições controladas (CALDEIRA *et al.*, 2019) e a caracterização morfológica, fisiológica e genética da espécie (NUNES *et al.*, 2018). Além disso, foram realizados estudos de caracterização geoquímica e limnológica dos sedimentos dos lagos das cangas das Serras de Carajás (SAHOO *et al.*, 2017; SAHOO *et al.*, 2016), fornecendo informações importantes sobre a similaridade entre os lagos e possível viabilidade de colonização por *Isoetes* L.

Portanto, esse estudo busca gerar informações que possam subsidiar estratégias para a conservação das espécies de *Isoetes* L. que ocorrem em Carajás. Dessa maneira, os objetivos são: i) determinar as formas de propagação das duas espécies endêmicas das Serras de Carajás (*I. cangae* e *I. serracarajensis*) e ii) avaliar o crescimento e desenvolvimento de *I. cangae* em substratos provenientes de lagos das cangas das Serras de Carajás. Os resultados estão apresentados em dois Relatórios Técnicos (RT) que compõem essa dissertação, conforme disposto no Regulamento Interno do Programa de Pós-Graduação em Uso Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Tropicais do ITV DS. O primeiro RT foi intitulado de “Estratégias de Reprodução de duas espécies de *Isoetes* endêmicas dos campos rupestres da Amazônia Oriental” e o segundo intitulado de “Crescimento de *Isoetes cangae* em substratos oriundos de Lagos de Carajás”, ambos disponíveis nos Apêndices.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FLORESTA NACIONAL DE CARAJÁS

O Brasil possui a maior cobertura de florestas tropicais do mundo concentrada na região amazônica. Por sua extensão territorial, variedade geográfica e climática, abriga uma enorme diversidade biológica, tornando o principal país entre os detentores de megadiversidade biológica, possuindo de 15 a 20% dos 1,5 milhão de espécies descritas do planeta (SILVA, 2018). Localizada no sudeste do Pará, na Amazônia, a Floresta Nacional de Carajás (FLONA de Carajás) (Figura 1), é uma importante unidade de conservação federal brasileira que foi criada em 1988 abrangendo parte dos municípios de Parauapebas, Canaã dos Carajás e Água Azul do Norte. A região da FLONA de Carajás é reconhecida por conter espécies animais e vegetais raras e/ou restritas à região (CAMPOS; CASTILHO, 2012). O conhecimento da flora presente nessa região, de forma sistematizada por especialistas, contribui

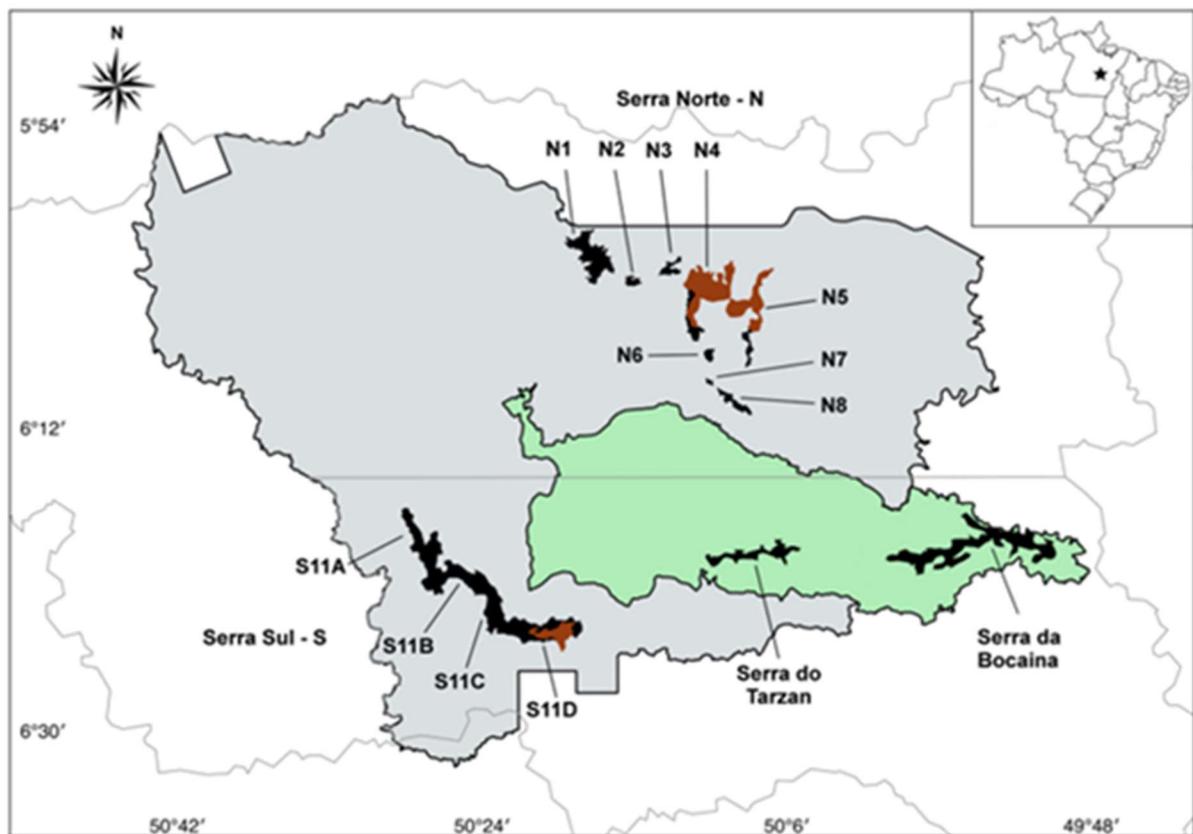
para o preenchimento de lacunas do conhecimento botânico, além de ser fundamental para subsidiar estudos em diversas abordagens, seja de espécies ameaçadas, raras, endêmicas, seja para a utilização de espécies nativas em recuperação de áreas degradadas ou mesmo para determinação de áreas de conservação (ICMBIO, 2017).

Com área de 411.949 ha, a FLONA de Carajás possibilitou o estreitamento da relação entre produção mineral e proteção ambiental (MARTINS *et al.*, 2012). As Serras de Carajás, quase todas inseridas na FLONA de Carajás, têm uma paisagem de terras predominantemente baixas e juntamente com outras áreas protegidas compõe o chamado “Mosaico de Carajás” com 1.207.000 hectares. As elevações das Serras de Carajás, evidenciam-se descontinuamente na direção Leste-Oeste a uma altitude de 700 m, e os dois grandes conjuntos onde localizam-se as principais jazidas de minério de ferro no interior da FLONA de Carajás são conhecidos como Serra Norte e Serra Sul (Figura 1) (PILÓ; AULER, 2015). Em termos de cobertura vegetal, mais de 95% da FLONA de Carajás é coberta por florestas, sejam ombrófilas ou estacionais, enquanto que dos 5% restantes, cerca de metade é formada por vegetação herbácea ou arbustiva que ocorre sobre a canga em áreas isoladas nas partes mais altas dos trechos Norte e Sul, representando uma peculiaridade da região (CAMPOS; CASTILHO, 2012).

Na FLONA de Carajás, encontram-se os campos rupestres ferruginosos (ou cangas) que apresentam altas temperaturas, radiação, estação seca bem definida e elevados teores de metais nos solos. As cangas (Figura 1), são áreas montanhosas antigas da Amazônia, com origem no pré-Cretáceo, quando eventos supergênicos do Sul do Pará deram origem às expressivas coberturas lateríticas da região (AB’SABER, 1986; VIANA *et al.*, 2016). Atualmente, os blocos de cangas são como ilhas de vegetação, isoladas por uma matriz florestal e sobre substrato peculiar onde o isolamento geográfico pode ter promovido processos de especiação e, conseqüentemente, endemismo (MOTA *et al.*, 2018). As cangas de Carajás, abrigam um rico mosaico de fitofisionomias que incluem vegetação rupícola, associada a rochas expostas; campos gramíneos e savanas que ocorrem onde o substrato rochoso está mais fragmentado; vegetação higrófila, associada a riachos e lagoas perenes ou sazonais; e os capões de floresta decídua ou semi-decídua associados a áreas com maior acúmulo de matéria orgânica sobre o substrato ferruginoso (VIANA *et al.*, 2016). Essas formações representam cerca de 5% da área da FLONA de

Carajás e estão diretamente associadas às jazidas de ferro da região (STCP, 2016). As condições ambientais presentes nas cangas, normalmente estressantes para a grande maioria das espécies, requer adaptações específicas, levando a existência de elevado grau de endemismos (SKIRYCZ *et al.* 2014).

Figura 1 – Limitação da Floresta Nacional de Carajás (em cinza), com destaque para as Serras Norte e Sul. Em verde destaca-se o Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, com integração da Serra do Tarzan e Serra da Bocaina; em preto destacam-se as áreas remanescentes de canga e em vermelho as áreas suprimidas de canga.



Fonte: Mota *et al.*, 2018.

2.1.1 Lagos perenes e temporários

Na paisagem dos platôs das serras ferruginosas, destacam-se os lagos perenes e temporários que são alimentados, principalmente, pelas águas do escoamento superficial da água das chuvas. Os sedimentos e detritos trazidos pelo escoamento superficial impermeabilizam as depressões que são formadas pelo abatimento das concreções lateríticas (LOPES, 2008; MOTA *et al.*, 2015). Os lagos permanentes funcionam como ambientes de recarga para o sistema aquífero regional e nascentes (CAMPOS; CASTILHO, 2012). Enquanto isso os lagos temporários, com menor extensão e profundidade, abrigam muitas espécies raras e também devem ter

importância destacada nas estratégias de conservação (LOPES, 2008). Além disso, esses ambientes atuam como importantes fontes de água para a fauna da floresta circundante e permitem o estabelecimento de espécies da flora com diferentes níveis de exigências hídricas (LOPES, 2008; MOTA *et al.*, 2015).

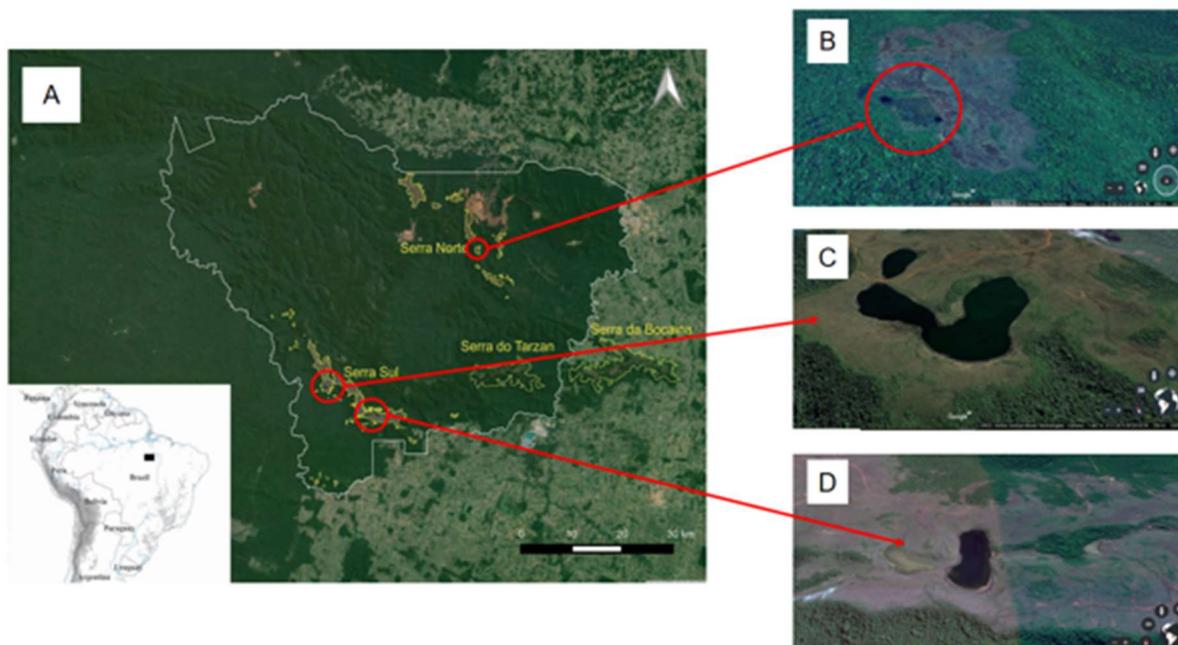
Dentre os lagos permanentes têm-se o complexo de lagos Três Irmãs (TI1, TI2 e TI3) (Figura 2C) no corpo de canga S11A e o lago Amendoim (Figura 2D) no corpo de canga S11D, ambos situados na Serra Sul. O lago TI1 encontra-se a uma altitude média de 706 m com profundidade média de 2,11 m, sendo classificado como muito raso, além de conter área superficial de 0,075 km²; o lago TI2 está a uma altitude de 698 m com uma profundidade média de 1,2 m, classificado como muito raso possui área superficial de 0,116 km²; e o lago TI3 situado a uma altitude de 695,3 m, profundidade média de 7,02 m caracterizado como o mais profundo, também é classificado como raso, além de ter uma área superficial de 0,252 km² (SAHOO *et. al.* 2017). Este lago é o que apresenta maior similaridade com o lago Amendoim.

Em relação aos parâmetros de qualidade da água, como pH, concentração de oxigênio dissolvido (OD), turbidez (NTU), teor de sólidos dissolvidos (TSD), teor de carbono orgânico total (TOC), bem como concentração de Ferro total (Fe_t) e Ferro dissolvido (Fe_d), tanto o lago Amendoim quanto TI3 apresentam características semelhantes (SAHOO *et al.*, 2017). Além disso, na estação chuvosa as médias de pH e temperatura no lago TI3 é de 4,99 e 27,55°C, respectivamente, enquanto que no lago do Amendoim esses valores chegam a pH 5,27 e temperatura de 27,82°C. Na estação seca essas médias de pH e temperatura no lago TI3 são de 4,83 e 26,7°C enquanto que no lago Amendoim é de 5,12 e 27,67°C, respectivamente. A turbidez média é de 1,94 em TI3 e 1,37 no lago Amendoim no período chuvoso, enquanto que no período seco a média é de 3,41 para TI3 e 0,94 para o Amendoim, sendo estes valores indicativos de baixa turbidez (SAHOO *et. al.*, 2017). Os sedimentos de ambos os lagos são enriquecidos com Fe₂O₃, P₂O₅ e Se. No lago Amendoim sugere-se que o sedimento seja proveniente de fontes orgânica advindas de palmeiras e macrófitas submersas, enquanto TI3 além de ter fontes orgânicas associadas à macrófitas, sugere-se que essas fontes possam estar associadas também à plantas terrestres e algas (SAHOO *et al.*, 2016; SAHOO *et al.*, 2017; SAHOO *et al.*, 2019).

Em um dos lagos temporários da Serra de Carajás foi encontrada uma população de *I. serracarajensis* com características vegetativas diferentes das demais

populações. Situado no corpo de canga N6 (Serra Norte) (Figura 2B), o lago abriga plantas de *I. serracarajensis* com folhas mais longas e que produzem uma maior quantidade de estruturas reprodutivas (NUNES *et al.*, 2018).

Figura 2 – A) Limitação da Floresta Nacional de Carajás, com destaque para o B) lago N6 presente na Serra Norte, o C) complexo de lagos Três Irmãs (Serra Sul, S11A), e D) lago Amendoim (Serra Sul, S11B) na Serra Sul.



Fonte: Pereira *et al.*, 2016 (Adaptado); Google Earth.

2.20 GÊNERO ISOETES

Estima-se que o gênero *Isoetes* L. contenha até 350 espécies distribuídas e aproximadamente 250 já estão descritas. Além de ser o único gênero pertencente à família *Isoetaceae*, esta é também a única da ordem *Isoetales* (PPG 1, 2016; HICKEY; MACLUF; TAYLOR, 2003). *Isoetes* L. é o único representante remanescente das licopsídias rizomórficas, antigo grupo monofilético dominante no período carbonífero, com posição singular para compreender a evolução das plantas (HETHERINGTON; BERRY; DOLAN, 2016). As espécies deste gênero podem ocorrer em lagos, lagoas, córregos, estuários, pântanos, solos terrestres ou parcialmente inundados, perpassando assim por *habitats* totalmente submersos, semi-aquáticos e terrestres distribuídos amplamente por quase todos os continentes (TAYLOR; HICKEY, 1992; TROIA *et al.*, 2016).

Muitas espécies de *Isoetes* L. são descritas como raras e ameaçadas de extinção, sendo altamente suscetíveis a perturbações em seus habitats, e sua maioria

possui faixas geográficas restritas, uma tendência que suscitou preocupação entre os conservacionistas (KIM *et al.*, 2008). A maioria dessas plantas conseguiram se adaptar a ambientes oligotróficos sendo capazes de prosperar com baixa disponibilidade de N, P e C, permitindo que vivam onde a maioria de outras espécies são incapazes de sobreviver, condições estas que normalmente levam ao crescimento mais lento (SMOLDERS; LUCASSEN; ROELOFS, 2002).

Estudos demonstram a necessidade de conservação de espécies de *Isoetes* L., uma vez que, a degradação dos seus habitats têm sido a principal ameaça às suas populações, as quais têm sofrido significativas reduções (ARTS *et al.*, 1990; VRBA *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2005; KIM; NA; CHOI, 2008; BARNI *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2016; CALDEIRA *et al.*, 2019). A germinação de *Isoetes lacustris*, por exemplo, sofreu alteração em consequência da mudança de temperatura, com prolongação do tempo para germinação (CTVRTLÍKOVÁ *et al.*, 2014). A acidificação severa ocorrida no lago Plesné (República Tcheca) devido a poluição industrial do ar por um período de aproximadamente 30 anos no Norte e Oeste da Europa, afetou fortemente o crescimento e a dinâmica populacional de *Isoetes echinospora* Durieu. O alto teor de alumínio e a forte acidez foram as principais causas de danos à estas plantas (CTVRTLÍKOVÁ *et al.*, 2009). Na China e Taiwan, quatro espécies apresentam alto risco de extinção, *Isoetes hypsophila*, *Isoetes yunguiensis*, *Isoetes sinensis* e *Isoetes taiwanensis*, tendo atualmente suas populações ameaçadas como consequência de distúrbios causados por atividades humanas, como excesso de pastagem e construção de estradas, encolhimento dos corpos d'água, turismo, piscicultura e agricultura nessas regiões. Estas atividades levaram à redução e/ou perda de habitat, poluição e eutrofização da água aumentando os valores de pH, dióxido de carbono dissolvido e nitratos nas áreas de ocorrência dessas espécies (LIU *et al.*, 2005).

Considerada centro de diversidade taxonômica do gênero, a América do Sul, (HICKEY; MACLUF; TAYLOR, 2003), o país com destaque para 26 táxons descritos é o Brasil (TROIA *et al.*, 2016). Recentemente, foram descritas duas novas espécies de *Isoetes* L. com ocorrência restrita às cangas das Serras de Carajás, no sudeste do Pará, Amazônia Oriental. *Isoetes serracarajensis* é uma espécie aquática submersa que cresce em lagos e lagoas sazonais ou em ambientes terrestres com solos úmidos (PEREIRA; ARRUDA; SALINO, 2017), sendo encontrada em diferentes corpos de

canga da Serra Norte, Serra Sul, Serra do Tarzan e Serra da Bocaina (PEREIRA *et al.*, 2016). Por outro lado, uma única população da espécie *I. cangae* foi detectada totalmente submersa em um lago permanente e (ultra) oligotrófico, lago Amendoim, (PEREIRA *et al.*, 2016). Esta espécie se encontra a cerca de 700 m acima do nível do mar, no corpo de canga da Serra Sul de Carajás (S11D) (SAHOO *et al.*, 2016), área que também abriga a mina do Projeto Ferro Carajás S11D. Tendo em vista as alterações que vêm ocorrendo no ciclo hidroclimático da bacia hidrográfica do rio Itacaiúnas (na qual está inserida as Serras de Carajás) pela conversão da floresta em pastagens (SOUZA-FILHO *et al.*, 2016), além da expansão de atividades de mineração na região, pode-se levar a deterioração da qualidade dos habitats destas espécies (PEREIRA *et al.*, 2016) exigindo o desenvolvimento de estratégias para conservação, sobretudo, que *I. cangae*, atualmente encontra-se listada como criticamente ameaçada (LANSDOWN, 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL PARA REPRODUÇÃO E PROPAGAÇÃO DE *ISOETES* L. ENDÊMICAS DE CARAJÁS

Plantas de *I. serracarajensis* e *I. cangae* foram coletadas em seus locais de ocorrência, lagos sazonais e perenes, respectivamente, nas cangas das Serras de Carajás. Além disso, amostras de sedimentos dos lagos foram coletadas para análise física e química. O material foi levado para o Laboratório de Cultivo de Plantas do ITV DS em Belém/Pa. Estas foram cultivadas em ambiente controlado até que atingissem a fase adulta quando iniciou a coleta de material reprodutivo. Para obtenção dessas estruturas foi adotada a metodologia proposta por Caldeira *et al.* (2019). Utilizando uma pinça, removeu-se os esporângios localizados na base das folhas mais externas de plantas adultas. Estes foram tratados com solução de etanol a 70% durante 1 min, sendo posteriormente lavados com água destilada e esterilizados por 3 min com solução de NaClO a 1% contendo Tween-20 a 0,01% e em seguida lavados com água destilada estéril. Após este procedimento, os esporângios foram rompidos e mantidos em água destilada. Micrósporos e megásporos foram inoculados em água destilada e o material foi transferido para uma câmara de crescimento (Fitotron SGC 120, Weiss Technik, UK®) com fotoperíodo de 12:12h, e temperatura de 28:22°C para o ritmo dia:noite e densidade fotossintética do fluxo de fótons igual a 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Periodicamente, foi realizada a contagem e remoção de esporos germinados do meio.

Além disso, para verificar a propagação via assexuada, esporófitos de ambas as plantas foram cultivados por 12 meses em condições controladas.

3.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *ISOETES CANGAE*

Para compor o segundo estudo referente a avaliação do crescimento de *I. cangae* em diferentes substratos, os materiais para propagação foram obtidos de plantas adultas de *I. cangae* coletadas no lago Amendoim. Para regeneração de esporófitos foi realizada a fertilização *in vitro*, conforme descrito por Caldeira *et al.* (2019). Esporófitos com aproximadamente 1 cm foram transferidos para recipientes com volume de 2 dm³, contendo 200 mL de cada um dos três substratos a serem avaliados: i) T13, proveniente do lago permanente pertencente ao complexo de lagos Três Irmãs (Serra Sul de Carajás); ii) N6, proveniente do lago temporário do corpo de canga N6 (Serra Norte) e; iii) substrato orgânico comercial utilizado Jiffy-7[®], como tratamento controle. As plantas foram transferidas para câmara de cultivo de plantas com as mesmas condições ambientais usadas durante a fertilização *in vitro*, para avaliação por um período de nove meses. Foram avaliados: i) o número de folhas produzidas por planta; ii) número de estruturas reprodutivas; iii) área foliar e radicular; iv) razão área raiz: folhas; e v) fluorescência da clorofila.

Os procedimentos encontram-se melhor descritos nos Apêndices sob forma de Relatórios Técnicos.

4 RESULTADOS

O acompanhamento no crescimento das duas espécies de *Isoetes* L. mostrou diferentes estratégias de reprodução dessas espécies estudadas. Enquanto *I. cangae* apresentou maior quantidade de esporófitos produzidos por via sexuada, sem diferenças significativas entre os tratamentos de autofecundação e fecundação cruzada, *I. serracarajensis* não produziu esporófitos por via sexuada, mas via propagação vegetativa.

Devido a classificação de *I. cangae* como espécie criticamente ameaçada, estudos de cultivo foram preferencialmente executados para esta espécie. Com objetivo de avaliar o potencial de crescimento em outros ambientes, ensaios em condições controladas mostram que plantas desta espécie conseguiram se adaptar em todos os substratos estudados. No entanto, os melhores resultados foram observados em plantas cultivadas nos sedimentos do lago N6, em que o número de

folhas, produção de esporângios, área foliar e radicular foram superiores aos encontrados em plantas cultivadas em substrato Jiffy-7[®] e T13. Ainda que as plantas cultivadas no tratamento N6 tenham desenvolvido maior área radicular, a relação razão área de raízes: folhas foi muito inferior, evidenciando que a maior alocação de carbono ocorre quando as plantas encontram-se em ambiente favorável, possibilitando o crescimento e produção. Quanto a avaliação da fluorescência, foi observado que as plantas cultivadas nos sedimentos dos lagos de Carajás apresentaram menor inibição ou dano no processo de transferência de elétrons do fotossistema II (PSII). O rendimento quântico dessas plantas sugere baixo nível de estresse ao ambiente a que estão submetidas, indicativo de boa capacidade de assimilação de carbono por essas plantas. Apesar de todas terem se adaptado bem e estarem saudáveis, as cultivadas nos sedimentos dos lagos N6 e T13 merecem destaque por terem apresentando melhores resultados, sugerindo maior capacidade para atividade fotossintética.

5 CONCLUSÃO

As espécies *I. cangae* e *I. serracarajensis* possuem diferentes formas de propagação. A primeira utiliza-se de fecundação por via sexuada, enquanto que *I. serracarajensis* foi observada a propagação vegetativa, por meio de perfilhos. Além disso, ambas as espécies apresentaram elevada taxa de esporófitos após serem fixados em substratos e mantidos em condições controladas.

Foi observado que, uma vez submersa, *I. cangae* possui grande capacidade de adaptação a diferentes ambientes, além de conseguir completar seu ciclo a espécie respondeu bem às condições submetidas.

Todos os resultados encontram-se melhor descritos nos Apêndices A e B, sob a forma de Relatórios Técnicos.

REFERÊNCIAS

- ABELI, T. *et al.* A gleam of hope for the critically endangered *Isoëtes malinverniana*: Use of small-scale translocations to guide conservation planning. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 28, n. 2, p. 501-505, 2017.
- AB'SÁBER, A. N. Geomorfologia da Região de Carajás. *In*: ALMEIDA Jr., J. M. G. (Org.). **Carajás**: desafio político, ecologia e desenvolvimento. São Paulo: Brasiliense, 1986. Cap. 5, p. 88-124
- ARTS, G. H. P. *et al.* Successional changes in the soft-water macrophyte vegetation of (sub) atlantic, sandy, lowland regions during this century. **Freshwater Biology**, v. 24, n. 2, p. 287-294, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1990.tb00709.x>
- BARNI, E. *et al.* *Isoëtes malinverniana* Ces. et De Not. 2010. **Revista Informatore Botanico Italiano**.
- CALDEIRA, C. F. *et al.* Sporeling regeneration and ex situ growth of *Isoëtes cangae* (*Isoetaceae*): Initial steps towards the conservation of a rare Amazonian quillwort. **Aquatic botany**, v. 152, p. 51-58, 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2018.10.001>.
- CAMPOS, J. C.; CASTILHO, A. F. Uma visão geográfica da região da Flona de Carajás. *In*: MARTINS, F. D. *et al.* (Org.) *Fauna da Floresta Nacional de Carajás*: estudos sobre vertebrados terrestres. São Paulo: Nitro Images, 2012. p.16-63.
- ČTVRTLÍKOVÁ, M. *et al.* Effects of aluminium toxicity and low pH on the early development of *Isoëtes echinospora*. **Preslia**, v. 81, n. 2, p. 135-149, 2009.
- ČTVRTLÍKOVÁ, M. *et al.* The effect of temperature on the phenology of germination of *Isoëtes lacustris*. **Preslia**, v. 86, n. 3, p. 279-292, 2014.
- HETHERINGTON, A. J.; BERRY, C. M.; DOLAN, L.. Networks of highly branched stigmarian rootlets developed on the first giant trees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 24, p. 6695-6700, 2016. DOI 10.1073/pnas.1514427113.
- HICKEY, R. J.; MACLUF, C.; TAYLOR, W. C. A re-evaluation of *Isoetes savatieri* Franchet in Argentina and Chile. **American Fern Journal**, v. 93, n. 3, p. 126-137, 2003. DOI [http://dx.doi.org/10.1640/0002-8444\(2003\)093\[0126:AROISF\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1640/0002-8444(2003)093[0126:AROISF]2.0.CO;2).
- INSTITUTO CHICO MENDES DE BIODIVERSIDADE (ICMBIO). Plano de pesquisa geossistemas ferruginosos da Floresta Nacional de Carajás: temas prioritários... / organizadora Liliane Bezerra; colaboradores André Afonso Ribeiro... [*et al.*]. Brasília: ICMBIO, 2017. 82 p.
- KARRFALT, E.. Some observations on the reproductive anatomy of *Isoetes andicola*. **American Fern Journal**, p. 198-203, 1999. DOI 10.2307/1547422.

KIM, C.; NA, H. R.; CHOI, H-K. Genetic diversity and population structure of endangered *Isoetes coreana* in South Korea based on RAPD analysis. **Aquatic Botany**, v. 89, n. 1, p. 43-49, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.02.004>

LANSDOWN, R. V. *Isoetes cangae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019:e.T136249847A136250011.DOI:10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T136249847A136250011.en.

LEE, H.-W., CHOUNG, H.-L., ROH, T.-H., KWON, Y.-H., KIM, C.H., HYUN, J.-O., CHANG, I.S., 2005. Categorization and Conservation of the Threatened Plant Species in Environmental Impact Assessment. Korea Environment Institute, Seoul (in Korean, with English abstract).

LIU, X.; WANG, J-Y; WANG, Q-F. Current status and conservation strategies for *Isoetes* in China: a case study for the conservation of threatened aquatic plants. **Oryx**, v. 39, n. 3, p. 335-338, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0030605305000712>.

LOPES, P.M. Efeitos dos fatores locais e espaciais na riqueza e composição de comunidades aquáticas e implicações para conservação (Serra dos Carajás, Pará). 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Ecologia) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MARTINS, F. D. *et al.* **Fauna da Floresta Nacional de Carajás: estudos sobre vertebrados terrestres**. São Paulo: Nitro Imagens, 2012. ISBN 978-62658-05-017. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/Carajas.pdf>. Acesso: 13 de setembro de 2019.

MOTA, N.F.O.; SILVA, L.V.C.; MARTINS, F.D.; VIANA, P.L. 2015. Vegetação sobre Sistemas Ferruginosos da Serra dos Carajás. *In*: Carmo, F.F. & Kamino, L.H.Y. (orgs.). Geossistemas Ferruginosos no Brasil. Instituto Prístino, Belo Horizonte. Pp. 289-315

MOTA, N. F. O. *et al.* Cangas da Amazônia: a vegetação única de Carajás evidenciada pela lista de fanerógamas. **Rodriguésia**, v. 69, n. 3, 2018.

NUNES, G. L *et al.* Quillworts from the Amazon: A multidisciplinary populational study on *Isoetes serracarajensis* and *Isoetes cangae*. **PloS one**, v. 13, n. 8, p. e0201417, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201417>.

OH, M. J. *et al.* High frequency sporophytes regeneration from the spore culture of the endangered aquatic fern *Isoetes coreana*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 06, p. 14, 2013.

PEREIRA, J. B. De S. *et al.* Two new species of *Isoetes* (*Isoetaceae*) from northern Brazil. **Phytotaxa**, v. 272, n. 2, p. 141-148, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.272.2.5>. Acesso em: 05/02/2019

PEREIRA, J. B.; ARRUDA, A. J.; SALINO, A. Flora of the cangas of Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Isoetaceae. **Rodriguésia**, v. 68, n. 3SPE, p. 853-857, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201768313>. Acesso em: 12/02/2019

PILÓ, L.B.; COELHO, A. & REINO, J.C.R. Geoespeleologia em rochas ferríferas: cenário atual e conservação. *In*: CARMO, F.F. e KAMINO, L.H.Y. (Orgs.). **Geossistemas Ferruginosos do Brasil**: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais. Belo Horizonte: 3i Editora, 2015. Cap. 4, p. 125-148.

PPG (Pteridophyte Phylogeny Group) I. A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 54, n. 6, p. 563-603, 2016. DOI <https://doi.org/10.1111/jse.12229>.

SAHOO, P. K. *et al.* Geochemistry of upland lacustrine sediments from Serra dos Carajás, Southeastern Amazon, Brazil: implications for catchment weathering, provenance, and sedimentary processes. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 72, p. 178-190, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2016.09.003>.

SAHOO, P. K. *et al.* Geochemical characterization of the largest upland lake of the Brazilian Amazonia: Impact of provenance and processes. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 80, p. 541-558, 2017. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2017.10.016>.

SAHOO, Prafulla Kumar *et al.* Statistical analysis of lake sediment geochemical data for understanding surface geological factors and processes: An example from Amazonian upland lakes, Brazil. **Catena**, v. 175, p. 47-62, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.catena.2018.12.003>

SILVA, R. B. C. Importância da biodiversidade. **em Biologia**, p. 19. *In*: MARTINS, M. B; e JARDIM, M. A. G. (Orgs.). **Reflexões em Biologia da Conservação**. Belém: Vol. 1, Museu Paraense Emílio Goeldi, 2018. 186 p.: il. Cap. 2, p. 19-25.

SOUZA-FILHO, P. W. M. *et al.* Four decades of land-cover, land-use and hydroclimatology changes in the Itacaiúnas River watershed, southeastern Amazon. **Journal of environmental management**, v. 167, p. 175-184, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.11.039>.

SKIRYCZ, A. *et al.* Canga biodiversity, a matter of mining. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 653, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00653>.

SMOLDERS, A. J. P.; LUCASSEN, E. C. H. E. T.; ROELOFS, J. G. M. The *isoetid* environment: biochemistry and threats. **Aquat. Bot.** v. 73, p. 325–350, 2002.

STCP. 2016. Plano de manejo da Floresta Nacional de Carajás. Vol. 1. Diagnóstico. Engenharia de Projetos Ltda., Curitiba. 190p.

TAYLOR, W. Carl; LUEBKE, Neil T. Germinating spores and growing sporelings of aquatic Isoetes. **American fern journal**, p. 21-24, 1986.

TAYLOR, W. Carl; HICKEY, R. J. Habitat, evolution, and speciation in *Isoetes*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 613-622, 1992. DOI: 10.2307/2399755.

TROIA, A.; PEREIRA, J. B.; KIM, C.; TAYLOR, W. C. The genus *Isoetes* (*Isoetaceae*): a provisional checklist of the accepted and unresolved taxa. **Phytotaxa**, v. 277, n. 2, p. 101-145, 2016.

VIANA, P. L. *et al.* Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: história, área de estudos e metodologia. **Rodriguésia**, v. 67, n. 5, 2016. DOI: 10.1590/2175-7860201667501.

VRBA, J. *et al.* Long-term studies (1871–2000) on acidification and recovery of lakes in the Bohemian Forest (central Europe). **Science of the Total Environment**, v. 310, n. 1-3, p. 73-85, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00624-1](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00624-1)

APÊNDICE

APÊNDICE A - Relatório Técnico I apresentado como componente da dissertação do Mestrado Profissional Uso Sustentável dos Recursos Naturais em Regiões Tropicais

PROD. TEC. ITV DS – N011/2020
DOI 10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2020.11.Aguiar

PRODUÇÃO TÉCNICA ITV DS

ESTRATÉGIAS DE REPRODUÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE ISOETES ENDÊMICAS DOS CAMPOS RUPESTRES DA AMAZÔNIA ORIENTAL

**Keyvilla da Costa Aguiar
Cinthia Bandeira Abranches
Silvio J. Ramos
Markus Gastauer
Cecilio Frois Caldeira**

**Belém / PA
Abril / 2020**

Título: Estratégias de reprodução de duas espécies de <i>Isoetes</i> L. endêmicas dos campos rupestres da Amazônia Oriental	
PROD. TEC. ITV DS N011 / 2020	Revisão
Classificação: () Confidencial () Restrita () Uso Interno (X) Pública	00

Informações Confidenciais - Informações estratégicas para o Instituto e sua Mantenedora. Seu manuseio é restrito a usuários previamente autorizados pelo Gestor da Informação.

Informações Restritas - Informação cujo conhecimento, manuseio e controle de acesso devem estar limitados a um grupo restrito de empregados que necessitam utilizá-la para exercer suas atividades profissionais.

Informações de Uso Interno - São informações destinadas à utilização interna por empregados e prestadores de serviço

Informações Públicas - Informações que podem ser distribuídas ao público externo, o que, usualmente, é feito através dos canais corporativos apropriados.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A282 Aguiar, Keyvilla da Costa.
Estratégias de reprodução de duas espécies de *Isoetes* endêmicas dos campos rupestres da Amazônia Oriental. / Keyvilla da Costa Aguiar, Cinthia Bandeira Abranches, Silvio Junio Ramos, Markus Gastauer, Cecilio Frois Caldeira - Belém: ITV, 2020.
25 p. : il.

Relatório Técnico (Instituto Tecnológico Vale) – 2020
PROD.TEC.ITV.DS.N011/2020
DOI 10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2020.11.Aguiar

1. Propagação. 2. Plantas aquáticas - Amazônia. 3. Licófitas. I. Abranches, Cinthia Bandeira. II. Ramos, Silvio Junio. III. Gastauer, Markus. IV. Caldeira, Cecilio Frois. V. Título

CDD 23. ed. 622.752098115

RESUMO EXECUTIVO

Duas espécies do gênero *Isoetes* L. foram recentemente descritas como endêmicas de Carajás. *I. serracarajensis* pode ser encontrada em lagos temporários, com populações nas Serras Norte e Sul, é considerada espécie vulnerável; enquanto *I. cangae* possui uma única população submersa no lago Amendoim do corpo de canga S11D (Serra Sul) é descrita como criticamente ameaçada. Ambas as espécies apresentam desafios para conservação, sobretudo a população de *I. cangae* que está localizada próximo a frente de lavra do Projeto Ferro S11D. Estas espécies são objeto de estudos do “Projeto Resgate e Translocação de Licófitas nos Campos Rupestres Ferruginosos da Região Norte do Brasil” desenvolvido por instituições parceira como Vale S.A., ITVDS e UFRJ. Como uma das etapas iniciais do projeto e fundamental para o sucesso de propagação e preservação das espécies, este estudo objetivou examinar as formas de reprodução das duas espécies. Plantas *I. cangae* e *I. serracarajensis* foram coletadas em seus locais de ocorrência e cultivadas no ITV DS em Belém/PA. Esporângios das duas espécies foram coletados, esterilizados e os esporos masculinos (micrósporos) e femininos (megásporo) liberados e armazenados separadamente em água destilada. Foram examinadas três formas de reprodução por meio de esporos: autofecundação (megásporos e micrósporos de mesma planta), fecundação cruzada (esporos de plantas diferentes) e apogamia (somente megásporos). Além disso, foi avaliada a reprodução vegetativa por meio de perfilhamento de plantas que foram cultivadas em condições controladas. Os resultados sugerem que as duas espécies possuem formas de propagação distintas. Enquanto a reprodução de *I. cangae* é realizada por via sexuada (fecundação), em *I. serracarajensis* predomina a propagação vegetativa através da produção de perfilhos. As diferentes estratégias de propagação podem advir de adaptações aos habitats dessas duas espécies, onde a sazonalidade de lagos temporários requer que a espécie *I. serracarajensis* possua ciclos de vida curtos, enquanto *I. cangae* ocorre em lago permanente e com pouca sazonalidade de fatores ambientais, sobretudo água. A taxa de regeneração de esporófitos nesta espécie não apresentou diferenças entre autofecundação e fecundação cruzada, mas foi praticamente nula quando megásporos foram mantidos isolados de micrósporos. Apenas 2% dos megásporos em um, dos quatro ensaios realizados, produziram esporófitos. Por outro lado, uma maior emissão de perfilhos foram observados em esporófitos de *I. serracarajensis*, os quais produziram menor quantidade de esporângios. Uma elevada taxa de sobrevivência de jovens esporófitos foi observada para ambas as espécies após serem fixados em substrato e mantidos em condições controladas. Estes resultados sugerem as formas mais efetivas para a propagação e produção de esporófitos das duas espécies de *Isoetes* endêmicas de Carajás. Tais resultados permitem a obtenção de elevado número plantas das duas espécies em condições controladas, contribuindo posteriormente para estudos que objetivam o estabelecimento destas espécies em novos ambientes, além dos locais de ocorrência atual, reduzindo os riscos de perda líquida de espécies.

RESUMO

O gênero *Isoetes* L., embora ocorra em praticamente todos os continentes, suas espécies possuem populações com ocorrência bastante restrita e, portanto, muitas encontram-se ameaçadas de extinção. Recentemente, duas novas espécies de *Isoetes* L. foram descritas com ocorrência endêmica das Serras de Carajás: *I. serracarajensis* encontrada em lagos temporários das Serras Norte e Sul, enquanto *I. cangae* como uma única população submersa no lago Amendoim da Serra Sul, situado na frente de lavra do Projeto Ferro S11D. *I. serracarajensis* é considerada como espécie vulnerável e *I. cangae* criticamente ameaçada (CR), o que requer o desenvolvimento de estratégias que permitam conciliar a exploração mineral com a conservação, evitando a perda líquida de espécies. Este estudo objetivou examinar as formas de reprodução destas espécies e fornecer subsídios para a conservação das mesmas. Plantas das duas espécies foram coletadas em seus locais de ocorrência e cultivadas no ITV DS em Belém/PA. Esporângios das duas espécies foram coletados, esterilizados e os esporos masculinos (micrósporos) e femininos (megásporo) liberados e armazenados separadamente em água destilada. Foram examinadas três formas de reprodução por meio de esporos: autofecundação (megásporos e micrósporos de mesma planta), fecundação cruzada (esporos de plantas diferentes) e apogamia (somente megásporos). Além disso, foi avaliada também a reprodução vegetativa por meio de perfilhamento de plantas que foram cultivadas em condições controladas. Os resultados sugerem que as duas espécies possuem formas de propagação distintas. Enquanto a reprodução de *I. cangae* é realizada por via sexuada (fecundação), em *I. serracarajensis* predomina a propagação vegetativa através da produção de perfilhos. As diferentes estratégias de propagação podem advir de adaptações aos habitats das duas espécies, onde a sazonalidade de lagos temporários requer que a espécie *I. serracarajensis* possua ciclos de vida curtos, enquanto *I. cangae* ocorre em lago permanente e com pouca sazonalidade de fatores ambientais, sobretudo água. A taxa de regeneração de esporófitos nesta espécie não apresentou diferenças entre autofecundação e fecundação cruzada, mas foi praticamente nula quando megásporos foram mantidos isolados de micrósporos. Apenas 2% dos megásporos em um, dos quatro ensaios realizados, produziram esporófitos. Por outro lado, uma maior emissão de perfilhos foram observados em esporófitos de *I. serracarajensis*, os quais produziram uma menor quantidade de esporângios. Elevada taxa de sobrevivência de jovens esporófitos foi observada para ambas as espécies após serem fixados em substrato e mantidos em condições controladas. Estes resultados são fundamentais para o desenvolvimento de programas de conservação destas espécies, elucidando as etapas iniciais da propagação e obtenção de plantas. O ganho de conhecimento da biologia reprodutiva destas espécies permite aprimorar os meios de preservação das mesmas e auxilia para o aprimoramento de técnicas de restauração de diversas outras espécies do gênero que atualmente estão em risco de extinção.

Palavras-chave: Propagação. Plantas aquáticas. Licófitas.

ABSTRACT

The genus *Isoetes* L., the only remaining representative of rhizomorphic lycopsids, is of paramount importance to understand the evolution of plant kingdom. Recently, two new *Isoetes* species have been described as endemic of Serras de Carajás: *I. serracarajensis* found in temporary lakes of Serras Norte and Sul, while *I. cangae* was observed as a single population submerged in a lake of the Serra Sul. This study aimed to examine the reproductive biology (propagation) of these species. Plants of both species were collected and cultivated at ITV DS in Belém / PA. Sporangia of both species were collected, sterilized and male (microspores) and female (megaspore) spores were released and stored separately in distilled water. Three forms of reproduction of spores were examined from the spores: self-fertilization (mega-spores and microspores of the same plant), cross-fertilization (spores of different plants) and apogamy (only mega-spores). In addition, vegetative reproduction (tillering) was also evaluated from the plants grown under controlled conditions. Our results suggest that the two *Isoetes* species have different forms of propagation. While sporelings of *I. cangae* coming from fertilization (sexual propagation), in *I. serracarajensis* they come from vegetative propagation, i.e. by tillering at the base of the plant. The different propagation strategies may be a consequence of adaptations to the habitats of the two species, where the seasonality of temporary lakes requires that *I. serracarajensis* has short life cycles, whereas *I. cangae* occurs in a permanent lake with reduced environmental seasonality. The rate of sporophyte regeneration in this species showed no significant differences between self and cross-fertilization, but it was practically null when megaspores were kept isolated from microspores (apogamy). Only 2% of the megaspores in one, out of four tests, produced sporophytes. On the other hand, a higher emission of tillers was observed in sporophytes of *I. serracarajensis*, especially those producing a smaller number of sporangia. A high sporophytes survival was observed for both species after being fixed in substrate and kept under controlled conditions. These results are fundamental for the development of conservation programs for both species, elucidating the initial steps of propagation and, thereby production of high number of plants. The comprehension of the reproductive biology of these species improves the possibility of preservation and helps to improve the restoration techniques of several other isoetids species that are currently threatened.

Keywords: Propagation. Aquatic species. Lycophyte.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Limitação geográfica da Floresta Nacional de Carajás (FLONA de Carajás), com destaque para as Serras de Carajás: Norte, Sul, Tarzan e Bocaina, ambientes de campos rupestres ferruginosos e ocorrência das espécies <i>Isoetes serracarajensis</i> e <i>I. cangae</i>	09
Figura 2 - Esporófitos adultos de <i>Isoetes serracarajensis</i> (esquerda) e <i>Isoetes cangae</i> (direita) cultivados em condições controladas.....	10
Figura 3 - Etapas do processo de fertilização e desenvolvimento de esporófitos no gênero <i>Isoetes</i> L.. A abertura do megásporo expõe o arquegônio que será fertilizado por espermatozóide liberado de micrósporos. Com a fertilização, ocorre a formação do zigoto e desenvolvimento do esporófito. Conforme a espécie, o aparecimento de rizóides (na última ilustração) pode ocorrer tanto após a emissão da primeira folha quanto juntamente com a abertura do megásporo, precedendo a fertilização.....	11
Tabela 1 - Desenho experimental dos ensaios de propagação de <i>Isoetes serracarajensis</i> e <i>Isoetes cangae</i>	14
Figura 4 - Taxa de germinação de esporos de <i>Isoetes cangae</i> nos tratamentos apogamia (somente megásporos), fecundação cruzada (megásporos e micrósporos de mesma planta) e autofecundação (esporos de mesma planta)	16
Figura 5 - Regeneração de esporófitos de <i>Isoetes cangae</i> após adição de micrósporos ao meio contendo megásporos.....	17
Figura 6 - Emergência de perfilhos em plantas de <i>Isoetes serracarajensis</i> evidenciando a propagação vegetativa ou assexuada. (a) Desenvolvimento de perfilhos junto ao corno da planta mãe e que (b) se desprendem facilmente com o toque. (cde) Sequência de imagens ilustrando o aparecimento de esporófitos de <i>Isoetes serracarajensis</i> a partir de folhas mais velhas ou mais expostas. Destaque para a emissão de raízes na base foliar, logo abaixo do local onde normalmente se desenvolve esporângios e de onde aparecerão as próximas folhas.....	18
Figura 7 - Perfilhamento e taxa de sobrevivência de esporófitos de <i>Isoetes cangae</i> e <i>Isoetes serracarajensis</i>	19

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	08
1.1	OBJETIVOS.....	12
2	MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1	LOCAL DE OCORRÊNCIA E MATERIAL VEGETAL.....	13
2.2	MÉTODOS DE REPRODUÇÃO.....	14
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4	CONCLUSÃO	21
	REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

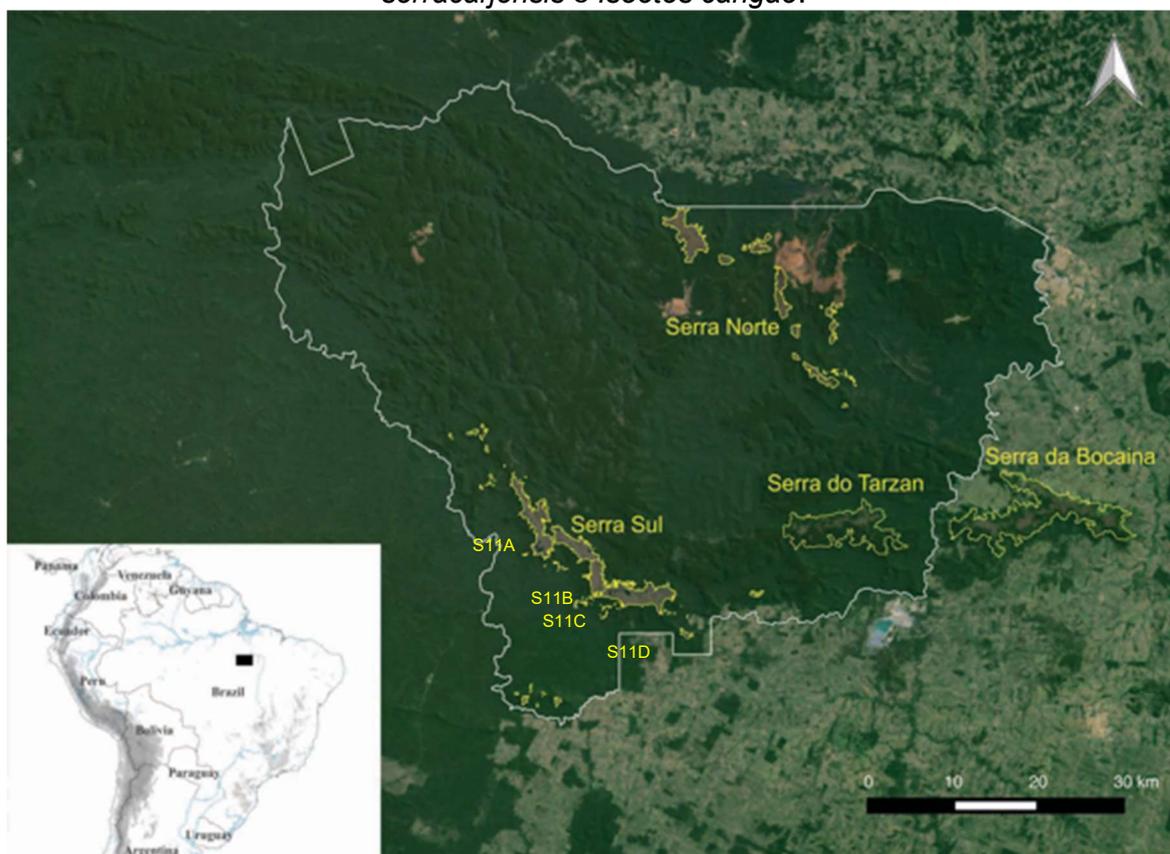
As Pteridófitas se dividem em duas classes: *Lycopodiopsida* (licófitas) e *Polypodiopsida* (samambaias). A primeira é constituída das ordens *Lycoposiales*, *Isoetales* e *Selaginellales*, onde *Isoetales* possui uma única família, *Isoetaceae*, a qual apresenta apenas um gênero, *Isoetes* L. (PPG I, 2016). Este gênero é o único representante remanescente das licopsídeas rizomórficas, um antigo grupo monofilético que ocupa uma posição singular de grande relevância para compreender a evolução das plantas. Esse grupo foi dominante nos ambientes do período carbonífero, formando assim, alguns dos mais extensos depósitos fósseis de plantas de qualquer período geológico (HETHERINGTON; BERRY; DOLAN, 2016).

O gênero *Isoetes* L. possui aproximadamente 250 espécies existentes descritas (TROIA *et al.*, 2016), mas a estimativa é de que seja representado por até 350 espécies (HICKEY; MACLUF; TAYLOR, 2003). Em sua maioria, são plantas que conseguiram se adaptar a ambientes oligotróficos em que outras espécies não conseguem se desenvolver, condições estas que levam ao crescimento a taxa lentas (SMOLDERS; LUCASSEN, ROELOFS, 2002). *Isoetes* L. são encontrados em lagos, lagoas, córregos, estuários, pântanos, solos terrestres ou parcialmente inundados (TAYLOR, HICKEY, 1992), ou seja, habitats totalmente submersos, semi-aquáticos e terrestres, distribuídos amplamente por quase todos os continentes (TROIA *et al.*, 2016). Apesar de sua ampla distribuição e uma vasta extensão do seu registro fóssil (TROIA *et al.*, 2016) estas plantas apresentam simplicidades morfológicas que resultam em grandes dificuldades de identificação das espécies (TAYLOR; RICKEY, 1992; NUNES *et al.*, 2018).

A América do Sul é considerada o centro de diversidade taxonômica do gênero (HICKEY; MACLUF; TAYLOR, 2003) com destaque para o Brasil que contém 26 táxons descritos (TROIA *et al.*, 2016). Recentemente, foram coletadas e descritas duas novas espécies de *Isoetes* L. endêmicas das Serras de Carajás (Figura 1), na Amazônia Oriental: *Isoetes serracarajensis* J.B.S. Pereira, Salino & Stutzel e *Isoetes cangae* J.B.S. Pereira, Salino & Stutzel. *Isoetes serracarajensis* (Figura 2), pode ser encontrada parcialmente submersa em lagos e lagoas sazonais ou em ambientes terrestres com solos úmidos ou alagados de quatro localidades em Carajás (Serra Sul, Serra Norte, Serra do Tarzan e Serra da Bocaina) (PEREIRA; ARRUDA; SALINO, 2017). Por outro lado, apenas uma única população de *I. cangae* (Figura 2) foi encontrada totalmente submersa em um lago permanente (ultra) oligotrófico, na Serra

Sul de Carajás, lago Amendoim (PEREIRA *et al.*, 2016). Segundo os critérios da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), *I. serracarajensis* é considerada uma espécie vulnerável (VU), enquanto *I. cangae* foi recentemente inserida na lista de espécies criticamente ameaçadas (CR) (LANSDOWN, 2019). Alterações no ciclo hidroclimático da bacia hidrográfica do rio Itacaiúnas (na qual está inserida as Serras de Carajás) por conversão da floresta em pastagens (SOUZA-FILHO *et al.*, 2016) e a expansão de atividades de mineração na região podem levar a deterioração da qualidade dos habitats destas espécies (PEREIRA *et al.*, 2016), o que requer desenvolvimento de estratégias de conservação.

Figura 1 - Limitação geográfica da Floresta Nacional de Carajás (FLONA de Carajás), com destaque para as Serras de Carajás: Norte, Sul (corpos de canga S11A, B, C e D), Tarzan e Bocaina, ambientes de campos rupestres ferruginosos e ocorrência das espécies *Isoetes serracarajensis* e *Isoetes cangae*.



Fonte: Pereira *et al.*, 2016.

Estudos que envolvem o crescimento e a biologia reprodutiva fornecem informações importantes sobre a propagação e a conservação *ex situ* de espécies ameaçadas, mas ainda são pouco estudados para o gênero *Isoetes* L. (CALDEIRA *et al.*, 2019). Juntamente com a identificação e descrição de ocorrência de espécies

ameaçadas de *Isoetes* L., estudos de propagação têm sido uma das primeiras etapas a serem executadas visando a conservação (CALDEIRA, 2019; OH *et al.*, 2013, ABELI *et al.*, 2017). A formação de esporófitos pode ocorrer através da reprodução sexuada, com a fusão do gameta masculino e feminino (OH *et al.*, 2013), apogamia e reprodução assexuada ou vegetativa (KARRFALT, 1999; TAYLOR; HICKEY; MACLUF, 1986).

Figura 2 - Esporófitos adultos de *Isoetes serracarajensis* (esquerda) e *Isoetes cangae* (direita) cultivados em condições controladas.

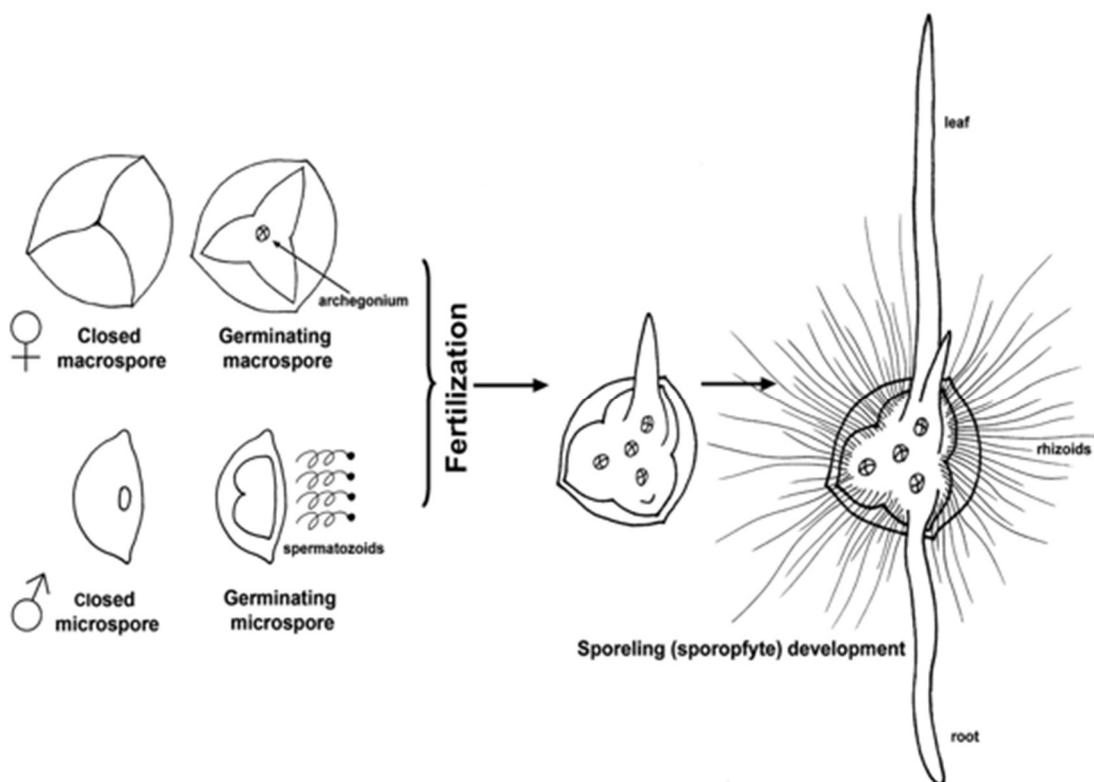


Fonte: Nunes *et al.*, 2018.

A reprodução sexuada ocorre a partir do desenvolvimento do megagametófito, seguido pela abertura do megásporo e exposição do arquegônio onde os espermatozoides oriundos de micrósporos efetuam a fertilização e, finalmente, a formação do esporófito (Figura 3). Este permanece ligado ao tecido de armazenamento do megásporo, e pode sustentar o desenvolvimento das primeiras

folhas e raízes e assegurar a sobrevivência do jovem esporófito por semanas a meses (ČTVRTLÍKOVÁ; ZNACHOR E VRBA, 2014; CALDEIRA *et al.*, 2019). Este processo tem sido observado em várias espécies de *Isoetes* L. e a fertilização pela mistura de megásporos e micrósporos amplamente utilizada na propagação e obtenção de esporófitos (OH *et al.*, 2013; ČTVRTLÍKOVÁ; ZNACHOR E VRBA, 2014; HUANG; CHANG; CHIOU, 2015; ABELI *et al.*, 2017; CALDEIRA *et al.*, 2019). A reprodução sexuada pode ocorrer por meio de autofecundação ou fecundação cruzada. Autofecundação tem sido normalmente observada em estudos de propagação com elevadas taxas de sucesso de reprodução (ABELI *et al.*, 2010, CALDEIRA *et al.*, 2019). Por outro lado, apesar de permitir maximizar a diversidade genética das plantas propagadas, a fecundação cruzada não tem sido avaliada na maioria dos estudos de propagação de *Isoetes* L..

Figura 3 - Etapas do processo de fertilização e desenvolvimento de esporófitos no gênero *Isoetes* L.. A abertura do megásporo expõe o arquegônio que será fertilizado por espermatozóide liberado de micrósporos. Com a fertilização, ocorre a formação do zigoto e desenvolvimento do esporófito. Conforme a espécie, o aparecimento de rizóides (na última ilustração) pode ocorrer tanto após a emissão da primeira folha quanto juntamente com a abertura do megásporo, precedendo a fertilização.



Fonte: Čtvrtlíková et al., 2014.

A apogamia, evento comumente observado na reprodução de várias espécies vegetais, a exemplo de *Dryopteris munchii*, uma samambaia homospórica (JARAMILLO, 2004), ainda é pouco descrita para o gênero *Isoetes* L., apesar de ser fundamental para a reprodução de *I. andicola* (KARRFALT, 1999). Nesta espécie, observa-se a formação de esporófitos a partir de megásporos que não foram fecundados. Este evento pode ser também confirmado através de ensaios de cultivo de megásporos sem adição de micrósporos ao meio.

A reprodução vegetativa é rara em espécies de *Isoetes* L., podendo ocorrer por dicotomias apicais seguidas de fragmentação ou por meio de gemas (HICKEY, 1986). Esse tipo de propagação (vegetativa ou assexuada) tem sido relatada para algumas espécies como *Isoetes savatieri* Franchet e *Isoetes chubutiana* Hickey, Macluf & W. C. Taylor, onde a reprodução acontece pelo surgimento de gemas corticais (HICKEY; MACLUF; TAYLOR, 2003), sendo comum o desenvolvimento destas a partir do corno da planta. Por outro lado, a propagação vegetativa tem sido amplamente utilizada para obtenção de clones, os quais apresentam diversas vantagens para a agricultura, sobretudo por preservar as características genéticas da planta mãe (HIGASHI *et al.*, 2000; XAVIER *et al.*, 2003). Em alguns casos esse tipo de propagação pode não ser tão favorável quando se pretende maximizar a diversidade genética da espécie.

Apesar de o estabelecimento de protocolos de propagação para *I. cangae* que mostram a geração de elevado número de esporófitos (CALDEIRA *et al.*, 2019), estes estudos evidenciaram a ocorrência de auto-fecundação, onde tanto a ocorrência de fecundação cruzada, apogamia ou propagação vegetativa não foram examinadas. Por outro lado, há uma carência de estudos de reprodução para a espécie *I. serracarajensis*.

1.1 OBJETIVOS

Determinar as formas de propagação das duas espécies de *Isoetes* endêmicas das Serras de Carajás (*I. cangae* e *I. serracarajensis*) e fornecer subsídios para a conservação destas espécies.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE OCORRÊNCIA E MATERIAL VEGETAL

Propágulos de ambas as espécies foram coletados nos corpos de canga das Serras de Carajás, região marcada por um complexo montanhoso com vasta riqueza de recursos minerais, relevo acidentado e presença de platôs com afloramento de rochas ferruginosas (SILVA, 2006). Estes afloramentos abrigam uma flora específica caracterizada por adaptações ao ambiente peculiar (alta radiação e temperatura, déficit hídrico sazonal pronunciado, metais no solo, etc.) e presença de espécies endêmicas (VIANA *et al.*, 2016), como as espécies pertencentes ao gênero *Isoetes* L..

Plantas de *I. serracarajensis* foram coletadas em lagos temporários dos corpos de canga da Serra Sul (S11B) e da Serra Norte (N6). Todas as plantas foram levadas para o Laboratório de Cultivo de Plantas do Instituto Tecnológico Vale - ITV DS em Belém/PA e cultivadas em condições controladas. As plantas foram cultivadas até alcançarem a fase adulta para obtenção de estruturas reprodutivas (esporângios masculinos e femininos). As estruturas reprodutivas de *I. cangae* foram obtidas de plantas adultas coletadas do lago Amendoim (corpo de canga S11D, Serra Sul de Carajás) e de plantas propagadas e cultivadas em condições controladas no ITV DS.

A obtenção de estruturas reprodutivas foi realizada conforme metodologia proposta por Caldeira *et al.* (2019). Folhas mais externas de plantas adultas, tanto de *I. serracarajensis* quanto de *I. cangae*, foram destacadas manualmente da base das plantas. Posteriormente, com a utilização de uma pinça efetuou-se a remoção dos esporângios masculinos (contendo micrósporos) e femininos (contendo megásporos). Estes foram tratados com uma solução de etanol a 70% durante 1 min, lavados com água destilada e esterilizados por 3 min com uma solução de NaClO a 1% contendo Tween-20 a 0,01%, finalizando com três lavagens com água destilada estéril. Em seguida, os esporângios foram rompidos com uma pinça e mantidos em água destilada.

2.2 MÉTODOS DE REPRODUÇÃO

Foram examinadas três formas de reprodução por meio de esporos (autofecundação, fecundação cruzada e apogamia) e avaliada a reprodução vegetativa por meio de perfilhamento. Micrósporos e megásporos provenientes da mesma planta foram usados para avaliar autofecundação. A fecundação cruzada, caracterizou-se pela utilização de esporos masculinos de uma planta e femininos de outra. Em ambos os casos, megásporos e micrósporos foram misturados e incubados em água destilada. Enquanto para apogamia foram mantidas somente as estruturas femininas incubadas em água destilada. O ensaio foi executado uma vez para *I. serracarajensis*, onde foram utilizadas estruturas reprodutivas de duas plantas e um total de 448 megásporos (Tabela 1). Enquanto que para *I. cangae*, foram realizados quatro ensaios com um total de sete plantas e 3870 megásporos.

Tabela 1 - Desenho experimental dos ensaios de propagação de *Isoetes serracarajensis* e *Isoetes cangae*.

Ensaio	Nº de Plantas	Nº de Repetições	Nº de Megásporos /repetição	Nº total de Megásporos
<i>Isoetes serracarajensis</i>	2	13	23 a 40	448
<i>Isoetes cangae</i> I	6	34	15 a 50	1280
<i>Isoetes cangae</i> II	2	12	40 a 50	540
<i>Isoetes cangae</i> III	3	21	50	1050
<i>Isoetes cangae</i> IV	2	12	50 a 100	1000

Fonte: Autores, 2020.

Em todos os ensaios, a adição de micrósporos foi realizada simultaneamente com megásporos, seguindo a metodologia proposta por Caldeira *et al.* (2019), ou seja, o equivalente a aproximadamente 2000 micrósporos para cada megásporo adicionado ao meio. Os ensaios foram conduzidos em tubos tipo Falcon com capacidade de 50 mL. Após inoculação dos micrósporos e homogeneização da solução, o material foi transferido para uma câmara de crescimento (Fitotron SGC 120, Weiss Technik, UK®) com fotoperíodo de 12:12h, e temperatura de 28:22°C para o ritmo dia:noite e

densidade fotossintética do fluxo de fótons igual a $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Periodicamente, foi realizada a contagem e remoção de esporos germinados do meio.

Com o intuito de verificar a propagação por via assexuada, 20 esporófitos de *I. serracarajensis* coletados em campo e mais de 2 mil esporófitos de *I. cangae* propagados em laboratório foram cultivados por 12 meses em condições controladas. Após esse período, as plantas foram removidas do substrato e avaliadas quanto a produção de rebentos/perfilhos. Os rebentos existentes foram destacados da planta mãe e replantados nas mesmas condições. A sobrevivência dos perfilhos foi avaliada três meses após o plantio.

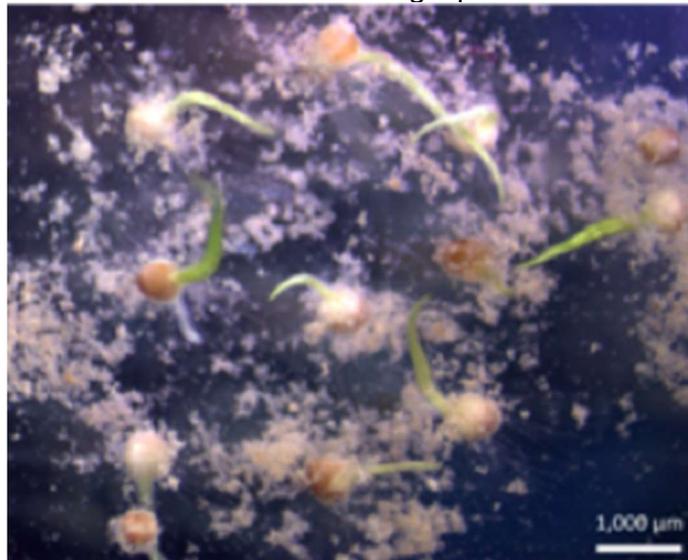
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos sugerem que as duas espécies de *Isoetes*, endêmicas de Carajás, possuem diferentes estratégias de reprodução. Enquanto em *I. cangae* uma elevada quantidade de esporófitos foi obtida por via sexuada (mistura de megásporos e micrósporos), em *I. serracarajensis* não foram obtidos esporófitos a partir de esporos, mas via propagação vegetativa. Em *I. cangae*, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos de autofecundação e fecundação cruzada. Porém, foi observada uma grande variação entre as repetições de cada tratamento (32 ± 34 e 25 ± 25 , média \pm desvio padrão para autofecundação e fecundação cruzada, respectivamente). Nestas, foram observadas taxas de germinação muito altas (maior que 70%), assim como repetições com germinação nula. Apesar de os valores para a taxa de germinação nestes ensaios serem inferiores aos obtidos em estudos anteriores para esta espécie (CALDEIRA *et al.*, 2019), estes são similares aos encontrados para *I. riparia* (KOTT; BRITTON, 1982) e superiores ao observado para várias espécies, tais como *I. echinospora*, *I. acadensis* (KOTT; BRITTON, 1982) e *I. coreana* (OH *et al.*, 2013). Neste último, mesmo a avaliação de diferentes meios de cultura e a adição de reguladores de crescimento não elevou a regeneração de esporófitos a valores próximos à média obtida neste estudo.

As repetições com germinação nula que foram observadas nos ensaios podem ter ocorrido devido à presença de esporos em diferentes estágios de maturação. Caldeira *et al.* (2019) mostraram que esporos jovens de *I. cangae*, ou de coloração clara, apresentaram germinação nula, enquanto esporos mais velhos (de coloração marrom) coletados de folhas mais externas das plantas apresentaram elevada germinação e produção de esporófitos. Assim, o presente estudo baseou-se na

Para verificar o requerimento do gameta masculino no processo de regeneração de esporófitos, lotes de megásporos que efetuaram a emissão de rizóides sem adição de micrósporos no meio foram separados e mantidos isolados por 15 dias. Após este período, em sub lotes onde houve a adição de micrósporos, a taxa de obtenção de esporófitos foi próximo a 100% (Figura 5), enquanto não foram obtidos esporófitos durante os 30 dias seguintes na ausência de micrósporos ao meio.

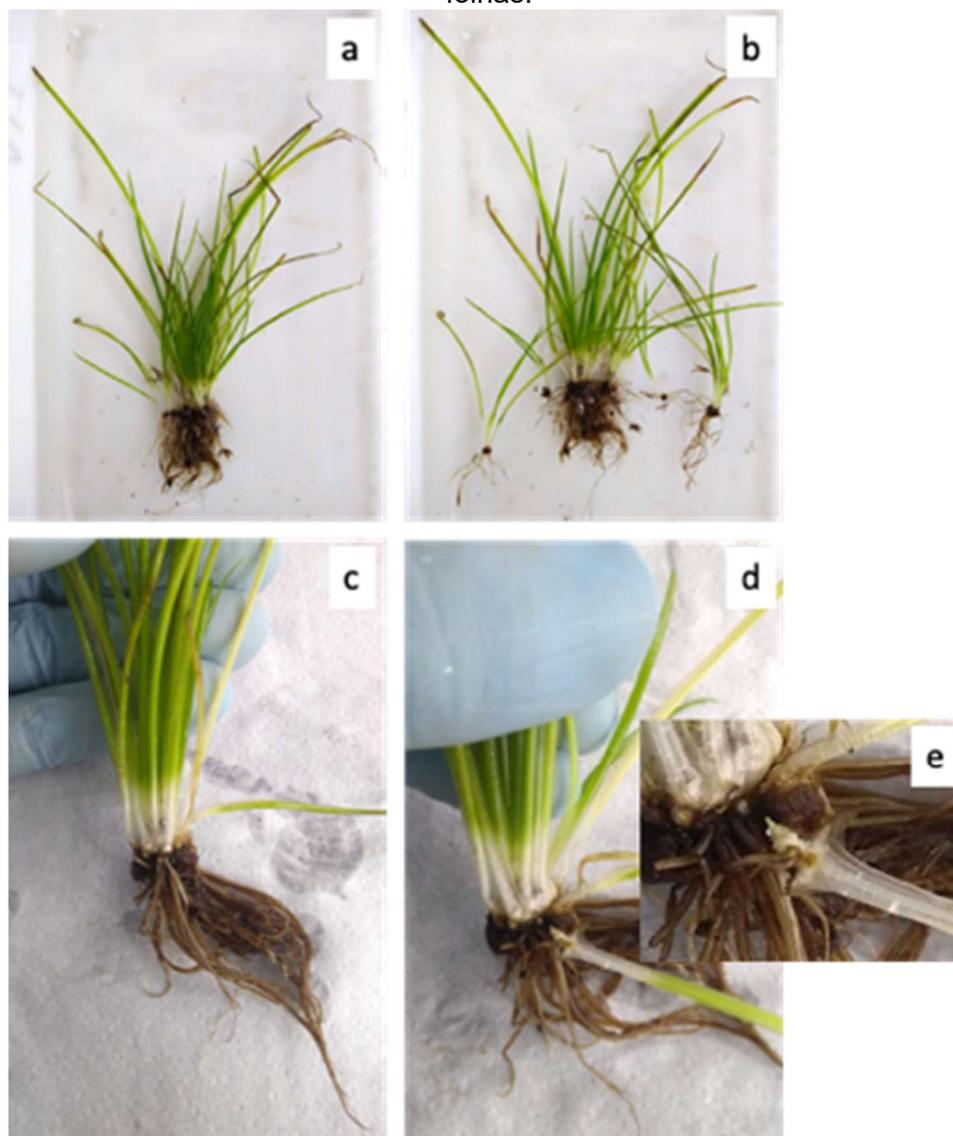
Figura 5 - Regeneração de esporófitos de *Isoetes cangae* após adição de micrósporos ao meio contendo megásporos.



Fonte: Autores, 2020.

Diferente do observado para *I. cangae*, nos ensaios realizados com *I. serracarajensis* não foi observada abertura do megásporo e nem aparecimento de rizóides. No entanto, plantas de *I. serracarajensis* ao serem cultivadas em laboratório produziram perfilhos, os quais apareceram junto ao corno da planta mãe (Figura 6). O aparecimento dos novos perfilhos foi observado tanto a partir de fragmentos do corno que se destacam facilmente ao serem tocados (Figura 6ab), quanto da base das folhas mais velhas ou externamente mais expostas (Figura 6cde). Em ambos os casos, os perfilhos originados apresentam estrutura radicular e folhas que se desenvolvem como órgãos independentes da planta mãe. Em perfilhos ainda jovens, ou com reduzido número de folhas, observa-se que a emissão de raízes ocorre a partir de fragmentos do corno que permanecem ligados à folha, enquanto novas folhas emergem da base foliar onde normalmente ocorre o desenvolvimento do esporângio (detalhe da Figura 6e). A manutenção de conexão com a planta mãe pode acelerar o crescimento dos jovens esporófitos através do fornecimento de nutrientes.

Figura 6 - Emergência de perfilhos em plantas de *Isoetes serracarajensis* evidenciando a propagação vegetativa ou assexuada. (a) Desenvolvimento de perfilhos junto ao corno da planta mãe e que (b) se desprendem facilmente com o toque. (cde) Sequência de imagens ilustrando o aparecimento de esporófitos de *Isoetes serracarajensis* a partir de folhas mais velhas ou mais expostas. Destaque para a emissão de raízes na base foliar, logo abaixo do local onde normalmente se desenvolve esporângios e de onde aparecerão as próximas folhas.



Fonte: Autores, 2020

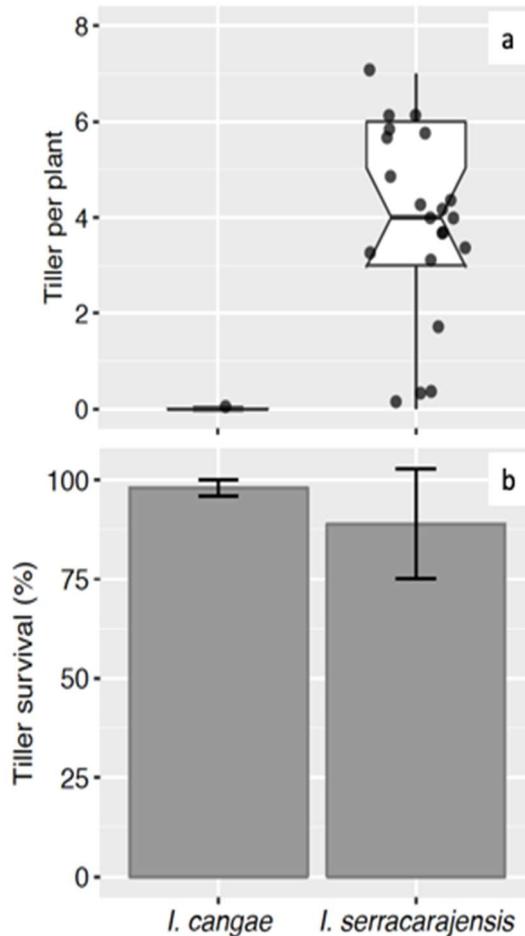
A ocorrência de propagação assexuada já foi descrita para algumas espécies de *Isoetes* L., como *I. andicola*, *Isoetes savatieri* Franchet e *Isoetes chubutiana* Kickey, Macluf & W. C. Taylor, bem como várias espécies das regiões sul e central dos Andes que conseguem se reproduzir através da produção de gemas corticais, além de também produzirem esporos (KARRFALT, 1999; HICKEY; MACLUF; TAYLOR, 2003). Uma vez que a propagação vegetativa de *Isoetes* L. está associada a produção de esporófitos mais robustos e que normalmente atingem a fase adulta em menor tempo

(GOMEZ, 1980; KARRFALT, 1999), a forma de reprodução observada em *I. serracarajensis* pode trazer vantagem adaptativa, sobretudo para esta espécie que possui como habitat os lagos temporários das cangas de Carajás, ou seja, ambientes que requerem ciclos mais curtos quando comparados ao local de ocorrência da espécie *I. cangae* (lago permanente Amendoim). No entanto, a capacidade de propagação sexuada ou via esporos de *I. serracarajensis* requer mais investigações, pois os resultados obtidos neste estudo advêm de um pequeno conjunto de esporos de dois espécimes. Além disso, é possível que esporos desta espécie possuam algum mecanismo de dormência e que necessitam um período seco para completar o desenvolvimento/maturação como uma estratégia de otimizar o tempo de germinação para ao início da estação chuvosa (enchimento dos lagos temporários) e assegurar os recursos necessários para completar o ciclo de crescimento e reprodução.

A reprodução vegetativa ou por meio de perfilhamento não foi observada em *I. cangae* (Figura 7a). Perfilhos desta espécie não foram obtidos mesmo após a propagação de mais de dois mil esporófitos em laboratório por via sexuada e o cultivo de centenas destas plantas por mais de dois anos, as quais atingiram a fase adulta e produziram esporângios. Por outro lado, após 6 meses de cultivo em condições controladas, plantas de *I. serracarajensis* produziram em média 4.5 ± 1.4 (média \pm desvio padrão) perfilhos por planta, enquanto algumas plantas tiveram até sete perfilhos, outras não emitiram (Figura 7a). O grupo de plantas que não produziu perfilhos (17% do total), apresentou quantidade de esporângios muito superior (média de 9 esporângios por planta) às plantas que perfilharam (média de 1 esporângio por planta). Finalmente, a grande maioria das plantas de *I. serracarajensis* que apresentou perfilhos não produziu esporângios (55%), estabelecendo uma relação negativa ($r = -0.69$; $p.value = 0.0005$) entre a emissão de perfilhos e produção de estruturas reprodutivas. Estes resultados mostram que *I. serracarajensis* possui habilidade de propagar com sucesso por via vegetativa. Apesar de não ter sido observada a produção de esporófitos por meio de fecundação ou apogamia, não se descarta esta forma de propagação em *I. serracarajensis*, pois ambas as formas de propagação podem ocorrer em uma mesma espécie no gênero, e.g. *I. andicola* (KARRFALT, 1999). No entanto, é possível que o maior vigor de crescimento e menor tempo para alcance da fase adulta pelos esporófitos advindos de perfilhamento favoreça a estas

plantas serem relativamente mais representativas para a manutenção de populações de espécies como *I. andicola* (KARRFALT, 1999) e *I. serracarajensis*.

Figura 7 - Perfilhamento e taxa de sobrevivência de esporófitos de *Isoetes cangae* e *Isoetes serracarajensis*.



Fonte: Autores, 2020.

Uma vez destacados da planta mãe e fixados em substrato de cultivo, a taxa de sobrevivência dos perfilhos de *I. serracarajensis* é de aproximadamente 90% após 3 meses de monitoramento (Figura 7b). Taxa de 100% de sobrevivência foi encontrada quando são obtidos perfilhos maiores, apresentando mais de uma folha. Taxas similares de sobrevivência de esporófitos foram também observadas para *I. cangae*, onde a perda de indivíduos em condições controladas (laboratório) foi inferiores a 2%.

4 CONCLUSÃO

As duas espécies de *Isoetes* L. endêmicas das Serras de Carajás possuem formas de propagação distintas. Enquanto a reprodução de *I. cangae* é realizada através de fecundação, i.e. por via sexuada, em *I. serracarajensis* predomina a propagação vegetativa através da produção de perfilhos.

As diferentes estratégias de propagação podem advir de adaptações aos habitats das duas espécies, onde a sazonalidade de lagos temporários requer que a espécie *I. serracarajensis* possua ciclos de vida curtos, enquanto *I. cangae* ocorre em lago permanente e com menor sazonalidade de fatores ambientais, sobretudo água. A taxa de regeneração de esporófitos nesta espécie não apresentou diferenças entre autofecundação e fecundação cruzada, mas foi praticamente nula quando megásporos foram mantidos isolados de micrósporos. Apenas 2% dos megásporos em um dos quatro ensaios realizados produziram esporófitos. Por outro lado, uma maior emissão de perfilhos foram observados em esporófitos de *I. serracarajensis* que produziram uma menor quantidade de esporângios.

Elevada taxa de sobrevivência de jovens esporófitos foi observada para ambas as espécies após serem fixados em substrato e mantidos em condições controladas. Estes resultados são fundamentais para o desenvolvimento de programas de conservação destas espécies, elucidando as etapas iniciais da propagação e obtenção de plantas. Ademais, o ganho de conhecimento da biologia reprodutiva destas espécies permite aprimorar os meios de preservação das mesmas, auxiliando no desenvolvimento de técnicas de restauração que poderão ser aplicadas em outras espécies do gênero também em risco de extinção.

REFERÊNCIAS

ABELI, Thomas; MUCCIARELLI, Marco. Notes on the Natural History and reproductive biology of *Isoëtes malinverniana*. **American Fern Journal**, v. 100, n. 4, p. 235-237, 2010. DOI [10.1640/0002-8444-100.4.235](https://doi.org/10.1640/0002-8444-100.4.235).

ABELI, Thomas *et al.* A gleam of hope for the critically endangered *Isoëtes malinverniana*: Use of small-scale translocations to guide conservation planning. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 28, n. 2, p. 501-505, 2017.

CALDEIRA, Cecílio Frois *et al.* Sporeling regeneration and ex situ growth of *Isoëtes cangae* (Isoetaceae): Initial steps towards the conservation of a rare Amazonian quillwort. **Aquatic botany**, v. 152, p. 51-58, 2019. DOI [10.1016/j.aquabot.2018.10.001](https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2018.10.001).

ČTVRTLÍKOVÁ, M. *et al.* The effect of temperature on the phenology of germination of *Isoëtes lacustris*. **Preslia**, v. 86, n. 3, p. 279-292, 2014.

GOMEZ, L. D. *et al.* Vegetative reproduction in a Central American Isoetes (Isoetaceae). Its morphological, systematic and taxonomical significance. **Brenesia**, 1980.

HETHERINGTON, Alexander J.; BERRY, Christopher M.; DOLAN, Liam. Networks of highly branched stigmarian rootlets developed on the first giant trees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 24, p. 6695-6700, 2016. DOI [10.1073/pnas.1514427113](https://doi.org/10.1073/pnas.1514427113).

HICKEY, R. James. The early evolutionary and morphological diversity of Isoetes, with descriptions of two new Neotropical species. **Systematic Botany**, p. 309-321, 1986. DOI [10.2307/2419121](https://doi.org/10.2307/2419121).

HICKEY, R. James; MACLUF, Cecelia; TAYLOR, W. Carl. A re-evaluation of *Isoetes savatieri* Franchet in Argentina and Chile. **American Fern Journal**, v. 93, n. 3, p. 126-136, 2003.

HIGASHI, Edison Namita; SILVEIRA, Ronaldo Luiz Vaz de Arruda; GONÇALVES, Antonio Natal. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. **Circular técnica IPEF**, v. 192, p. 1-11, 2000.

HUANG, Y-A; CHANG, Y-L.; CHIOU, W-L. Soil spore bank of *Isoetes taiwanensis* DeVol (Isoetaceae). **The International Journal of Plant Reproductive Biology**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2015. DOI [10.14787/ijprb.2015.7.1.1-7](https://doi.org/10.14787/ijprb.2015.7.1.1-7).

JARAMILLO, Irma Reyes; MENDOZA, Aniceto. Apogamia en *Dryopteris munchii* (Dryopteridaceae). **Polibotánica**, n. 18, p. 99-110. Distrito Federal, México. 2004. ISSN: 1405-2768.

KARRFALT, Eric. Some observations on the reproductive anatomy of *Isoetes andicola*. **American Fern Journal**, p. 198-203, 1999. DOI [10.2307/1547422](https://doi.org/10.2307/1547422).

KOTT, L. S.; BRITTON, D. M. A comparative study of spore germination of some Isoetes species of northeastern North America. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, n. 9, p. 1679-1687, 1982. DOI [10.1139/b82-218](https://doi.org/10.1139/b82-218).

LANSDOWN, R. V. *Isoetes cangae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019:e.T136249847A136250011. DOI 10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T136249847A136250011.en.

NUNES, Gisele Lopes *et al.* Quillworts from the Amazon: A multidisciplinary populational study on *Isoetes serracarajensis* and *Isoetes cangae*. **PloS one**, v. 13, n. 8, 2018.

OH, Myung Jin *et al.* High frequency sporophytes regeneration from the spore culture of the endangered aquatic fern *Isoetes coreana*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 6A, p. 14-20, 2013.

PEREIRA, Jovani B. De S. *et al.* Two new species of Isoetes (Isoetaceae) from northern Brazil. **Phytotaxa**, v. 272, n. 2, p. 141-148, 2016.

PEREIRA, Jovani B.; ARRUDA, André Jardim; SALINO, Alexandre. Flora of the cangas of Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Isoetaceae. **Rodriguésia**, v. 68, n. 3SPE, p. 853-857, 2017.

PPG Pteridophyte Phylogeny Group) I. A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 54, n. 6, p. 563-603, 2016. DOI [10.1111/jse.12229](https://doi.org/10.1111/jse.12229).

SILVA, M. A. **Arranjos político-institucionais: a criação de novos municípios, novas estruturas de poder e as lideranças locais - a divisão territorial de Marabá na década de 1980.** 2006. 188 f. Dissertação (Mestrado) - Núcleo de Altos Estudos Amazônicos, Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

SMOLDERS, A. J. P.; LUCASSEN, E. C. H. E. T.; ROELOFS, J. G. M. The isoetid environment: biochemistry and threats. **Aquat. Bot.** v. 73, p. 325–350, 2002.

SOUZA-FILHO, Pedro Walfir M. *et al.* Four decades of land-cover, land-use and hydroclimatology changes in the Itacaiúnas River watershed, southeastern Amazon. **Journal of environmental management**, v. 167, p. 175-184, 2016. DOI [10.1016/j.jenvman.2015.11.039](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.11.039).

TAYLOR, W. Carl; HICKEY, R. James. Habitat, evolution, and speciation in Isoetes. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 613-622, 1992.

TROIA, Angelo; PEREIRA, Jovani B.; KIM, Changkyun; TAYLOR, W. Carl. The genus *Isoetes* (Isoetaceae): a provisional checklist of the accepted and unresolved taxa. **Phytotaxa**, v. 277, n. 2, p. 101-145, 2016.

VIANA, Pedro Lage *et al.* Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: história, área de estudos e metodologia. **Rodriguésia**, v. 67, n. 5, 2016. DOI [10.1590/2175-7860201667501](https://doi.org/10.1590/2175-7860201667501).

XAVIER, Aloisio *et al.* Propagação vegetativa de cedro-rosa por miniestaquia. **Revista Árvore**, v. 27, n. 2, p. 139-143, 2003.

APÊNDICE B – Relatório Técnico II apresentado como componente da dissertação do Mestrado Profissional Uso Sustentável dos Recursos Naturais em Regiões Tropicais

PROD. TEC. ITV DS - N032 /2020

DOI10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2020.32.Aguiar

PRODUÇÃO TÉCNICA ITV DS

CRESCIMENTO DE *ISOETES CANGAE* EM SUBSTRATOS ORIUNDOS DE LAGOS DE CARAJÁS

Biologia e Propagação de *Isoetes*

Keyvilla da Costa Aguiar

Cinthia Bandeira Abranches

Silvio Junio Ramos

Markus Gastauer

Cecilio Frois Caldeira

Belém / PA

Agosto / 2020

Título: Crescimento de <i>Isoetes Cangae</i> em substratos oriundos de lagos de Carajás: Biologia e Propagação de <i>Isoetes</i>	
PROD. TEC. ITV DS – N032/2020	Revisão
Classificação: () Confidencial () Restrita () Uso Interno (X) Pública	00

Informações Confidenciais - Informações estratégicas para o Instituto e sua Mantenedora. Seu manuseio é restrito a usuários previamente autorizados pelo Gestor da Informação.

Informações Restritas - Informação cujo conhecimento, manuseio e controle de acesso devem estar limitados a um grupo restrito de empregados que necessitam utilizá-la para exercer suas atividades profissionais.

Informações de Uso Interno - São informações destinadas à utilização interna por empregados e prestadores de serviço

Informações Públicas - Informações que podem ser distribuídas ao público externo, o que, usualmente, é feito através dos canais corporativos apropriados.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A282 Aguiar, Keyvilla da Costa.
 Crescimento de *Isoetes Cangae* em substratos oriundos de lagos de Carajás: biologia e propagação de isoetes. / Keyvilla da Costa Aguiar, Cinthia Bandeira Abranches, Silvio Junio Ramos, Markus Gastauer, Cecilio Frois Caldeira - Belém: ITV, 2020.
 25 p. : il.

Relatório Técnico (Instituto Tecnológico Vale) – 2020
 PROD.TEC.ITV.DS.N032/2020
 DOI 10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2020.32.Aguiar

1. Recuperação - Estratégias - Amazônia. 2. Plantas aquáticas - Amazônia. 3. Botânica – Serra dos Carajás (PA). I. Abranches, Cinthia Bandeira. II. Ramos, Silvio Junio. III. Gastauer, Markus. IV. Caldeira, Cecilio Frois. V. Título

CDD 23. ed. 622.752098115

Bibliotecária responsável: Nisa Gonçalves / CRB 2 – 525

RESUMO EXECUTIVO

O gênero *Isoetes* L. possui espécies que ocorrem nos mais diversos ambientes do mundo, mas muitas destas espécies estão ameaçadas de extinção devido alterações em seu *habitat* natural. *Isoetes cangae* foi descrita com uma única população totalmente submersa em um lago permanente e ultra (oligotrófico) na Serra de Carajas. Juntamente ao potencial de alteração de seu habitat, estas características levaram a espécie ser classificadas como criticamente ameaçada (CR). Portanto, este estudo objetivou avaliar o potencial de desenvolvimento de *I. cangae* em substratos de diferentes lagos de Carajás, o que poderá servir para guiar estratégias de conservação que visam ampliar a área de ocorrência desta espécie. Para tanto, plantas jovens de *I. cangae* foram cultivadas em substratos oriundos de lagos de Carajás, sendo um temporário (corpo de canga N6 – Serra Norte) e um permanente (TI3, parte do complexo de lagos Três Irmãs da Serra Sul). O substrato orgânico comercial Jiffy-7® que foi utilizado como controle. As plantas foram mantidas submersas, em potes de 2 litros em condições controladas em câmara de crescimento. Após nove meses de cultivo observamos que todas as plantas cresceram e completaram o ciclo reprodutivo, marcado pelo desenvolvimento de esporângios na base das folhas mais externas. Segundo análises de fluorescência da clorofila 'a', todas as plantas apresentaram valores que apontam para boa eficiência quântica, sem sinais de estresses. Valores mais altos foram observados para plantas cultivadas nos substratos oriundos dos lagos de Carajás. No entanto, os melhores resultados de crescimento (citar aqui) e produção de estruturas reprodutivas foram obtidos em plantas cultivadas no substrato do lago temporário de N6. Estes resultados reforçam o potencial de *I. cangae* poder se adaptar a outros ambientes além do lago Amendoim. No entanto, como este estudo foi realizado com plantas submersas, ensaios de tolerância a redução do nível de água são ainda necessários.

Palavras-chave: Plantas aquáticas. Crescimento vegetal. Canga. Carajás.

ABSTRACT

The genus *Isoetes* L. has species that occur in the most diverse environments around the world, but many of these species are threatened with extinction changes in their natural habitat. *Isoetes cangae* was described with a single population totally submerged in a permanent and ultra (oligotrophic) lake in the Serra de Carajas. Together with the potential for altering its habitat, these characteristics led the species to be classified as critically endangered (CR). Therefore, this study aimed to evaluate the development potential of *I. cangae* in substrates of different lakes of Carajás, which may serve to guide conservation strategies that aim to expand the area of occurrence of this species. For this purpose, young plants of *I. cangae* were grown on substrates from the lakes of Carajás, being a temporary plant (canga body N6 - Serra Norte) and a permanent plant (TI3, part of the Três Irmãs da Serra Sul lake complex). The commercial organic substrate Jiffy-7® that was used as a control. The plants were kept submerged, in 2 liter pots under controlled conditions in a growth chamber. After nine months of cultivation, we observed that all plants grew and completed the reproductive cycle, marked by the development of sporangia at the base of the outermost leaves. According to chlorophyll 'a' fluorescence analyzes, all plants showed values that point to good quantum efficiency, with no signs of stress. Higher values were observed for plants grown on substrates from the lakes of Carajás. However, the best results of growth (quote here) and production of reproductive structures were obtained in plants grown on the substrate of the temporary N6 pond. These results reinforce the potential of *I. cangae* to be able to adapt to environments other than Lake Peanut. However, as this study was carried out with submerged plants, tolerance tests to reduce the water level are still necessary.

Keywords: Aquatic plants. Plant growth. Canga. Carajás.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Tabela 1** – Caracterização química e física dos substratos utilizados no estudo, sendo Jiffy-7® um substrato orgânico comercial (controle), TI3 proveniente do lago permanente TI3 pertencente ao complexo de lagoas Três Irmãs (Serra Sul), e N6 proveniente de um lago temporário (Serra Norte) **11**
- Figura 1** – (A) Plantas de *Isoetes cangae* cultivadas por nove meses nos substratos Jiffy-7® e sedimentos do lago TI3 (complexo dos lagos Três Irmãs) e do lago do corpo de canga N6, (B) Número de folhas e de (C) esporângios produzidos por planta. As barras representam a média±desvio padrão, enquanto letras diferentes sobre as barras representam diferenças significativas entre as medias após o teste post-hoc de Tukey HSD a $P < 0.05$ **14**
- Figura 2** – (A) Área foliar, (B) área radicular e (C) razão raiz: parte aérea por planta de *Isoetes cangae* cultivadas por nove meses nos substratos Jiffy-7® e sedimentos do lago TI3 (complexo dos lagos Três Irmãs) e do lago do corpo de canga N6. As barras representam a média±desvio padrão, enquanto letras diferentes sobre as barras representam diferenças significativas entre as medias após o teste post-hoc de Tukey HSD a $P < 0.05$ **15**
- Figura 3** – (A) Rendimento quântico da fluorescência de *Isoetes cangae*, cultivadas no (B) substrato Jiffy-7®, (C) sedimento do lago TI3, (D) sedimento do lago N6. As barras representam a média±desvio padrão, enquanto letras diferentes sobre as barras **16**

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	08
1.1	OBJETIVOS.....	10
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1	SUBSTRATOS.....	10
2.2	MATERIAL VEGETAL.....	11
2.3	VARIÁVEIS ANALISADAS.....	12
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
4	CONCLUSÃO.....	17
	REFERÊNCIAS.....	18

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Isoetes* L. compreende aproximadamente 250 espécies descritas (TROIA *et al.*, 2016), mas a estimativa é de que existam até 350 espécies (HICKEY; MACLUF; TAYLOR, 2003). Este gênero agrupa plantas que têm ocorrência em lagos, lagoas, córregos, estuários, pântanos, solos terrestres ou parcialmente inundados (TAYLOR; HICKEY, 1992), perpassando por *habitats* totalmente submersos, semi-aquáticos e terrestres distribuídos amplamente por quase todos os continentes (TROIA *et al.*, 2016). *Isoetes* L. possui também um elevado número de espécies ameaçadas devido a alterações em seu *habitat*. Reduções em populações naturais têm sido observadas como consequência de: i) a acidificação dos lagos pela poluição industrial do ar que afetou as populações de *Isoetes lacustres* e *Isoetes eschinospora* Durieu na República Tcheca (VRBA *et al.*, 2003) e na Holanda (ARTS *et al.*, 1990); ii) intensificação do uso da terra (agricultura) e invasão de espécies exóticas que afetaram as populações de *Isoetes coreana* Chung e Choi (LEE *et al.*, 2005; KIM; NA; CHOI, 2008) na região da Coreia do Sul; iii) poluição e eutrofização da água nas regiões de ocorrência das populações de *Isoetes hypsophilia* Hand.-Mazz, *Isoetes sinensis* Palmer, *Isoetes yunguiensis* e *Isoetes taiwanensis* (LIU *et al.*, 2005); iv) ampliação do cultivo de arroz e consequente utilização de fertilizantes em áreas de ocupação das populações de *Isoetes malinverniana* Ces. *et* De Not, bem como a remodelagem mecânica dos canais fluviais na região (BARNI *et al.*, 2010); v) além de outras espécies, como *Isoetes cangae* J.B.S. Pereira, Salino & Stutzel, a qual possui distribuição muito restrita em área que recebe significativa alteração ambiental (PEREIRA *et al.*, 2016, SOUZA-FILHO *et al.*, 2016).

Uma única população de *Isoetes cangae* foi encontrada submersa no lago Amendoim da Serra Sul de Carajás (PEREIRA *et al.*, 2016). Este lago é perene, (ultra) oligotrófico, com sistema fechado de captação de água sobre a crosta laterítica coberta por uma vegetação típica dos campos rupestres ferruginosos. A região é palco de intensas transformações como a conversão da floresta em pastagens para pecuária, levando a alterações no ciclo hidroclimático da bacia hidrográfica do rio Itacaiúnas (na qual está inserida as Serras de Carajás) (SOUZA-FILHO *et al.*, 2016). Juntamente com a expansão das atividades de mineração na região, estas mudanças podem levar a deterioração da qualidade do *habitat* desta espécie (PEREIRA *et al.*, 2016), a qual já figura na lista da *International Union for Conservation of Nature* - IUCN como uma espécie criticamente ameaçada de extinção (LANSDOWN, 2019).

Uma série de estudos têm sido realizados visando a conservação de *I. cangae*, os quais incluem: i) revisão detalhada com a caracterização morfológica e genética de *I. cangae* e *Isoetes serracarajensis* J.B.S. Pereira, Salino & Stutzel, também endêmica das cangas de Carajás, porém com populações em diferentes corpos de canga (Serra Norte, Serra da Bocaina, Serra do Tarzan e Serra Sul) (PEREIRA *et al.* 2016; NUNES *et al.*, 2018); ii) o desenvolvimento de protocolos de propagação e cultivo *in vitro* de *I. cangae* com alto rendimento, ou seja, elevada percentagem de germinação de esporos (67% de esporos maduros) com mortalidade muito baixa durante o período de crescimento (3%) (CALDEIRA *et al.*, 2019); iii) a determinação das formas de reprodução, com dominância de autofecundação e fecundação cruzada, mas com evidências de possível apogamia em taxas muito baixas (AGUIAR *et al.*, 2020); iv) crescimento inicial em diferentes condições ambientais, com variações de substratos e regime de temperatura (CALDEIRA *et al.*, 2019); v) o cultivo em condições de alta e baixa trofia, onde as plantas completaram o desenvolvimento em todas as condições, sugerindo capacidade de adaptação a outros ambientes (CALDEIRA *et al.*, no prelo).

A adaptação a novos ambientes constitui uma alternativa para ampliar a ocorrência da espécie e reduzir os riscos de perda líquida. Em *I. malinverniana*, por exemplo, espécie criticamente ameaçada da flora italiana, a transferência de plantas propagadas em condições controladas para condições semelhantes ao seu ambiente natural resultou no sucesso de sobrevivência e possível modelo de reintrodução da espécie (ABELI *et al.*, 2017). De forma similar, uma possível transferência de *I. cangae* para outros locais, além do lago Amendoim, constitui uma alternativa para ampliar a ocorrência da espécie e reduzir os riscos de perda líquida. Estudos preliminares com *I. cangae* cultivadas em diferentes condições ambientais, como substratos, temperatura, controle de água, sugerem a capacidade de adaptação da espécie a outros ambientes (CALDEIRA *et al.*, 2019; CALDEIRA *et al.*, no prelo), fatores que podem ampliar as estratégias para sua distribuição em diferentes locais dos corpos de canga das Serras de Carajás e, conseqüentemente, conservação da espécie.

Nas serras de Carajás são encontrados outros lagos, perenes e temporários. O complexo de lagos Três Irmãs, situado no corpo de canga S11A (Serra Sul de Carajás), é composto por três lagos permanentes (TI1, TI2 e TI3) que se conectam hidrologicamente durante a estação chuvosa (SAHOO *et al.*, 2017). Estes lagos também possuem baixa trofia ao longo das estações seca e chuvosa, pH

predominantemente ácido, sedimentos enriquecidos com Fe_2O_3 , P_2O_5 , e matéria orgânica (SAHOO *et al.*, 2016; SAHOO *et al.*, 2017), características similares às encontradas no lago Amendoim. Por outro lado, lagos temporários são habitats de *I. serracarajensis*, também endêmica da região e distribuídas em outras localidades de Carajás (Serra Sul, Serra Norte, Serra do Tarzan e Serra da Bocaina) (PEREIRA; ARRUDA; SALINO, 2017). Apesar de serem escassas as informações sobre qualidade de água e composição dos sedimentos destes lagos, plantas de *I. serracarajensis* encontradas no lago temporário do corpo de canga N6 são maiores e apresentam maior quantidade de estruturas reprodutivas quando comparadas às plantas coletadas em outras localidades (informação pessoal), o que pode estar associado às características do lago que beneficiam o crescimento destas plantas.

1.1 OBJETIVO

Avaliar o potencial de crescimento de *Isoetes cangae* em substratos provenientes de lagos das cangas das Serras de Carajás.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 SUBSTRATOS

Plantas de *I. cangae* foram cultivadas em três substratos: i) T13 - oriundo do maior lago permanente pertencente ao complexo Três Irmãs (Serra Sul de Carajás); ii) N6 – oriundo do lago temporário do corpo de canga N6 (Serra Norte de Carajás); iii) Jiffy-7[®] - substrato orgânico comercial que foi utilizado como tratamento controle. Este último foi escolhido como controle devido ao bom crescimento que *I. cangae* apresentou em diferentes ensaios e também a facilidade de aquisição. Os substratos foram caracterizados física e quimicamente. Para análise física, a textura do solo foi determinada conforme descrito por Kettler (2001). Quanto à composição química, a determinação do pH foi realizada na proporção de solo: líquido que foi de 1:2,5, e o carbono orgânico foi determinado pelo método de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) em meio sulfúrico. Os teores de P, K, B, Zn, Fe, Mn e Cu disponíveis foram determinados pelo método de Mehlich-1 ($0.05 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl} + 0.0125 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$), o teor total de N pelo método de Kjeldahl após digestão utilizando ácido sulfúrico e S-SO_4^{-2} por fosfato de cálcio monobásico a 0,01 M. Por meio de espectrofotometria de absorção atômica em extratos de KCl a 1 M com a adição de óxido de lantânio, foram determinados os

teores de Ca, Mg e Al permutáveis (EMBRAPA, 2017). A composição química e física dos substratos encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização química e física dos substratos utilizados no estudo, sendo o Jiffy-7® um substrato orgânico comercial (controle), TI3 proveniente do lago permanente TI3 pertencente ao complexo de lagoas Três Irmãs (Serra Sul), e N6 proveniente de um lago temporário (Serra Norte).

Propriedades		Jiffy-7®	TI3	N6
pH	-	5.50	4.25	4.50
OC	%	64.80	18.30	9.46
N		1.00	3.30	1.69
P		25.90	5.90	6.70
K		54.00	18.85	74.77
S		28.00	4.00	19.65
B		0.24	0.13	0.23
Zn	mg dm ⁻³	1.10	0.60	0.50
Fe		10.00	317.00	334.00
Mn		2.50	4.70	5.17
Cu		1.80	0.20	0.83
Ca		5.00	0.24	0.12
Mg	cmolc dm ⁻³	5.20	0.14	0.08
Al		0.01	1.52	0.41
Areia		-	78.00	66.83
Argila	%	-	17.00	24.00
Silte		-	5.00	9.17

Fonte: Autores, 2020.

2.2 MATERIAL VEGETAL

O estudo foi conduzido a partir de esporófitos propagados em condições controladas. Os materiais de propagação (megásporos e micrósoros) foram obtidos de plantas adultas coletadas no lago Amendoim. A regeneração de esporófitos foi realizada por meio de fertilização *in vitro*, conforme descrito por Caldeira *et al.* (2019). Resumidamente, esporângios foram destacados manualmente das plantas doadoras

e seguiram para esterilização. Os esporângios foram tratados com etanol a 70% durante 1 min, em seguida lavados com água destilada, esterilizados novamente durante 3 min com solução de NaClO (1%) contendo Tween-20 (0,01%), finalizando com três lavagens com água destilada estéril. Em seguida, os esporângios foram rompidos com pinça e os esporos incubados em água destilada. Os megásporos e micrósporos foram misturados, incubados em tubos tipo Falcon de 50 mL contendo água destilada e transferidos para câmara de cultivo de plantas (Fitotron SGC 120, Weiss Technik, UK) com fotoperíodo de 12:12h, radiação de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 28:22 °C para dia e noite, respectivamente. Esporófitos com aproximadamente 1 cm foram transferidos para potes com volume de 2 dm³, contendo 200 mL de cada um dos substratos a serem avaliados. Após os esporófitos serem fixados ao substrato, os potes foram preenchidos com água destilada até completar o volume de 2 dm³. As plantas foram transferidas para câmara de cultivo de plantas e mantidas por nove meses nas mesmas condições ambientais usadas durante o processo de fertilização *in vitro*.

2.3 VARIÁVEIS ANALISADAS

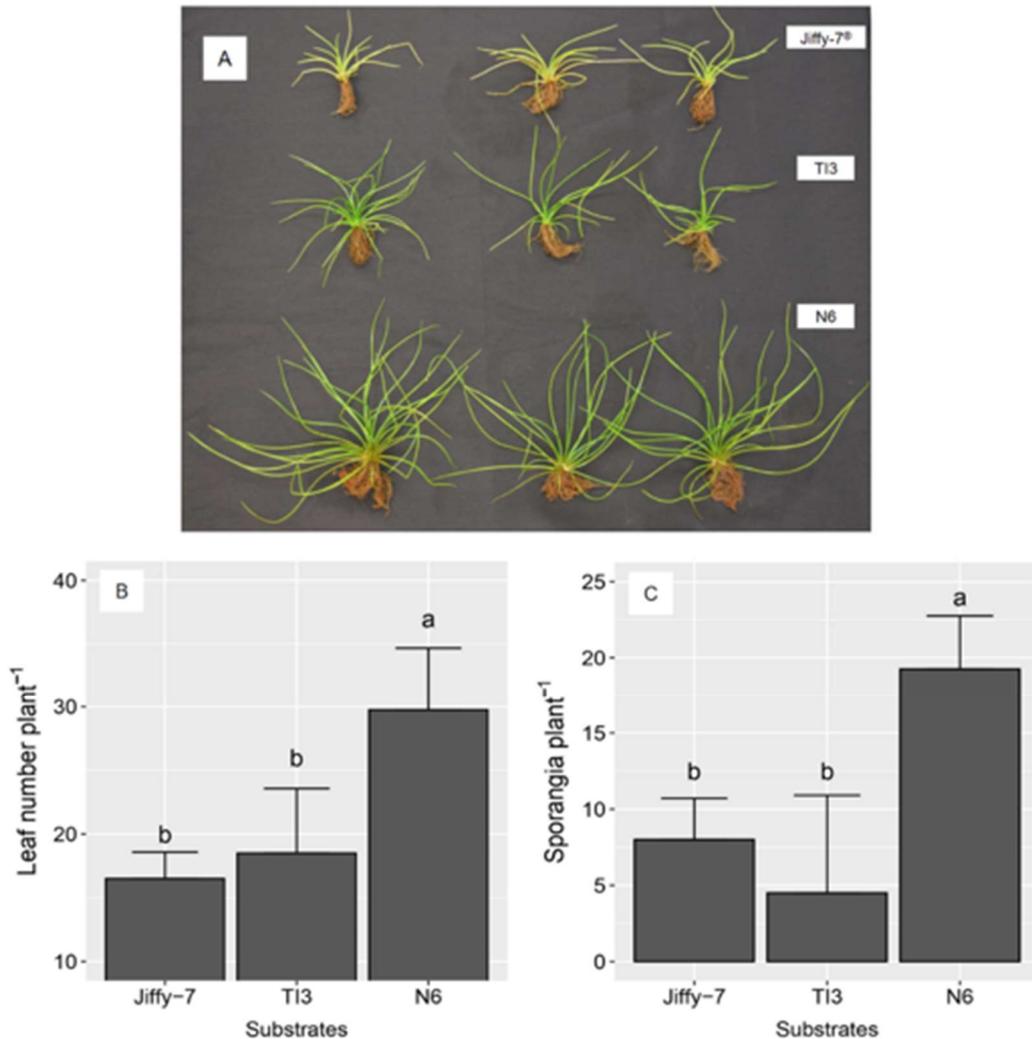
Após o período de cultivo foram analisadas: i) número de folhas produzidas por planta; ii) número de esporângios produzidos por planta, destacados manualmente da base das folhas do cormo; iii) área foliar e radicular, realizadas a partir de imagens de folhas e raízes geradas com o escâner *Epson Perfection V740 PRO* e analisados com software *ImageJ* (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012); e iv) razão entre a área de raízes: folhas; v) avaliação da fluorescência da clorofila com o auxílio do *PlantScreen™ Compact System* (*Photon Systems Instruments* – PSI). Para essa avaliação, as plantas foram submetidas mantidas no escuro durante 30 minutos e a eficiência fotoquímica do PSII foi mensurada entre 9h e 12h, ou seja, 3h após início do período de iluminação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas de *I. cangae* foram capazes de se desenvolver em todos os substratos e atingir a fase reprodutiva, etapa importante para assegurar a perpetuação da espécie no ambiente. Além disso, os melhores resultados foram observados em plantas cultivadas nos sedimentos do lago N6 (Figura 1A), sugerindo maior potencial de adaptação de *I. cangae* a novos ambientes. Para estas plantas, o número de folhas

(Figura 1B), de estruturas reprodutivas (Figura 1C) e área foliar (Figura 2A) e radicular (Figura 2B) foram superiores aos de plantas cultivadas nos sedimentos do lago TI3 e no substrato orgânico comercial Jiffy-7[®]. Plantas cultivadas em sedimentos do lago N6 apresentaram aproximadamente 2x mais folhas e, conseqüentemente, maior área foliar que plantas nos demais tratamentos, o que pode ter auxiliado na maior capacidade de captação do carbono. Além disso, esse aumento na produção de folhas contribuiu para o desenvolvimento de estruturas reprodutivas as quais encontram-se na base das folhas mais internas em plantas ainda jovens (VÖGE, 2006). Uma vez que as estruturas reprodutivas tendem a aparecer após a emissão da primeira dezena de folhas (observação de cultivo em várias plantas de *I. cangae*), esta pode ser a causa de uma maior proporção de esporângios em plantas de N6, as quais produziram cerca de 4x mais esporângios que plantas cultivadas nos sedimentos do lago TI3. Dessa maneira, apesar da forte diferença entre plantas em N6 e TI3, estas últimas não apresentaram diferenças significativas para as plantas cultivadas no substrato controle (Jiffy-7[®]), sugerindo capacidade de adaptação e desenvolvimento nos diferentes ambientes, aqui representados por substratos de diferentes origens e características físicas e químicas (Tabela 1). Adaptações similares também foram observadas em *I. lacustris* crescendo em diferentes condições ambientais, onde plantas em condições mais favoráveis desenvolveram um número maior de folhas, alcançando valores bastante altos para a média das populações normalmente estudadas (VÖGE, 2004).

Figura 1 – (A) Plantas de *Isoetes cangae* cultivadas por nove meses nos substratos Jiffy-7® e sedimentos do lago TI3 (complexo dos lagos Três Irmãs) e do lago do corpo de canga N6, (B) Número de folhas e de (C) esporângios produzidos por planta. As barras representam a média±desvio padrão, enquanto letras diferentes sobre as barras representam diferenças significativas entre as medias após o teste post-hoc de Tukey HSD a $P < 0.05$.

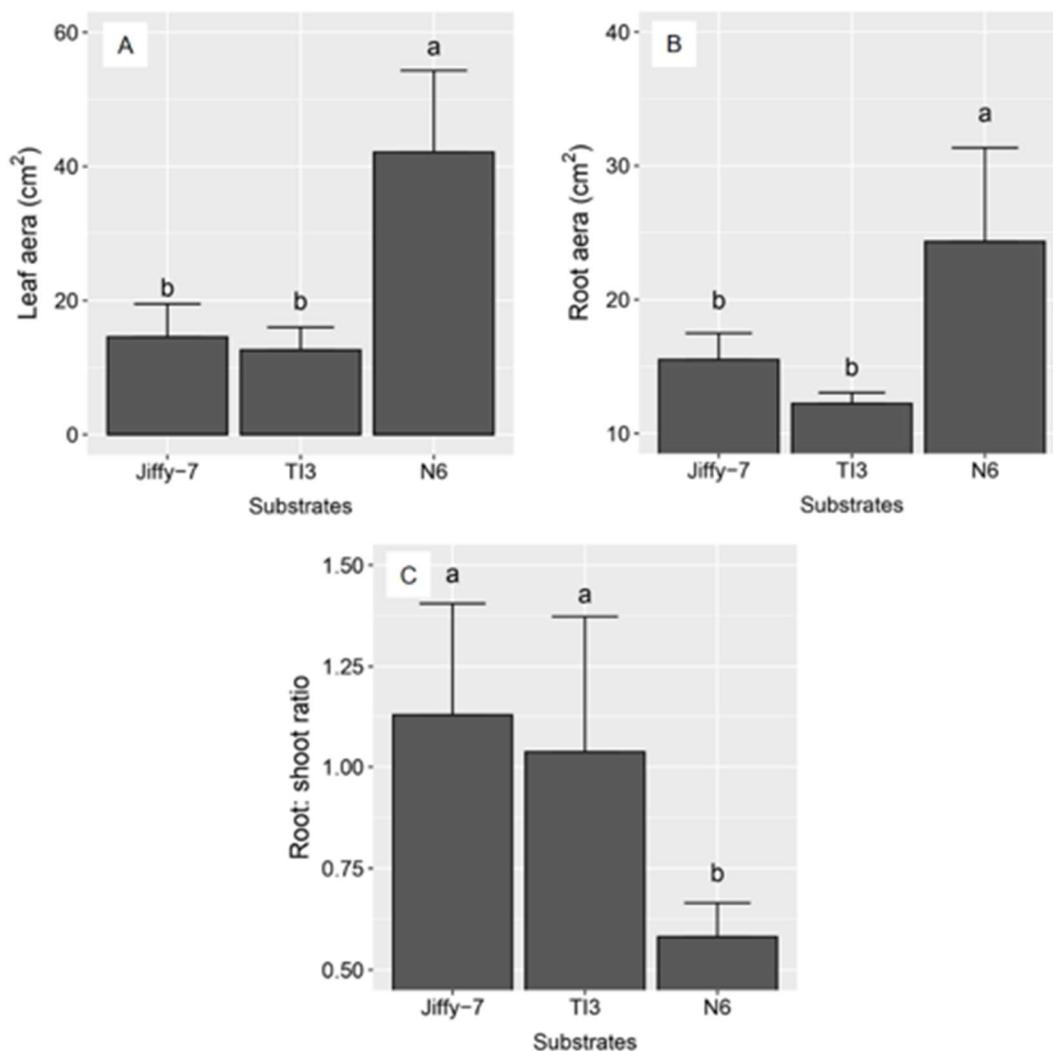


Fonte: Autores, 2020.

Apesar de plantas cultivadas no tratamento N6 terem desenvolvido maior estrutura radicular (aqui evidenciado pela área radicular, Figura 2B), estas plantas apresentaram razão área de raízes:folhas muito inferior, sendo praticamente a metade da encontrada para as plantas em TI3 e Jiffy-7® (Figura 2C). Esta maior alocação de carbono normalmente ocorre quando as plantas se encontram em ambiente favorável, ou seja, quando as condições ambientais são favoráveis ao crescimento e produção, neste caso, favorecendo ao desenvolvimento de maior número de estruturas reprodutivas, além de auxiliar no crescimento em diferentes locais (SMITH; STITT, 2007), assegurando o sucesso da reprodução e perpetuidade da espécie. No entanto, a confirmação da fertilidade destas estruturas é necessária devido a relatos de

declínio populacional em *I. lacustris* quando submetidas a condições eutróficas que acentuaram o desenvolvimento vegetativo (CHAPPUIS *et al.*, 2015).

Figura 2 – (A) Área foliar, (B) área radicular e (C) razão área raiz: folhas por planta de *Isoetes cangae* cultivadas por nove meses nos substratos Jiffy-7® e sedimentos do lago T13 (complexo dos lagos Três Irmãs) e do lago do corpo de canga N6. As barras representam a média±desvio padrão, enquanto letras diferentes sobre as barras representam diferenças significativas entre as medias após o teste post-hoc de Tukey HSD a $P < 0.05$.

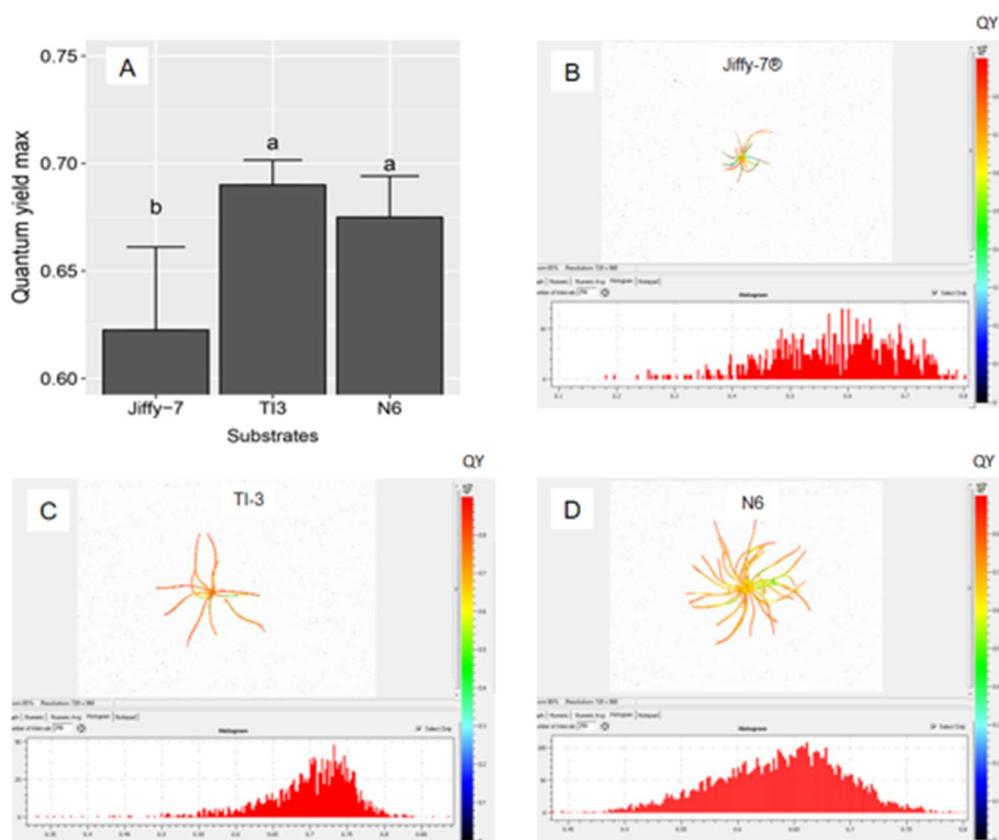


Fonte: Autores, 2020.

A avaliação da fluorescência da clorofila *a* revelou que as plantas nos sedimentos dos lagos de Carajás (Figura 3) apresentaram menor inibição ou dano no processo de transferência de elétrons do fotossistema II (PSII), que segundo Tester e Bacic (2005) é indicativo da eficiência no uso da reação fotoquímica para assimilação do carbono pelas plantas. Com valores próximos de 0.7, o rendimento quântico (QYmax, do inglês *Quantum Yield*) das plantas cultivadas em N6 (Figura 3D) e T13 (Figura 3C) sugere o baixo nível de estresse a que estão submetidas, confirmando o

bom estado de “saúde” nestas condições, sinal de boa adaptação. Normalmente avaliado em somente uma pequena fração da folha, o rendimento quântico foi analisado de forma mais integrativa neste estudo, ou seja, toda a parte fotossintetizante das plantas, incluindo folhas mais velhas e que podem ter iniciado a senescência, conforme mais evidente nas folhas mais externas de determinadas plantas em Jiffy-7® (Figura 3B). Uma maior proporção de folhas neste estado pode ter reduzido a eficiência quântica destas plantas, no entanto, os valores observados para a grande parte das folhas (sobretudo mais novas) sugerem elevados valores de QY_{max} . Em geral, os valores de QY_{max} observados refletem uma boa capacidade fotossintética em todas condições avaliadas e fornecem suporte para o potencial de adaptação de *I. cangae* aos substratos de ambos os lagos de Carajás avaliados e também para a longevidade do cultivo *ex situ* em condições controladas.

Figura 3 – (A) Rendimento quântico da fluorescência de *Isoetes cangae*, cultivadas no (B) substrato Jiffy-7®, (C) sedimento do lago TI3, (D) sedimento do lago N6. As barras representam a média±desvio padrão, enquanto letras diferentes sobre as barras representam diferenças significativas entre as medias após o teste post-hoc de Tukey HSD a $P < 0.05$.



Fonte: Autores, 2020.

4 CONCLUSÃO

Plantas de *I. cangae* conseguiram crescer e completar o ciclo reprodutivo durante os nove meses de crescimento em todos os três substratos avaliados. Os melhores resultados foram obtidos com plantas crescidas no substrato coletado no lago temporário N6, com plantas mais vigorosas e que produziram mais estruturas reprodutivas. Estes resultados reforçam o potencial de *I. cangae* poder se adaptar a outros ambientes além do lago Amendoim. Este estudo foi realizado com plantas submersas, e ensaios de tolerância a redução do nível de água podem complementar esses resultados iniciais, sendo ainda necessários.

REFERÊNCIAS

- ABELI, T. *et al.* A gleam of hope for the critically endangered *Isoëtes malinverniana*: Use of small-scale translocations to guide conservation planning. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 28, n. 2, p. 501-505, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/aqc.2848>
- ARTS, G. H. P. *et al.* Successional changes in the soft-water macrophyte vegetation of (sub) atlantic, sandy, lowland regions during this century. **Freshwater Biology**, v. 24, n. 2, p. 287-294, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1990.tb00709.x>
- BARNI, E. *et al.* *Isoëtes malinverniana* Ces. et De Not. 2010. **Revista Informatore Botanico Italiano**.
- CALDEIRA, C. F. *et al.* Sporeling regeneration and ex situ growth of *Isoëtes cangae* (*Isoetaceae*): Initial steps towards the conservation of a rare Amazonian quillwort. **Aquatic botany**, v. 152, p. 51-58, 2019. DOI [10.1016/j.aquabot.2018.10.001](https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2018.10.001).
- CHAPPUIS, E. *et al.* Deleterious interaction of light impairment and organic matter enrichment on *Isoetes lacustris* (*Lycopodiophyta*, *Isoetales*). **Hydrobiologia**, v. 760, n. 1, p. 145-158, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2321-2>
- HICKEY, R. J.; MACLUF, C.; TAYLOR, W. C.. A re-evaluation of *Isoetes savatieri* Franchet in Argentina and Chile. **American Fern Journal**, v. 93, n. 3, p. 126-136, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1640/0002-8444\(2003\)093\[0126:AROISF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1640/0002-8444(2003)093[0126:AROISF]2.0.CO;2)
- KETTLER, T. A.; DORAN, J. W.; GILBERT, T. L. Simplified method for soil particle-size determination to accompany soil-quality analyses. **Soil Science Society of America Journal**, v. 65, n. 3, p. 849-852, 2001. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj2001.653849x>
- KIM, C.; NA, H. R.; CHOI, H-K. Genetic diversity and population structure of endangered *Isoetes coreana* in South Korea based on RAPD analysis. **Aquatic Botany**, v. 89, n. 1, p. 43-49, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.02.004>
- LANSDOWN, R. V. *Isoetes cangae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019:e.T136249847A136250011.DOI:10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T136249847A136250011.en.
- LEE, H.-W., CHOUNG, H.-L., ROH, T.-H., KWON, Y.-H., KIM, C.H., HYUN, J.-O., CHANG, I.S., 2005. Categorization and Conservation of the Threatened Plant Species in Environmental Impact Assessment. Korea Environment Institute, Seoul (in Korean, with English abstract).
- LIU, X.; WANG, J.-Y.; WANG, Q.-F. Current status and conservation strategies for *Isoetes* in China: a case study for the conservation of threatened aquatic plants. **Oryx**, v. 39, n. 3, p. 335-338, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0030605305000712>

NUNES, G. L. *et al.* Quillworts from the Amazon: A multidisciplinary populational study on *Isoetes serracarajensis* and *Isoetes cangae*. **PLoS one**, v. 13, n. 8, p. e0201417, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201417>

PEREIRA, J. B. De S. *et al.* Two new species of *Isoetes* (*Isoetaceae*) from northern Brazil. **Phytotaxa**, v. 272, n. 2, p. 141-148, 2016. DOI: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.272.2.5>

PEREIRA, J. B.; ARRUDA, A. J.; SALINO, A.. Flora of the cangas of Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Isoetaceae. **Rodriguésia**, v. 68, n. 3SPE, p. 853-857, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201768313>

SAHOO, P. K. *et al.* Geochemistry of upland lacustrine sediments from Serra dos Carajás, Southeastern Amazon, Brazil: implications for catchment weathering, provenance, and sedimentary processes. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 72, p. 178-190, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2016.09.003>

SAHOO, P. K. *et al.* Geochemical characterization of the largest upland lake of the Brazilian Amazonia: Impact of provenance and processes. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 80, p. 541-558, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2017.10.016>

SAHOO, P. K. *et al.* Limnological characteristics and planktonic diversity of five tropical upland lakes from Brazilian Amazon. In: **Annales de Limnologie- International Journal of Limnology**. EDP Sciences, 2017. p. 467-483.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SMITH, A. M.; STITT, M. Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant, cell & environment**, v. 30, n. 9, p. 1126-1149, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01708.x>

SOUZA-FILHO, P. W. M. *et al.* Four decades of land-cover, land-use and hydroclimatology changes in the Itacaiúnas River watershed, southeastern Amazon. **Journal of environmental management**, v. 167, p. 175-184, 2016. DOI [10.1016/j.jenvman.2015.11.039](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.11.039)

TAYLOR, W. C.; HICKEY, R. J.. Habitat, evolution, and speciation in *Isoetes*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 613-622, 1992. DOI: 10.2307/2399755

TEIXEIRA, P. C. *et al.* Manual de métodos de análise de solo. **Rio de Janeiro, Embrapa. 573p**, 2017

TESTER, M.; BACIC, A.. Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.104.900138>

TROIA, A.; PEREIRA, J. B.; KIM, C.; TAYLOR, W. C. The genus *Isoetes* (*Isoetaceae*): a provisional checklist of the accepted and unresolved taxa. **Phytotaxa**, v. 277, n. 2, p. 101-145, 2016.

VINCENT, R. C.; MEGURO, M. Plant soil relationships in ferruginous rocky soil vegetation. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, p. 377-388, 2008.

VÖGE, M. Non-destructive assessing and monitoring of populations of *Isoetes lacustris* L. **Limnologica**, v. 34, n. 1-2, p. 147-153, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0075-9511\(04\)80034-3](https://doi.org/10.1016/S0075-9511(04)80034-3)

VÖGE, M. The reproductive phenology of *Isoetes lacustris* L.: Results of field studies in Scandinavian lakes. **Limnologica**, v. 36, n. 4, p. 228-233, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.limno.2006.06.002>

VRBA, J. *et al.* Long-term studies (1871–2000) on acidification and recovery of lakes in the Bohemian Forest (central Europe). **Science of the Total Environment**, v. 310, n. 1-3, p. 73-85, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00624-1](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00624-1)