

# DESAFIOS E PERSPECTIVAS NA CONSERVAÇÃO DA *Isoëtes cangae*:

uma macrófita Endêmica da Amazônia

## EDITORES

Rodrigo Lemes Martins • Emiliano Nicolas Calderon  
Cecilio Frois Caldeira • Fernando Gomes Santos  
Allysson Buraslan Cavalcante • Guilherme de Oliveira  
Francisco de Assis Esteves



EDITORA INTERCIÊNCIA



DESAFIOS E PERSPECTIVAS  
NA CONSERVAÇÃO DA  
*Isoëtes cangae*:

uma macrófita Endêmica da Amazônia



# DESAFIOS E PERSPECTIVAS NA CONSERVAÇÃO DA *Isoëtes cangae*:

uma macrófita Endêmica da Amazônia

## EDITORES

Rodrigo Lemes Martins • Emiliano Nicolas Calderon  
Cecilio Frois Caldeira • Fernando Gomes Santos  
Allysson Buraslan Cavalcante • Guilherme de Oliveira  
Francisco de Assis Esteves



**EDITORA INTERCIÊNCIA**

Rio de Janeiro - 2023

Copyright © 2023, by Rodrigo Lemes Martins; Emiliano Nicolas Calderon; Cecilio Frois Caldeira; Fernando Marino Gomes dos Santos; Allysson Buraslan Cavalcante; Guilherme de Oliveira; Francisco de Assis Esteves (editores/organizadores)

**Direitos Reservados em 2023 por Editora Interciência Ltda.**

**Diagramação:** Ana Paula Lessa da Cunha Tavares

**Revisão Ortográfica:** Lara Alves dos Santos Ferreira de Souza  
Renata Cristina Vadesilho Meirelles

**Revisão Técnica:** Luiz Alfredo Prado  
Evenilton Pessoa Costa

**Capa:** Marcella Real

**Foto da Capa e Contracapa:** Emiliano Nicolas Calderon

**CIP-Brasil. Catalogação-na-Fonte**  
**Sindicato Nacional dos Editores de Livros, RJ**

---

D484

Desafios e perspectivas na conservação da *Isoëtes cangae*, uma macrófita endêmica da Amazônia [recurso eletrônico] / editores e organizadores Rodrigo Lemes Martins ... [et al.] ; revisores técnicos Luiz Alfredo Prado, Evenilton Pessoa Costa. - 1. ed. - Rio de Janeiro : Interciência, 2023.

recurso digital ; 6247 MB

Formato: PDF

Requisitos do sistema: adobe digital editions

Modo de acesso: world wide web

Inclui bibliografia

DOI 10.29327/5315078

ISBN 978-85-7193-455-9 (recurso eletrônico)

1. Plantas aquáticas - Aspectos ambientais. 2. Ecofisiologia vegetal. 3. Sustentabilidade. 4. Recursos naturais. 5. Livros eletrônicos. I. Martins, Rodrigo Lemes. II. Prado, Luiz Alfredo. III. Costa, Evenilton Pessoa.

23-85596

CDD: 581.76

CDU: 581.5

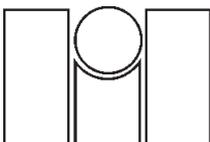


---

Meri Gleice Rodrigues de Souza - Bibliotecária - CRB-7/6439

É proibida a reprodução total ou parcial, por quaisquer meios,  
sem autorização por escrito da editora.

[www.editorainterciencia.com.br](http://www.editorainterciencia.com.br)



**Editora Interciência Ltda.**

Rua Verna Magalhães, 66 – Engenho Novo

Rio de Janeiro – RJ – 20710-290

Tels.: (21) 2501-4760/3251-1342/3251-1350/3251-1363

e-mail: vendas@editorainterciencia.com.br

---

---

## Agradecimentos

Ao empenho dos pesquisadores do Instituto Tecnológico Vale de Diversidade e Sustentabilidade (ITVDS) e da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), técnicos de laboratório e alunos, desde a iniciação científica até os pós-doutores, que participaram do projeto em suas respectivas áreas de pesquisa (Ecologia Vegetal, Ecologia Aquática, Genética, Ecofisiologia Vegetal, Anatomia Vegetal, Taxonomia Vegetal, Biologia da Conservação, Divulgação Científica e Estudos Socioambientais), em especial aos pesquisadores que executaram atividades de campo para coleta das informações que compõem esta obra, bem como aqueles que atuam nos laboratórios.

Às duas instituições de pesquisa envolvidas neste esforço, representadas nas figuras de seus diretores, Prof<sup>a</sup>. Dra. Cintia Monteiro de Barros, Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade (NUPEM), e Dr. Guilherme Oliveira, ITVDS. Importante também destacar a participação dos consultores da Golder Associates, que fizeram as primeiras coletas, e aos taxonomistas Alexandre Salino, André Arruda e Jovani Pereira, que foram os pesquisadores que descreveram as espécies-alvo do presente livro, onde tudo começou.

Não podemos deixar de destacar o papel exercido por alguns pesquisadores, em especial aqueles que se propuseram a iniciar um primeiro núcleo sediado em Parauapebas: Mariana Huguet, Luis Prado e Janiélio Gonçalves, que acabaram por assumir a gestão logística e a coordenação de ações de saúde e segurança do projeto, sendo responsáveis pelo atendimento e pela viabilização das exigentes regras da empresa.

Aos coordenadores dos capítulos, que discutiram e trataram da organização dos capítulos e seus conteúdos.

Agradecemos também ao Prof. Fábio Scarano (UFRJ), que honrosamente aceitou o convite de prefaciá-lo o livro.

Aos inúmeros gestores da Vale, que apoiaram e acompanharam o projeto *Isoëtes* desde sua concepção, em especial a Rodrigo Dutra, Leonardo Neves, Iuri Brandi, Marlene Costa, Elizangela Silva, e aos novos gestores que assumem a Diretoria de Licenciamento nesse momento, Lauro Amorim e Daniel Medeiros de Souza.

Aos gestores e fiscais da Vale, que proveram todo o suporte necessário desde o início do projeto: Taís Fernandes, Alexandre Castilho, Osiel Magalhães, Evanilda Castro, Breno Elias.

À equipe de Saúde, Segurança e Meio Ambiente e gestão de contratos da Vale, Hemerson Gomes, Samira Salomão, Grecijane Távola (Jane), Denise Santos, Edison Andrade, Gilberto Vasconcellos e Maria das Graças. À Cristina Assimakopoulos, pelo apoio na aprovação dos acordos e convênios.

Aos profissionais do Projeto Ferro Carajás que prestaram todo o apoio as equipes de campo, Leno Brabo, Mario Oliveira e Mayla Barbirato. Aos parceiros e colegas de trabalho do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), em especial ao Núcleo de Gestão Integrada (NGI) Carajás, em nome de André Macedo e Paulo Faiad, e ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade do Cerrado e Restauração Ecológica (CBC), Katia Torres e Alexandre Bonesso Sampaio, que acompanham o projeto desde o início, nas análises dos projetos e resultados e emissão das licenças de coleta, contribuindo também para a gestão da biodiversidade. Por fim, para o planejamento e a publicação da obra, contamos com o apoio financeiro da Vale, por meio dos acordos técnicos firmados com a Fundação Coordenação de Projetos, Pesquisas e Estudos Tecnológicos (COPPETEC), que foram fundamentais para a estruturação de laboratórios e a formação de diversos alunos ao longo desses anos de parceria.

---

---

## Apresentação

O presente livro constitui-se na compilação do resultado de dez anos de pesquisas realizadas por dezenas de pesquisadores altamente especializados, e vem ampliar o conhecimento e contribuir para a conservação de uma macrófita endêmica restrita da flora de Carajás, a *Isoëtes cangae*. Representa mais uma importante iniciativa à divulgação dos estudos ambientais e pesquisas que vêm sendo conduzidos na região da Floresta Nacional de Carajás (Flona de Carajás) para a difusão do conhecimento técnico científico da região.

Nas próximas páginas, o leitor terá contato com a mais completa síntese sobre todo o conhecimento já produzido sobre *Isoëtes cangae*, incluindo a sua identificação, a caracterização do seu ambiente de ocorrência, ecologia, genética, fisiologia, estratégias para conservação e manejo.

Assim, esta obra consolida o esforço conjunto da Vale com uma grande equipe de pesquisadores e suas pesquisas, que vão desde a execução de levantamentos de campo, coleta de dados e diversos experimentos, inclusive de colonização assistida, formando a base para a ampliação do conhecimento e para a elaboração do plano de conservação de uma espécie recém descoberta e cujo resultado foi produzido para usufruto da sociedade e da ciência.

Espera-se que esta obra e os esforços impetrados sejam referência para diferentes instituições, empresas, sendo um incentivo a novas pesquisas na região para o manejo e a conservação de espécies endêmicas da flora. A conciliação da proteção do meio ambiente com o desenvolvimento social e econômico torna-se cada vez mais premente, e a Vale vem atuando na elaboração de estudos e diferentes iniciativas para subsidiar a tomada de decisão que permita conciliar o avanço da mineração e a conservação da biodiversidade.

Sem dúvida essa obra traz informações importantes que contribuirão para os processos de licenciamento ambiental e para a ampliação do conhecimento técnico-científico da região de Carajás, reafirmando o compromisso da Vale com a sustentabilidade.

*Daniela Scherer*

---

---

## Prefácio

Para seres tão adaptáveis e espalhados pelo globo, como os da espécie humana, não é automático entender o que é ser raro ou viver restrito a uma única localidade. Certamente, também não é intuitivo imaginar o que é viver de forma sésil, imóvel como uma planta. Não creio que seja tampouco fácil conceber a vida contemporânea sem os minérios que dão a matéria-prima para nossos celulares, meios de transporte, eletrodomésticos, computadores. De fato, já ouvi dizerem que é mais fácil imaginar o fim do mundo que o fim do capitalismo. O aparato imaginativo do ser humano moderno parece limitado. O que não tem limite são os problemas e desafios impostos pelo estilo de vida hegemônico da modernidade.

Este livro, produzido de forma dedicada e cuidadosa por amigos e amigas do Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade da Universidade Federal do Rio de Janeiro, da Vale e do Instituto Tecnológico Vale, trata de um desses desafios, um “*wicked problem*”. Este termo em inglês se refere a um problema aparentemente difícil ou impossível de se resolver devido a requisitos incompletos, contraditórios e mutáveis, que podem não ser prontamente detectáveis. Como conservar uma espécie de planta aquática – *Isoetes cangae* – que é rara e de distribuição restrita (endêmica) a áreas de produção minerária (ferro) em Carajás, Pará, Brasil?

Dez anos de estudos e pesquisas interdisciplinares são sintetizados neste volume e, em grande medida, tornam esse desafio menos “*wicked*”. Os aprendizados incluem como cultivar a espécie em larga escala, como rusticá-la para, em seguida, translocá-la para plantio, como e o que monitorar dos pontos de vista ecológico e genético, criar bancos de germoplasma, entre outros. Esse conjunto de aprendizados elevou a espécie de um *status* de

praticamente desconhecida para a ciência para o de uma das mais estudadas dentre as macrófitas aquáticas ameaçadas.

Claro que, apesar de todo o avanço científico, os desafios persistem. O próximo passo, eu sugiro, é usar todo esse aprendizado para criar um plano de conservação para *Isoëtes cangae* e, possivelmente, até um plano único que inclua outras macrófitas aquáticas em circunstâncias semelhantes. Esse tipo de plano, instrumento oficial da política de conservação de espécies ameaçadas, normatiza e orienta a conservação e o uso sustentável da biodiversidade em questão e, portanto, assegura a longevidade de boas práticas que levem à proteção da espécie. O Centro Nacional de Conservação da Flora do Jardim Botânico do Rio de Janeiro coordena esse diálogo ciência-política e será um ator fundamental no processo. O Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, que já é parceiro no desenvolvimento de vários resultados apresentados a seguir, é outro ator-chave. Finalmente, a Vale S.A. e seu órgão científico, o Instituto Tecnológico Vale, completam o tripé governo-academia-empresa. É o travar desse tipo de diálogo – de forma franca, aberta e colaborativa – que faz com que problemas, que de início parecem difíceis ou mesmo impossíveis de serem tratados, tornem-se tratáveis, ainda que sua complexidade se mantenha.

Leonardo Boff define sustentabilidade como cuidado. Ele explica que “*sustentare*”, do latim, significa cuidar. Que o cuidado e o respeito que permitiram uma década de diálogo, pesquisa e ação que agora culminam com este livro, estendam-se na prática para a lida com esta e outras espécies – ameaçadas ou não – cujas distribuição e ocorrência coincidam com áreas que guardem riquezas minerais. Só assim, com o tempo, talvez possamos deslocar a preocupação de “sustentar o capitalismo” para “sustentar a vida”.

*Fábio Rubio Scarano*

---

---

## Sumário

Apresentação .....	VII
Prefácio .....	IX

### CAPÍTULO 1

Abordagem Integrada da Conservação: O Caso da Macrófita Amazônica	
<i>Isoëtes cangae</i> .....	1
1.1 Biologia da Conservação .....	3
1.2 Diversidade e Biodiversidade .....	4
1.3 Perdas de Biodiversidade .....	5
1.4 Padrões da Biodiversidade .....	7
1.5 Ambientes Extremos e suas Espécies Focais para a Conservação .....	8
1.6 Manejo e Conservação de Macrófitas Endêmicas – <i>Isoëtes         cangae</i> como Modelo de Estudo .....	11
1.7 O Caso <i>Isoëtes</i> – o Livro e sua Relevância .....	14
Referências .....	15

### CAPÍTULO 2

Os Lagos de Altitude da Amazônia: Um Estudo de Caso na Serra dos Carajás .	21
2.1 Introdução .....	23
2.2 Caracterização dos Ambientes Lacustres da Serra dos Carajás .....	25
2.2.1 Aspectos morfossedimentares e hidrogeológicos .....	25

2.2.2	Caracterização climática e hidrológica . . . . .	28
2.2.3	Caracterização limnológica. . . . .	29
2.3	Variação Espacial e Sazonal nas Condições Limnológicas dos Lagos de Altitude . . . . .	29
2.4	Caracterização e Variação de Parâmetros Físicos e Químicos dos Sedimentos . . . . .	31
2.4.1	Biodiversidade aquática: composição e padrões de distribuição dos organismos . . . . .	32
2.5	Considerações Finais. . . . .	42
	Referências . . . . .	43
 CAPÍTULO 3		
	Descoberta da Espécie e sua Classificação. . . . .	49
3.1	Histórico . . . . .	51
3.2	História do Gênero no Brasil . . . . .	55
3.3	Estudos Moleculares e Morfométricos . . . . .	56
3.4	Buscas e Espécies do Brasil. . . . .	59
3.5	Filogenia do Gênero . . . . .	61
3.6	Conclusão. . . . .	62
	Referências . . . . .	62
 CAPÍTULO 4		
	Ferramentas e Avanços no Campo da Genética da Conservação de <i>Isoëtes</i> sp. da Serra dos Carajás. . . . .	65
4.1	A Importância dos Estudos de Diversidade Genética e a Conservação das Espécies . . . . .	67
4.2	Técnicas de Estudo de Diversidade Genética. . . . .	70
4.2.1	Técnicas baseadas em hibridização . . . . .	71
4.2.2	Técnicas que utilizam a Reação em Cadeia da Polimerase ou <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR). . . . .	72
4.2.3	Técnicas que utilizam sequenciamento de nova geração . . . . .	76
4.3	Avanços nos Estudos de Genética da Conservação de <i>I. cangae</i> e <i>I. serracarajensis</i> . . . . .	77
	Referências . . . . .	82

## CAPÍTULO 5

Desenvolvimento Ontogenético e Reprodução de <i>Isoëtes cangae</i> . . . . .	91
5.1 Ciclo de Vida e Morfologia Externa. . . . .	93
5.2 O Esporófito Produz Esporos Femininos e Masculinos . . . .	94
5.3 Os Esporos Germinam e Dão Origem aos Gametófitos. . . .	97
5.4 Desenvolvimento do Esporófito . . . . .	98
5.5 Plantas Cultivadas <i>In Vitro</i> São Capazes de Atingir a Maturidade. . . . .	99
5.6 Plantas Coletadas <i>In Situ</i> Apresentam Produção Contínua de Esporângios . . . . .	101
5.7 As Distintas Formas de Reprodução das Espécies de <i>Isoëtes</i> de Carajás . . . . .	102
5.8 A Reprodução de <i>I. cangae</i> Requer Megásporos Maduros .	107
5.9 <i>Isoëtes cangae</i> Reproduz-se de Forma Sexuada por Autofecundação e Fecundação Cruzada. . . . .	108
5.10 A Propagação de <i>I. cangae</i> Requer a Presença de Micrósporos . . . . .	109
5.11 A Elevada Obtenção de Esporófitos de <i>Isoëtes cangae</i> . .	109
Referências . . . . .	112

## CAPÍTULO 6

Fisiologia da Conservação de <i>Isoëtes</i> . . . . .	115
6.1 Introdução . . . . .	117
6.2 Qualidade e Quantidade de Luz no Crescimento de <i>Isoëtes cangae</i> . . . . .	118
6.3 Plasticidade Fotossintética: Efeito da Alta Irradiância sobre Crescimento de <i>Isoëtes cangae</i> . . . . .	124
6.4 Metabolismo do Carbono de <i>Isoëtes cangae</i> . . . . .	130
6.5 Nutrição e Desenvolvimento . . . . .	135
6.6 Considerações Finais. . . . .	140
Referências . . . . .	140

## CAPÍTULO 7

Cultivo e Aclimação de <i>Isoëtes cangae</i> . . . . .	145
7.1 Introdução . . . . .	147

7.2	O Cultivo em Diferentes Substratos . . . . .	148
7.3	Nutrientes e Metais . . . . .	151
7.4	Temperatura . . . . .	154
7.5	Estudos de Tolerância e Temperatura . . . . .	155
7.6	Restrição Hídrica . . . . .	156
7.7	Ensaio de Seca a Longo Prazo . . . . .	159
7.8	Conclusões . . . . .	161
	Referências . . . . .	161

## CAPÍTULO 8

	Adequabilidade de Hábitat para Colonização Assistida de <i>Isoëtes cangae</i> em Lagos da Serra dos Carajás . . . . .	165
8.1	Introdução . . . . .	167
8.2	Sobrevivência e Desenvolvimento em Condições Controladas . . . . .	169
8.3	Avaliação da Qualidade dos Ambientes Preferenciais para Translocação para Fins de Colonização Assistida de Populações de <i>I. cangae</i> . . . . .	171
8.3.1	Tendências espaciais nas condições limnológicas . . . . .	172
8.3.2	Tendências sazonais nas condições limnológicas . . . . .	174
8.3.3	Variações nictemerais nas condições limnológicas . . . . .	176
8.3.4	Tendências ao longo do perfil da coluna d'água . . . . .	179
8.3.5	Metabolismo aquático . . . . .	181
8.4	Diversidade Microbiológica Associada a <i>Isoëtes cangae</i> e aos Diferentes Compartimentos do Lago do Amendoim . . . . .	183
8.5	Considerações Finais . . . . .	187
	Referências . . . . .	187

## CAPÍTULO 9

	Colonização Assistida como Estratégia de Conservação de Macrófitas Endêmicas: <i>Isoëtes cangae</i> como Estudo de Caso na Floresta Nacional de Carajás . . . . .	191
9.1	Introdução . . . . .	193

9.2	Técnicas de Colonização Assistida e Modelos Experimentais: O Caso de <i>Isoëtes cangae</i> . . . . .	195
9.3	Experimentos em Mesocosmo <i>Ex Situ</i> e <i>In Situ</i> . . . . .	196
9.4	Resultado do Mesocosmo <i>In Situ</i> e <i>Ex Situ</i> . . . . .	201
9.5	Aclimação de <i>I. cangae</i> em Piscinas no Viveiro de Mudas da Vale em Carajás . . . . .	204
9.6	Ensaio com Diferentes Recipientes de Cultivo durante Aclimação . . . . .	206
9.7	Experimento de Herbivoria <i>In Situ</i> . . . . .	207
9.8	<i>I. cangae</i> como Modelo Experimental e Seu Potencial para Colonização Assistida . . . . .	211
9.9	Experimento de Colonização Assistida com <i>I. cangae</i> . . . . .	212
9.10	Considerações sobre os Experimentos de Colonização Assistida . . . . .	215
9.11	Considerações Finais . . . . .	217
	Referências . . . . .	217

## CAPÍTULO 10

	Técnicas e Inovações para a Produção, o Plantio e a Conservação de <i>Isoëtes cangae</i> . . . . .	223
10.1	Introdução . . . . .	225
10.2	Técnicas para Aumento de Produção de Plantas no Cultivo <i>Ex Situ</i> e para Plantio Direto em Novos Ambientes . . . . .	225
10.2.1	Germinação de plântulas sob matrizes de gel . . . . .	227
10.2.2	Transferência de plântulas para matrizes de gel . . . . .	228
10.2.3	Produção de sementes artificiais contendo megásporos fecundados . . . . .	229
10.3	Banco de Germoplasma . . . . .	231
10.4	Microrganismos Potenciais para Promoção do Crescimento de <i>Isoëtes cangae</i> . . . . .	238
10.4.1	Bactérias endofíticas . . . . .	238
10.4.2	O potencial de fungos micorrízicos arbusculares em <i>Isoëtes cangae</i> . . . . .	244
	Referências . . . . .	246

## CAPÍTULO 11

<b>Considerações Finais e Perspectivas para a Conservação de <i>Isoëtes cangae</i></b> .....	251
11.1 <b>Introdução</b> .....	253
11.2 <b>Instalação de Planta de Cultivo em Larga Escala</b> .....	255
11.3 <b>Sistema de Rustificação em Piscinas</b> .....	256
11.4 <b>Translocação de <i>Isoëtes cangae</i></b> .....	256
11.5 <b>Monitoramento das Novas Populações de <i>Isoëtes cangae</i></b> .	257
11.6 <b>Monitoramento Genético das Populações de <i>Isoëtes cangae</i></b> .....	259
11.6.1 <b>A diversidade genética e o monitoramento nas populações pós-translocação</b> .....	259
11.6.2 <b>Marcadores de desenvolvimento e estresse no monitoramento de plantas</b> .....	260
11.7 <b>Manutenção da Diversidade <i>Ex Situ</i> – Banco de Germoplasma</b> .....	260
11.8 <b>Conclusão e Perspectivas Futuras</b> .....	261
<b>Referências</b> .....	262
<b>Sobre os Autores</b> .....	265

## CAPÍTULO 1

---

---

# Abordagem Integrada da Conservação: O Caso da Macrófita Amazônica *Isoëtes cangae*

\* Jorge Gabriel Fernandes Genovez \* Emiliano Nicolas Calderon  
\* Allysson Buraslan Cavalcante \* Francisco de Assis Esteves  
\* Rodrigo Lemes Martins

TÍTULO CURTO (*RUNNING TITLE*)

---

---

*Isoëtes* e uma Abordagem Integrada de Conservação

## Resumo

A Biologia da Conservação é uma área acadêmica recente que se desenvolveu no final do século passado em resposta à crescente crise da biodiversidade. Como campo do conhecimento nessa área, ela surge pela união de diversas disciplinas, para atender distintas peculiaridades intrínsecas a cada objeto alvo da conservação, que exigem diferentes estratégias. No caso de espécies endêmicas, as estratégias para a conservação tornam-se ainda mais complexas devido à necessidade da conservação de todo o ecossistema, podendo ainda enfrentar dificuldades, como o baixo número de populações e o papel-chave que essas espécies podem assumir na ecologia de ambientes extremos, com baixa diversidade. Os Campos Rupestres Ferruginosos da Flona de Carajás são representantes típicos desses ambientes. Nesse contexto, o presente capítulo traz o foco para o tema central deste livro, as espécies endêmicas *Isoëtes serracarajensis* e *Isoëtes cangae*, que ocorrem exclusivamente nesses ambientes, sendo *I. cangae* uma das espécies dominantes e com endemismo restrito a um único lago. A pequena área de ocorrência e os poucos estudos sobre essa espécie resultaram em sua classificação como uma espécie sob ameaça, por órgãos internacionais. Esse cenário motivou a parceria entre a empresa Vale S. A. e o Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade (NUPEM/UFRJ), mobilizando dezenas de pesquisadores em prol de garantir a perpetuação dessas espécies e seus processos ecológicos relacionados. Logo, neste capítulo, buscamos discutir sobre a importância da interdisciplinaridade na conservação das espécies do gênero *Isoëtes* registradas na Serra dos Carajás, com ênfase na importância de todos os estudos realizados e apresentados em detalhe nos capítulos subsequentes deste livro.

**Palavras-chave:** Carajás; conservação; Isoetaceae; plantas aquáticas.

## 1.1 Biologia da Conservação

A Biologia da Conservação é um campo da biologia que tem se firmado nos últimos anos, dados os complexos efeitos da ação humana sobre os ecossistemas. O termo foi mencionado pela primeira vez em 1978, como título de uma conferência organizada pelos biólogos Bruce Wilcox e Michael E. Soulé, na Universidade da Califórnia, em San Diego, EUA. A conferência tinha como foco a preocupação com o desaparecimento de espécies e a perda da diversidade genética, representando assim um marco na determinação do caráter dessa emergente ciência como eminentemente prática. O foco era avaliar e buscar soluções para remediar o acelerado processo de erosão da capacidade de sustentação da vida, que afeta inúmeras espécies com perdas expressivas de biodiversidade, conceito também desenvolvido no âmbito deste corpo de conhecimento.

Os desdobramentos advindos do estudo da Biologia da Conservação acabaram por verificar que os impactos dos diferentes modelos de desenvolvimento humano são resultado de toda a produção humana, colocando-se como consequência direta de avanços tecnológicos que têm garantido aumentos no tamanho das populações humanas, assim como no consumo de recursos naturais. O alarme sobre os riscos do modelo de desenvolvimento industrial, que permitiu ganho de escala na produção de energia, soaram com a publicação do livro *Primavera Silenciosa*, de Rachel Carson, em 1962. Desde então, a biologia, como a ciência que estuda a vida, tem se debruçado sobre os impactos da ação humana na biodiversidade. Os resultados indicam que atualmente  $\frac{1}{4}$  das espécies encontram-se sob forte pressão de extinção, o que é alarmante, assumindo uma escala de extinção em massa só observada em registros paleontológicos (Allan et al. 2011).

Dessa forma, ao longo do desenvolvimento desse campo de produção de conhecimento, ficou evidente o caráter prático e interdisciplinar dessa ciência. São resgatadas questões das Ciências Naturais e Sociais, uma vez que campos disciplinares independentes, como Ecologia, Sociologia, Antropologia, Meteorologia, Biogeografia, Evolução e Genética, não são abrangentes o suficiente para tratar das ameaças à biodiversidade.

A Biologia da Conservação, basicamente, pesquisa os processos de perda de biodiversidade e a identificação de suas causas e consequências, a fim de elaborar estratégias para manter a preservação das espécies e diminuir os efeitos negativos da degradação do meio ambiente sobre o bem-estar da espécie humana. Por fim, a Biologia da Conservação estabelece-se como ciência que produz dados para orientar a produção de políticas voltadas à con-

servação da biodiversidade, fundamentalmente. Além disso, orienta temas básicos, como a conservação de espécies e até mesmo a mediação de conflitos relacionados às necessidades da população e pressões por modelos de desenvolvimento que não estão alinhados com a sua manutenção.

## 1.2 Diversidade e Biodiversidade

Embora o conceito central sobre a Biologia da Conservação seja o da biodiversidade, o termo ainda não parece ser entendido de forma homogênea entre todos. O conceito foi criado em 1985 a partir da junção das palavras “diversidade” e “biológica”. Posteriormente, em 1986, foi utilizado pelo entomologista E. O. Wilson para expressar toda a diversidade da vida representada em suas múltiplas formas de interação com o meio abiótico de determinada localidade. A dificuldade em compreender o conceito deve-se à sua amplitude e à sua associação com o conceito de diversidade. Por sua vez, o conceito de diversidades também pode variar entre o número de espécies de uma área, também conhecido como riqueza de espécies ou diversidade alfa, e os indivíduos das diferentes espécies que ocorrem em uma localidade (Santra 2016).

O termo biodiversidade carrega em sua essência a ideia de que áreas diferentes podem ser avaliadas com relação à diversidade pela qual a vida se manifesta, como resultado dos processos de evolução biológica. Depois de ganhar projeção política, o termo teve o seu significado delimitado na Convenção sobre Diversidade Biológica, a Rio-92, como “a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, [...], e os complexos ecológicos de que fazem parte; compreendendo ainda a diversidade em uma mesma espécie, entre espécies e de ecossistemas”. Ou seja, a biodiversidade abrange desde a variedade genética entre indivíduos de uma população até os processos ecossistêmicos (UNCBD 1992).

No Brasil, a definição de biodiversidade conceituada pela *United Nations Convention on Biological Diversity* (UNCBD) foi incorporada juridicamente em 1998 pelo Decreto nº 2.519. Embora o processo de legalização jurídica desse termo tenha ocorrido recentemente, desde meados do século XX diversos projetos de lei haviam sido deferidos a fim de garantir a preservação do patrimônio natural brasileiro. Dentre eles, a Lei de Proteção à Fauna e o Código de Pesca, ambos promulgados em 1967, atuam diretamente na proteção de espécies, por meio da obrigatoriedade da licença para caça e a proibição do comércio das espécies silvestres. Já o Código Florestal de 1965 avançou na preservação de ecossistemas florestais, limitando a extração de recursos

desses ambientes. Mais adiante, inúmeras portarias do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e resoluções do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) foram publicadas para ampliar as prevenções à biodiversidade e aumentar a especificidade de leis anteriormente implementadas (Primack e Rodrigues 2001). Atualizações e ampliações de leis continuam sendo necessárias para garantir a preservação em todos os ramos abrangidos pela diversidade biológica, porém, essas legislações ainda estão à mercê dos diferentes governos, progressistas e ambientalmente corretos ou desenvolvimentistas.

A partir da definição legal de biodiversidade, é possível verificar que o conceito pode ser subdividido em diferentes escalas: diversidade genética, diversidade de espécies e diversidade de comunidades e ecossistemas (Primack e Rodrigues 2001). A diversidade gênica refere-se à variação genética entre e dentre populações de uma mesma espécie, assim, permitindo compreender o quão geneticamente distintos são os indivíduos de uma população e entre as gerações. Enquanto a diversidade de espécies concentra-se no número de espécies que compõem uma área e como elas estão distribuídas nesse espaço, a diversidade de comunidades abrange todo complexo ecológico originado a partir da composição de espécies específicas e suas interações em uma determinada área. Por fim, ao se referir à diversidade de comunidades juntamente às questões físicas do ambiente, em uma abordagem que considera a transformação e o fluxo de matéria e energia, entre compartimentos que podem ser descritos, está se tratando da diversidade de ecossistemas (Odum 1988).

É notável o quão interdependentes são as escalas de biodiversidade, pois todas são extremamente necessárias para a perpetuação da complexidade ecológica. Por isso, a perturbação em algum nível de diversidade biológica atinge diretamente os demais. Logo, entender os padrões que guiam a biodiversidade e como preservá-los é de extrema importância para a Biologia da Conservação.

### 1.3 Perdas de Biodiversidade

Embora a preservação da diversidade biológica seja fundamental para a manutenção da vida como conhecemos, a perda da biodiversidade é um processo natural. Catástrofes que ocasionam a perda de três quartos da biodiversidade em um curto período de tempo são caracterizadas como “grandes extinções” (Barnosky et al. 2011). No total, já foram contabilizados cinco des-

ses eventos, sendo causados por mudanças climáticas ou eventos de grande impacto ao meio ambiente, como vulcanismo e colisão de asteroides (Hallam 1990, Rampino e Stothers 1988, Alvarez et al. 1980). Depois do último grande evento de extinção, há aproximadamente 65 milhões de anos, devido à colisão de um corpo rochoso com 10 quilômetros de diâmetro na Península de Iucatã – no atual México –, diversos grupos biológicos não apenas se recuperaram, mas aumentaram a sua diversidade em relação ao período anterior. Inúmeros trabalhos mostram o crescimento substancial da biodiversidade ao longo dos últimos 65 milhões de anos, principalmente em níveis taxonômicos inferiores, como gênero e espécies (Sepkoski et al. 1981, Sepkoski 1984, Bayer e McGhee Jr. 1985, Behrensmeyer e Kidwell 1985, Signor 1990). Esse aumento foi resultado direto da relação entre as taxas de extinção e especiação, tendo um saldo positivo que resultou na atual riqueza biológica da Terra (Benton 1995).

No entanto, em contraste com esse saldo positivo do passado, as atuais taxas de extinção demonstram valores de cem a mil vezes maiores, e estima-se que atualmente, no caso dos mamíferos, para cada 10 mil espécies que são extintas, apenas uma nova surge (Ceballos et al. 2015). Ou seja, as atuais taxas de perda da biodiversidade superam intensamente a velocidade do surgimento de novas espécies (Jonsson 2008), gerando uma mudança abrupta na riqueza biótica. Além disso, embora variações no número de espécies sejam um processo natural ao longo da história da Terra, a relação entre extinção e especialização nunca se mostrou tão negativa à diversidade (Barnosky et al. 2011) – salvo apenas em eventos de grandes extinções. Em virtude disso, diversos autores têm chamado o atual declive da biodiversidade de “a sexta grande extinção” (Leakey e Lewin 1996, Kolbert 2014, Pereira et al. 2010, Barnosky et al. 2011) e, diferentemente, dos cinco últimos eventos, essa não é causada por catástrofes, exclusivamente, ambientais, mas em decorrência das atividades de uma única espécie, o *Homo sapiens* (Chapin et al. 1996, Schultz 2010).

Desde o início do Holoceno – período geológico que corresponde a aproximadamente 100 mil anos – há registros de diversas extinções causadas pelo homem devido à caça excessiva e à dispersão de patógenos (Eldredge 2001). Ao longo dos últimos anos, a expansão de atividades – como a superexploração de recursos, o lançamento de resíduos no meio ambiente e a destruição de *habitats* – aumentou a repercussão das ações humanas na natureza e estabeleceu nossa espécie como importante força evolucionária. Em outras palavras, somos responsáveis pelas atuais pressões seletivas e responsáveis diretos por um cenário de extinção catastrófica.

A busca por reverter esse quadro impulsionou a composição de diversas entidades em prol do meio ambiente. Dentre elas, o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) destaca-se pelo grande impacto internacional e pela organização de eventos importantes como Eco-92, Rio+10 e Rio+20. Os eventos realizados pelo PNUMA tiveram como objetivo promover a proteção da natureza, apresentando propostas para reduzir a atual taxa de perda da biodiversidade, articular medidas para preservação dos ecossistemas, enfrentar as ameaças das mudanças climáticas, e diversas outras.

A participação do Brasil nesses tratados é fundamental dada a compreensão geral da importância e da relevância da biodiversidade nos trópicos e da necessidade de conservação dos ecossistemas e manutenção de sua resiliência. No contexto ecológico, entende-se resiliência de um ecossistema como a capacidade de manutenção da estabilidade dos processos ecossistêmicos e a velocidade de retorno ao equilíbrio desses processos após alguma perturbação (Hodgson et al. 2015). Em ambientes tropicais, como no Brasil, a grande diversidade de espécies está totalmente associada à resiliência dos ambientes (Ewel e Bigelow 1996), pois a alta riqueza tem o potencial de proporcionar a redundância de funções ecológicas entre as espécies contribuindo para a manutenção do funcionamento ecossistêmico (Peterson et al. 1998).

## 1.4 Padrões da Biodiversidade

As florestas tropicais e os recifes de corais são os ambientes que atualmente apresentam maior riqueza de espécies no globo, juntos compreendem cerca de 80 % de toda a biodiversidade da Terra e ambos estão localizados em latitudes tropicais (Savage 1995). No entanto, a latitude não é um fator diretamente decisivo para a diversidade biológica, mas, sim, suas diversas características ambientais e históricas associadas. A alta radiação solar e a temperatura atrelada à latitude são comumente relacionadas como os fatores mais determinantes para a biodiversidade, entretanto, essas sozinhas apenas explicam a maior biomassa e produtividade encontrada nos trópicos, e não a riqueza de espécies (Blackburn e Gaston, 1996).

Apesar de os trópicos tenderem a concentrar maior parte da biodiversidade global, diversos fatores influenciam de forma distinta nesse padrão. Mais de 30 explicações já foram sugeridas, mas ainda não se sabe o suficiente para haver um consenso da efetividade de cada uma delas (Boyero 2011). Porém, nos últimos anos, os fatores histórico-geológicos estão se tornando

cada vez mais aceitos na comunidade científica como um dos elementos mais relevantes para a distribuição das espécies, devido ao maior acúmulo de evidências (Martins e Sano 2009). Além disso, em escalas locais, as questões históricas e geológicas podem assumir um papel de relevância ainda maior, fazendo com que a diversidade local não se assemelhe à diversidade regional (Caley e Schluter 1997).

Um exemplo de causa geológica determinando a distribuição das espécies é a ocorrência de regiões montanhosas na Amazônia, que, apesar de representar uma pequena área relativa desse bioma, possuem características geográficas e edáficas diferentes de seu entorno (Viana et al. 2016). Isso permite que, embora próximas, apresentem composições de espécies totalmente distintas, alterando o quadro de diversidade em uma escala regional. Por isso, é extremamente importante a utilização de índices que compreendam a diversidade nessas diferentes escalas, a fim de obter uma melhor compreensão dos padrões de diversidade e seus determinantes. Para isso, esse conceito foi dividido em três diferentes aspectos (Whittaker 1960): diversidade alfa, correspondente à riqueza de espécie em determinado local; diversidade beta, correspondente à diferença de riqueza entre locais; e diversidade gama, que corresponde à riqueza total de espécies de uma região.

Voltando ao exemplo amazônico, as heterogeneidades ambientais encontradas nas regiões montanhosas formam locais semelhantes a ilhas com alto grau de endemismo e ocorrência de espécies raras (Giulietti et al. 2019). Isso se deve à presença de uma biota caracterizada por adaptações a esse ambiente extraordinariamente peculiar. Nesses casos, a proposta de Whittaker traz a complexidade necessária para compreender a diversidade em suas diferentes escalas. A riqueza específica dessas “ilhas”, embora possam apresentar menor diversidade alfa, contribui fortemente para as diversidades beta e gama do bioma, uma vez que são constituídas por grupos de espécies distintas. Além disso, por meio da diversidade beta, torna-se possível avaliar a heterogeneidade biótica dessas regiões.

## 1.5 Ambientes Extremos e suas Espécies Focais para a Conservação

Estudos em ambientes sujeitos a constantes distúrbios e/ou sob efeito de concentrações (altas ou baixas) de compostos que se impõem como fatores limitantes à maioria dos organismos vivos têm se mostrado cada vez mais interessantes para o entendimento da ecologia de comunidades, no que

tange aos processos de manutenção da diversidade. Esses ambientes seguem as regras gerais dos demais ecossistemas e evoluem a sua complexidade até que se estabeleça um conjunto de espécies com papéis funcionais bem definidos. Neste ponto, podemos observar o estabelecimento de um grupo de espécies de forma mais perene, quando então as populações estabelecidas encontram um tamanho ideal, que torna viável a sua perpetuação. Podemos, portanto, dizer que o grupo de espécies que compõem o total de vida e de produtividade possível em cada sistema, forma-se por um processo sucesional que se encerra ao alcançar uma estrutura ou composição estável, considerada clímax.

No momento clímax de uma comunidade, o grupo de espécies alcançou um acoplamento funcional dos papéis que regulam e sustentam a comunidade, em conjunto com as condições de estresse reinantes. O fato de as populações se estabilizarem em número significa que as espécies que compõem a comunidade passam a manter-se com uma limitada taxa reprodutiva líquida – em média cada indivíduo consegue produzir apenas um outro indivíduo como prole. Cabe lembrar que o acoplamento dessa estrutura populacional é transitório, se considerado que os sistemas são dinâmicos e variam no tempo evolutivo, mas na escala de tempo da vida humana são duradouros.

A mudança da frequência e do tipo dos distúrbios aos quais o sistema estava adaptado pode alterar o equilíbrio ou clímax alcançado por uma comunidade. Os componentes bióticos dessa alteração são de dois tipos:

- (1) a entrada de espécies invasoras, para as quais as demais espécies do ambiente não dispõem de mecanismos coevolutivos de controle;
- (2) a perda das condições tróficas do sistema por impactos antrópicos.

As espécies exóticas que conseguem sobrepujar os mecanismos de regulação de uma comunidade e se estabelecer de forma abundante (dominante) são consideradas invasoras e tendem a monopolizar os recursos do sistema. Assim, a nova estrutura da diversidade imposta pela invasora pode perdurar por maior escala de tempo, de forma proporcional ao tempo de vida da espécie, assim, a sua fisiologia e o seu funcionamento passam a determinar processos evolutivos (Grime 1998, Garnier et al. 2004, Vile et al. 2006). Assim, o efeito de uma dada espécie no funcionamento do ecossistema pode ser previsto a partir da sua contribuição relativa para a biomassa total da comunidade (Hooper e Vitousek 1997). Se considerada uma escala de tempo evolutivo, essa dominância tende a desaparecer pela possibilidade de evolução de espécies associadas ao uso direto da espécie dominante, e pela ocorrên-

cia de distúrbios, particularmente maior em comunidades menos diversas (Proulx et al. 2010, Allan et al. 2011).

Com base no exposto, percebe-se que a dominância de uma única espécie não é comum em ambientes naturais, sendo mais frequentemente observada nos ambientes em que distúrbios constantes tendem a manter reduzidas as chances de colonização por outras espécies. Assim, ambientes com baixa diversidade, pela existência de processos limitantes à vida, permitem que se instale apenas um grupo reduzido de espécies com uma alta redundância funcional, eventualmente fundando sistemas em que há uma oscilação constante da dominância, em função da ocorrência de padrões de distúrbios sazonais.

Voltando ao conceito de resiliência, ele foi criado originalmente no campo científico da física, e refere-se à propriedade que um determinado corpo tem de retornar à sua forma ou propriedade original após sofrer determinado impacto que promova sua deformação. Essa propriedade pode ser mensurada pelo tempo de retorno às condições originais. Ao se apropriar do conceito de resiliência, a ecologia tem se preocupado em relacionar a diversidade de espécies com a capacidade do sistema para retornar à estrutura original, o que é especialmente importante para garantir a conservação de um ecossistema diante de um determinado distúrbio. Neste contexto, estudos sobre ambientes com baixa diversidade têm revelado maior risco de invasões biológicas, ou seja, ambientes diversos têm maior resistência biótica (Stachowicz et al. 2002), porém, os filtros ambientais de áreas extremas tendem a demandar espécies com características funcionais específicas, garantindo somente o estabelecimento das mesmas espécies, o que tende a conferir resiliência ao sistema. O resultado prático desse aparente paradoxo é que, apesar da menor resiliência de sistemas simples, o risco de destruição da estrutura que o compõe é diretamente proporcional à chance de entrada de um conjunto certo de espécies invasoras adaptadas às condições severas. Estas podem tornar-se dominantes em um ambiente natural, e o mesmo pode nunca mais conseguir se recuperar quando as espécies endêmicas deste ecossistema raro se extinguirem.

Atualmente, o homem está presente em praticamente todos os ecossistemas globais, o que amplifica o risco de danos aos ecossistemas raros, perda de espécies e seus respectivos *habitats*. Esse risco é especialmente alto para as espécies que vivem em condições espacialmente restritas e, portanto, endêmicas. O crescimento da população humana ampliou também o risco de alterações de condições naturais, com conseqüente colonização por espécies que se adaptaram aos ambientes degradados pelo homem (espécies sinantrópicas). Assim, tornam-se mais frequentes os fenômenos de colonização

por espécies invasoras que são mais adaptadas a ambientes pobres em recursos, tipicamente produzidos pela ação humana. Como resultado da ação humana, muitas dessas espécies invasoras assumem um padrão de distribuição cosmopolita.

Diante do quadro apresentado, fica patente a importância de estudos em ambientes em constante distúrbio ou estresse, que mantenham certa diversidade, por se constituírem modelos experimentais mais simples e, portanto, fundamentais para teste de hipóteses sobre papéis funcionais e estruturais, assim como processos definidores da diversidade. Pesquisas nesses ambientes estáveis com baixa diversidade permitem estudos no campo de processos de colonização, evolução de condições fisiológicas adaptativas, plasticidade fenotípica, seleção de características de resistência e processos de flutuações de genes e alelos associados à variação na densidade populacional, fundamentais ao avanço da Biologia e da Genética da Conservação.

Mais recentemente, com o processo de industrialização, houve também o crescimento exponencial de ações de degradação de áreas para obtenção de recursos minerais ou pela contaminação de efluentes das atividades industriais. Dessa forma a Biologia da Conservação surge com o interesse de remediar as consequências do modelo de desenvolvimento humano atual e avançar com estratégias aplicadas a condições específicas, para o manejo da biodiversidade, manejo de espécies ameaçadas e para a manutenção de diversidade genética necessária à sobrevivência das espécies, assim como para a proteção e a recuperação de ambientes cada vez mais ameaçados.

## 1.6 Manejo e Conservação de Macrófitas Endêmicas – *Isoetes cangae* como Modelo de Estudo

O termo macrófitas aquáticas refere-se a um grupo diverso de organismos fotossintetizantes, grandes o suficiente para serem vistos a olho nu, que habitam os ambientes aquáticos. Incluem macroalgas das divisões Chlorophyta, das algas verdes, Xanthophyta, das algas amarelas, e Rhodophyta, das algas vermelhas, e a divisão Cyanobacteria, das algas azuis. Incluindo também as divisões de vegetais superiores Bryophyta, Pteridophyta, Tracheophyta e Spermatophyta, esta última referente às plantas com semente (Chambers et al. 2008). Suas estruturas vegetativas desenvolvem-se ativamente, de forma constante ou em intervalos específicos de tempo, podendo estar submersas, flutuando sobre ou crescendo através da superfície da água.

São encontradas em praticamente todos os ambientes aquáticos do mundo, entretanto, as espécies apresentam uma tendência de distribuição restrita, com o endemismo sendo uma importante característica de sua ecologia, em escalas local e global (Murphy et al. 2019). Isso ocorre em função da frequência dos processos de gênese de ecossistemas lacustres e mesmo de isolamento de corpos hídricos em bacias hidrográficas. Esses processos favorecem a colonização com decorrente especiação ou mesmo fenômenos evolutivos de vicariância, definido como eventos em que a distribuição de uma espécie ancestral é fragmentada em diferentes áreas pelo surgimento de barreiras naturais.

Os principais fatores de ameaça às macrófitas aquáticas são os mesmos que também ameaçam boa parte da biodiversidade global, merecendo destaque as mudanças climáticas, a eutrofização e as diferentes formas de poluição dos ambientes e uso do solo, que em última análise resultam na perda de *habitat* que permite a sobrevivência das espécies (Lambert e Davy 2010, Reitsemá et al. 2018, Murphy et al. 2019). O risco para as macrófitas é particularmente maior em se tratando das espécies endêmicas, as quais podem ter grande parte ou mesmo toda a população existente exposta a ameaças locais, podendo resultar em sua extinção. Assim, é fundamental o desenvolvimento de ferramentas e modelos biológicos que permitam a realização de esforços de manejo efetivos, buscando a conservação das espécies e dos ecossistemas que habitam tanto em escala local quanto em global (Akasaka et al. 2018, Stefanidis e Papastergiadou 2019).

A América do Sul, em especial a Região Amazônica, apresenta um papel de destaque, abrigando grande diversidade de macrófitas aquáticas, associada à alta taxa de endemismo (Córdova et al. 2022). Dentre estas, merece destaque a família Isoetaceae, pertencente à divisão Tracheopyta. A família Isoetaceae é composta por um único gênero, *Isoëtes*, compreendendo aproximadamente 250 espécies (Troia et al. 2016, Pereira et al. 2017a). A maioria das espécies é aquática ou semiaquática, ocorrendo geralmente em lagos ou ambientes lênticos oligotróficos distribuídos desde o ambiente subártico até os tropicais (Brunton e Troia 2018). Sua ocorrência pode ser ampla (Hickey et al. 2003), mas algumas espécies apresentam uma distribuição restrita a poucos locais (Liu et al. 2005, Pereira et al. 2016, Abeli et al. 2018), podendo ocorrer alta taxa de endemismo e diversificação local.

O risco de extinção das espécies do gênero é compartilhado com as demais macrófitas, tendo sido reportado por diversos autores (Barni et al. 2013, Garcia Criado et al. 2017, Abeli et al. 2018, Caldeira et al. 2019). Adicionalmente, as isoetáceas e os ambientes onde ocorrem são considerados entre os

mais sensíveis a impactos, sendo assim mundialmente ameaçados (Free et al. 2009, Garcia Criado et al. 2017). Na última década tem sido relatada uma redução global das populações de *Isoëtes*, em especial para as espécies classificadas em alguma categoria de risco de extinção (Oh et al. 2013, Pereira et al. 2016, Abeli et al. 2018).

A diversidade do grupo é particularmente alta na América do Sul, com ocorrência de aproximadamente 74 espécies, o que representa aproximadamente 30 % da diversidade global (Troia et al. 2016, Pereira et al. 2016, 2017a, 2017b, 2019b, Brunton e Pereira 2020). O Brasil representa o maior foco dessa diversidade, com a ocorrência de 31 espécies, dentre as quais a grande maioria (entre 22 e 27) é endêmica, restrita a sítios específicos do nosso território (Troia et al. 2016, Pereira et al. 2017a, 2017b, 2019a, 2019b, Brunton e Pereira 2020). O conhecimento dessa diversidade é recente, uma vez que, do total de espécies sul-americanas, aproximadamente 14 % foram descritas nos últimos 12 anos. Isto mostra que o conhecimento sobre esse grupo de vegetais superiores está em forte expansão.

Dentre as espécies do gênero recentemente descritas, duas são provenientes dos campos ferruginosos da Serra dos Carajás – Pará (Pereira et al. 2016). A espécie anfíbia *Isoëtes serracarajensis* é encontrada sazonalmente em diversos ambientes alagados dos platôs ferruginosos de Carajás, enquanto *Isoëtes cangae* é uma espécie submersa aquática restrita a um único lago, localizado na parte sul da Serra dos Carajás, chamado Lago do Amendoim, na área próxima à atual lavra de minério de ferro e coincidente com o avanço de lavra do Projeto Ferro Carajás. Devido à restrita área de ocorrência e ao pouco conhecimento sobre a espécie, *I. cangae* foi classificada como “criticamente ameaçada” na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da International Union for Conservation of Nature and Natural Resources – IUCN (Lansdown, 2019).

Nesse contexto, o Instituto Chico Mendes de Biodiversidade, órgão de gestão pública de caráter regulador e fiscalizador, ligado ao Ministério do Meio Ambiente, estabeleceu como condicionante ao Projeto Ferro Carajás que a lavra na área do Lago do Amendoim fosse autorizada apenas se *I. cangae* fosse encontrada em outra(s) área(s) fora da Área Diretamente Afetada (ADA) pelo projeto. Essa decisão, orientada pela Convenção da Biodiversidade, da qual o Brasil é signatário, estabelece que não são permitidas perdas líquidas de diversidade por seus países-membros.

A vulnerabilidade de *I. cangae* e a condicionante imposta pelo órgão ambiental, embasada na legislação vigente, estimularam a realização de diversos estudos sobre a distribuição da espécie e a sua biologia, buscando

subsidiar medidas de manejo e conservação da espécie. Nesses seis anos, desde o reconhecimento da existência da espécie, foram alcançados notáveis avanços no conhecimento sobre a reprodução, a genética, a fisiologia e a ecologia. O conhecimento gerado por essas pesquisas tem sido empregado no desenvolvimento de estratégias práticas e inovadoras para a conservação da espécie e destacado *Isoëtes cangae* como um excelente modelo biológico, considerando os fatores que globalmente ameaçam as macrófitas e seus ambientes. Dessa forma, os avanços de conhecimento, do reconhecimento da espécie até o desenvolvimento de estratégias de conservação, podem ser replicados visando à conservação de outras espécies de macrófitas endêmicas no Brasil e em outras partes do mundo.

## 1.7 O Caso *Isoëtes* – o Livro e sua Relevância

Os estudos com as *Isoëtes* da Serra dos Carajás tiveram início em 2014, a partir de um grupo de pesquisadores do Instituto Tecnológico Vale para o Desenvolvimento Sustentável (ITVDS). Esses estudos acabaram por delinear uma parceria entre a Vale S. A. e a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), mais especificamente com o Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade (NUPEM), com o objetivo de implementar uma série de ações que visavam avançar no conhecimento da ecologia, da morfologia e da fisiologia de espécies do gênero *Isoëtes* registradas nos Campos Rupestres Ferruginosos da Flona de Carajás e platôs do entorno.

O convênio entre ITVDS, NUPEM e Vale acabou por avançar em uma série de resultados únicos e protocolos de conservação da biodiversidade *ex situ* e *in situ*, que se configura como o maior esforço temporalmente concentrado para a conservação de uma espécie aquática, além do maior esforço de pesquisa para uma espécie de Licófitas e o experimento de maior escala com uma espécie do grupo.

Para isso, foi mobilizada uma equipe de mais de 40 pesquisadores das áreas de taxonomia, fisiologia, ecologia, botânica, genética, química e microbiologia, que incorporaram a perspectiva multidisciplinar necessária a tamanho esforço de conservação.

Na atual fase de conhecimento sobre a espécie, faz-se mister a produção desta obra que pretende versar sobre os diferentes aspectos já compreendidos sobre a história de vida e ecologia das *Isoëtes* de Carajás, com ênfase na endêmica *I. cangae*, cumprindo com a agenda de conservação desta espécie

e com o compromisso das instituições de pesquisa envolvidas na sua missão de produzir conhecimento científico e prático útil à sociedade.

O conhecimento produzido está organizado de forma a criar uma sequência lógica de entendimento da ecologia e da conservação de *I. cangae* a partir da apresentação dos sistemas lacustres de Carajás (capítulo 2); passando pela apresentação sobre o processo de identificação e descrição da espécie (capítulo 3); o entendimento de questões genéticas e reprodutivas relacionados à espécie (capítulos 4 e 5); a fisiologia da espécie (capítulo 6); o conhecimento de técnicas que visam à produção vegetal e à conservação (capítulo 7); a avaliação de condições ecológicas em sistemas naturais (capítulo 8) para o estabelecimento de populações, como estratégia para a conservação da espécie (capítulo 9); e, por fim, protocolos e técnicas auxiliares na conservação, citando a criação do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) e o protocolo de inoculação de promotores de crescimento (capítulo 10).

Por fim, os organizadores do livro escrevem uma seção que visa traçar novos rumos para a conservação de *Isoëtes cangae* (capítulo 11 – Considerações Finais) levando em conta os riscos potenciais para a conservação desta espécie endêmica em um cenário imposto pela perspectiva de avanço da área de lavra para a mineração, o risco de introdução de predadores exóticos (como o caso tilápia, introduzida no Lago das Três Irmãs) e o quadro prognóstico de rápida alteração do regime climático (IPCC, 2021) que se impõe como ameaça à biodiversidade global.

## Referências

- Abeli, T. et al. 2018. A gleam of hope for the critically endangered *Isoëtes malinverniana*: Use of small-scale translocations to guide conservation planning. – *Aquat Conserv* 28: 501-505.
- Akasaka, M. et al. 2018. Landscape- and local-scale actions are essential to conserve regional macrophyte biodiversity. – *Front Plant Sci* 9: 599.
- Allan, E. et al. 2011. More diverse plant communities have higher functioning over time due to turnover in complementary dominant species. – *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 17034-17039.
- Alvarez, L. W. et al. 1980. Extraterrestrial Cause for the Cretaceous-Tertiary Extinction. – *Science* 208: 1095-1108.

- Barni, E. et al. 2013. Estimating influence of environmental quality and management of channels on survival of a threatened endemic quillwort. – *Aquat Bot* 107: 39-46.
- Barnosky, A. D. et al. 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? – *Nature* 471: 51-57.
- Bayer, U. e McGhee Jr, G. R. 1985. Evolution in marginal epicontinental basins: the role of phylogenetic and ecological factors. Ammonite replacements in the German Lower and Middle Jurassic. – *Sedimentary and evolutionary cycles*: 164-220.
- Behrensmeyer, A. K. e Kidwell, S. M. 1985. Taphonomy's Contributions to Paleobiology. – *Paleobiology* 11: 105-119.
- Benton, M. J. 1995. Diversification and Extinction in the History of Life. – *Science* 268: 52-58.
- Blackburn, T. M. e Gaston, K. J. 1996. A sideways look at patterns in species richness, or why there are so few species outside the tropics. – *Biodivers Lett* 3: 44-53.
- Boyero, L. 2011. Gradientes latitudinais na biodiversidade. – *Ecologia. Info* 32.
- Brunton, D. F. e Troia, A. 2018. Global review of recent taxonomic research into *Isoëtes* (Isoetaceae), with implications for biogeography and conservation. – *Fern Gaz* 20: 309-333.
- Brunton, D. F. e Pereira, J. B. S. 2020. Description of *Isoëtes afloramientorum*, sp. nov. (Isoetaceae), and a second record for *Isoëtes santacruzensis*, two granite outcrop quillworts in Bolivia. – *Phytotaxa* 451: 215-222.
- Caldeira, C. F. et al. 2019. Sporeling regeneration and *ex situ* growth of *Isoëtes cangae* (Isoetaceae): Initial steps towards the conservation of a rare Amazonian quillwort. – *Aquat Bot* 152: 51-58.
- Caley, M. J. e Schluter, D. 1997. The relationship between local and regional diversity. – *Ecology* 78: 70-80.
- Ceballos, G. et al. 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. – *Sci Adv* 1: e1400253.
- Chambers, P. A. et al. 2008. Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. – In: Balian, E. V. et al. (eds), *Freshwater Animal Diversity Assessment. Developments in Hydrobiology*. Springer Netherlands, pp. 9-26.

- Chapin III, F. S. et al. 1996. The functional role of species in terrestrial ecosystems. – In: Global change in terrestrial ecosystems. Walker, B. (ed). Cambridge University Press.
- Córdova, M. O. et al. 2022. Aquatic Macrophytes in Southern Amazonia, Brazil: Richness, Endemism, and Comparative Floristics. – *Wetlands* 42: 27.
- Eldredge, N. 2001. The sixth extinction. – *An ActionBioscience*. American Institute of Biological Sciences.
- Ewel, J. J. e Bigelow, S. W. 1996. Plant Life-Forms and Tropical Ecosystem Functioning. Orians, G. H. et al. (eds.). – *Biodiversity and Ecosystem Processes in Tropical Forests*: 101-126.
- Free, G. et al. 2009. The identification, characterization and conservation value of isoetid lakes in Ireland. – *Aquat Conserv* 19: 264-273.
- Garcia Criado, M. et al. 2017. European red list of lycopods and ferns. – IUCN: Brussels, Belgium.
- Garnier, E. et al. 2004. Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. – *Ecology* 85: 2630-2637.
- Giulietti, A. M. et al. 2019. Edaphic endemism in the Amazon: vascular plants of the canga of Carajás, Brazil. – *Bot Rev* 85: 357-383.
- Grime, J. P. 1998. Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. – *J Ecol* 86: 902-910.
- Hallam, A. 1990. The end-Triassic mass extinction event. In: Sharpton, V. L. e Ward, P. D. (eds.), *Global Catastrophes in Earth History: An Interdisciplinary Conference on Impacts, Volcanism, and Mass Mortality*. – *Geol Soc Am Spec* 247: 577-583.
- Hickey, R. J. 1986. The early evolutionary and morphological diversity of *Isoëtes*, with descriptions of two new Neotropical species. – *Syst Bot* 11: 309-321.
- Hickey, R. J. et al. 2003. A re-evaluation of *Isoëtes savatieri* Franchet in Argentina and Chile. – *Am Fern J* 93: 126-136.
- Hodgson, D. et al. 2015. What do you mean, ‘resilient’? – *Trends Ecol Evol* 30: 503-506.
- Hooper, D. U. e Vitousek, P. M. 1997. The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. – *Science* 277: 1302-1305.

- IPCC. 2021. Six Assessment Report – AR6 WGI.
- Jonsson, M. 2008. Perda de Biodiversidade e Funcionamento dos Ecossistemas. – Ecologia. Info 30.
- Kolbert, E. 2014. The Sixth Extinction: An Unnatural History. – A&C Black.
- Lambert, S. J. e Davy, A. J. 2011. Water quality as a threat to aquatic plants: discriminating between the effects of nitrate, phosphate, boron and heavy metals on charophytes. – New Phytol 189: 1051-1059.
- Lansdown, R. V. 2019. *Isoëtes cangae*. – The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T136249847A136250011.
- Leakey, R. E. e Lewin, R. 1996. The sixth extinction: biodiversity and its survival. – Weidenfeld e Nicolson.
- Liu, X. et al. 2005. Current status and conservation strategies for *Isoëtes* in China: a case study for the conservation of threatened aquatic plants. – Oryx 39: 335-338.
- Martins, M. e Sano, P.T. 2009. Biodiversidade Tropical. 1ª ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.
- Murphy, K. et al. 2019. World distribution, diversity and endemism of aquatic macrophytes. – Aquat Bot 158: 103127.
- Odum, E. P. 1988. Ecologia. – Guanabara Koogan.
- Oh, M. J. et al. 2013. High frequency sporophytes regeneration from the spore culture of the endangered aquatic fern *Isoëtes coreana*. – Am J Plant Sci 4: 14-20.
- Pereira, H. M. et al. 2010. Scenarios for Global Biodiversity in the 21st Century. – Science 330: 1496-1501.
- Pereira, J. B. D. S. et al. 2016. Two new species of *Isoëtes* (Isoetaceae) from northern Brazil. – Phytotaxa 272: 141-148.
- Pereira, J. B. de S. et al. 2017a. Flora of the cangas of Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Isoetaceae. – Rodriguésia 68: 853-857.
- Pereira, J. B. S. et al. 2017b. *Isoëtes nana*, a new species from the coastal mountains of southeastern Brazil. – PhytoKeys 89: 91-105.
- Pereira, J. B. de S. et al. 2019a. *Isoëtes dubsii* and *Isoëtes santacruzensis*, two new species from lowland areas in South America. – PhytoKeys 131: 57-67.

- Pereira, J. B. S. et al. 2019b. Nuclear multi-locus phylogenetic inferences of polyploid *Isoëtes* species (Isoëtaceae) suggest several unknown diploid progenitors and a new polyploid species from South America. – Bot J Linn Soc 189: 6-22.
- Peterson, G. et al. 1998. Ecological resilience, biodiversity, and scale. – Ecosystems 1: 6-18.
- Primack, R. B. e Rodrigues, E. 2001. Biologia da Conservação. – Planta.
- Proulx, R. et al. 2010. Diversity promotes temporal stability across levels of ecosystem organization in experimental grasslands. – PLoS One 5: e13382.
- Rampino, M. R. e Stothers, R. B. 1988. Flood basalt volcanism during the past 250 million years. – Science 241: 663-668.
- Reitsema, R. E. et al. 2018. The future of freshwater macrophytes in a changing world: Dissolved organic carbon quantity and quality and its interactions with macrophytes. – Front Plant Sci 9: 629.
- Santra, S. C. 2016. Environmental science. – In: New Central Book Agency Pvt. Ltd.
- Savage, J. M. 1995. Systematics and the biodiversity crisis. – BioScience 45: 673-679.
- Schultz, C. L. 2010. Extinções. – In: CARVALHO, I. de S. (ed), Paleontologia: conceitos e métodos. 3ª ed. Interciência, pp. 163-180.
- Sepkoski, J. J. et al. 1981. Phanerozoic marine diversity and the fossil record. – Nature 293: 435-437.
- Sepkoski, J. J. 1984. A kinetic model of Phanerozoic taxonomic diversity. III. Post-Paleozoic families and mass extinctions. – Paleobiology 10: 246-267.
- Signor, P. W. 1990. The geologic history of diversity. – Annu Rev Ecol Syst 21: 509-539.
- Stachowicz, J. J. et al. 2002. Biodiversity, invasion resistance, and marine ecosystem function: Reconciling pattern and process. – Ecology 83: 2575-2590.
- Stefanidis, K. e Papastergiadou, E. 2019. Linkages between macrophyte functional traits and water quality: insights from a study in freshwater lakes of Greece. – Water 11: 1047.
- Troia, A. et al. 2016. The genus *Isoëtes* (Isoetaceae): a provisional checklist of the accepted and unresolved taxa. – Phytotaxa 277: 101-145.

United Nations Convention on Biological Diversity (UNCBD). 1992. – Secretariat of the Convention for Biological Diversity.

Viana, P. L. et al. 2016. Flora of the cangas of the Serra dos Carajás, Pará, Brazil: history, study area and methodology. – *Rodriguésia* 67: 1107-1124.

Vile, D. et al. 2006. Ecosystem productivity can be predicted from potential relative growth rate and species abundance. – *Ecol Lett* 9: 1061-1067.

Whittaker, R. H. 1960. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. – *Ecol Monogr* 30: 279-338.

## CAPÍTULO 2

---

---

# Os Lagos de Altitude da Amazônia: Um Estudo de Caso na Serra dos Carajás

*\* Anderson da Rocha Gripp \* Clarice Casa Nova \* Paloma Marinho Lopes  
\* Vinícius F. Farjalla \* Daniel da Silva Farias \* Adriano Caliman  
\* Luciana Carneiro \* Erica P. Caramaschi \* Roger P. Mormul  
\* Analy Machado de Oliveira Leite \* Paula Veronesi Marinho Pontes  
\* Renan Monte de Oliveira \* Thainá dos Santos Silva Araujo  
\* Lupis Ribeiro Gomes Neto \* Hugo Emiliano de Jesus  
\* Henrique Fragoso dos Santos \* José Augusto Pires Bitencourt  
\* José Tasso Felix Guimarães \* Cecílio Frois Caldeira  
\* Reinaldo Luiz Bozelli \* Francisco de Assis Esteves*

TÍTULO CURTO (*RUNNING TITLE*)

---

---

Os Lagos da Serra dos Carajás

## Resumo

Diferentemente dos demais ecossistemas lacustres comumente estudados na Região Amazônica, típicos de planícies de inundação e de terra firme, os lagos de altitude estão estabelecidos sobre crostas lateríticas e são acumuladores de águas pluviais. Boa parte desses ecossistemas encontra-se na Floresta de Carajás, no sudeste do Pará, em meio às suas serras e a um mosaico de Unidades de Conservação. Este capítulo constitui um esforço de síntese dos principais resultados que permitem entender a origem, a geologia, a hidrologia e a limnologia desses ecossistemas. Os lagos de altitude da Serra dos Carajás apresentam bacias de captação pequenas e são mormente rasos, porém, morfométrica e limnologicamente distintos. Essas condições os tornam consideravelmente biodiversos, abrigando ricas comunidades fitoplancônicas, zooplancônicas, perifíticas, bacterianas, de macrófitas aquáticas, de invertebrados aquáticos e bentônicos, mas pobres em peixes (concentrados sobretudo nos lagos profundos da região). A maior parte desses ambientes são rasos, temporários e apresentam maior riqueza de espécies e dissimilaridade na composição se comparados aos lagos profundos, reforçando a hipótese de que a morfometria desses ambientes é um aspecto determinante dos padrões de diversidade. Esses lagos são heterogêneos, sujeitos à dessecação e apresentam certo grau de isolamento, que impõe limitações de dispersão a alguns organismos. Todos esses fatores contribuem para que esses ecossistemas apresentem considerável grau de endemismo. Como exemplo, pode-se destacar a planta aquática *Isoëtes cangae* que, devido à sua ocorrência restrita, às alterações climáticas e às perturbações ambientais de natureza antrópica, é uma espécie focal para a definição de estratégias de manejo e conservação que evitem a perda líquida de biodiversidade na Serra dos Carajás.

**Palavras-chave:** morfometria; hidrogeologia; limnologia; biodiversidade; endemismos.

## 2.1 Introdução

A Região Amazônica abrange uma área de aproximadamente 7,58 milhões de km<sup>2</sup>, o que corresponde a cerca de 40 % da área da América do Sul. Esse território abriga a maior bacia hidrográfica do globo e uma grande variedade de climas, formações vegetais e ambientes aquáticos, além de uma rica biodiversidade, com ecossistemas únicos no mundo (Mittermeier et al. 2003, Vieira 2005, Junk 2007). Entre eles, encontram-se inúmeras bacias lacustres. Historicamente, as pesquisas sobre os ecossistemas lacustres na região enfocaram na compreensão da estrutura e do funcionamento dos lagos de várzea e de terra firme, regidos pela dinâmica das águas fluviais típicas de sistemas rio-planície de inundação (Junk 1999, Bozelli et al. 2000), em detrimento da dinâmica dos lagos formados pelo acúmulo de águas pluviais, como os presentes nas crostas lateríticas (Costa et al. 2005).

Essas crostas lateríticas estão dispostas, geralmente, em partes mais altas do relevo, como regiões montanhosas, a exemplo da Serra dos Carajás. Esta região é recoberta por uma fitofisionomia denominada “vegetação rupestre sobre canga” ou “campo rupestre ferruginoso”, composta por espécies xerófitas de pequeno porte e adaptadas a tolerar condições ambientais extremas (Giulietti et al. 2019, Viana et al. 2016), como solos ácidos, oligotróficos e com altas concentrações de metais pesados biodisponíveis, além de altas temperaturas e forte sazonalidade climática, com estações secas e chuvosas bem definidas (Gagen et al. 2019). Os ambientes lacustres dessa região (figura 2.1) encontram-se situados principalmente em meio a essa matriz de *canga* que, por sua vez, se encontra envolta por uma floresta ombrófila densa ou mista que separa as diferentes ecorregiões da Serra dos Carajás (norte, sul e leste). Pela relevância ecológica de todos esses ambientes, a área foi transformada em uma Unidade de Conservação (UC) de Uso Sustentável, na categoria de Floresta Nacional (Flona). A Flona de Carajás não se encontra na condição de fragmento isolado, pois se conecta com outras áreas protegidas, ajudando a compor um mosaico de unidades de conservação no sudeste do Pará.



**Figura 2.1** Ecossistemas lacustres da região da Serra dos Carajás. (A) Lago da Mata; (B) Lago S11-B, ambientes rasos e temporários; (C) Lago N1-G, ambiente raso e perene; e (D) Lago do Amendoim, ambiente profundo e perene.

Fonte: Acervo Limnologia UFRJ (A-C) e João Marcos Rosa/ITV (D).

Nesse cenário, em meio à Região Amazônica, em um conjunto de serras que se apresentavam ao sertanejo como campos de altitude, de 695-725 m acima do nível médio do mar (AMSL), encontra-se um conjunto de lagos, isolados entre si, bem como de outros ecossistemas aquáticos de porções mais baixas da região. Esses lagos apresentam bacias de drenagem com declividades relativamente altas ( $> 20^\circ$  e  $> 50^\circ$ ), áreas superficiais muito pequenas ( $< 0.5 \text{ km}^2$ ) e profundidades reduzidas (médias  $< 10 \text{ m}$ ) (Silva et al. 2018). Cabe ressaltar que as condições supramencionadas, os aspectos regionais e o isolamento conferem características e dinâmicas marcantes e singulares a estes corpos hídricos. Também, dados o isolamento e as particularidades das condições e espécies (Giller et al. 2004), esses ambientes constituem importantes áreas de endemismos da biodiversidade aquática.

Conhecer esses ambientes é fundamental para a conservação da sua biodiversidade, bem como para o estabelecimento de estratégias, conciliando a sua preservação com as atividades produtivas na Flona de Carajás (Martins et al. 2018). Este capítulo consiste em um esforço de síntese dos principais resultados que permitem caracterizar a estrutura e a dinâmica dos lagos de altitude da Serra dos Carajás, com especial atenção à questão dos endemismos, principalmente da planta aquática *Isoëtes cangae*, espécie de ocorrên-

cia restrita e exclusiva ao Lago do Amendoim, listada como “criticamente ameaçada” pela IUCN (Landsdown 2019).

## 2.2 Caracterização dos Ambientes Lacustres da Serra dos Carajás

### 2.2.1 Aspectos morfossedimentares e hidrogeológicos

As crostas lateríticas da Serra dos Carajás foram formadas a partir do intemperismo de formações ferríferas bandadas e rochas metavulcanossedimentares há cerca de 65 milhões de anos, resultante do estabelecimento de um clima tropical úmido na região (Vasconcelos et al. 1994, Maurity e Kotschoubey 1995). Ciclos sucessivos de intemperismo, reativação de falhas tectônicas preexistentes e colapso dessas crostas lateríticas, durante os últimos 5 milhões de anos, produziram depressões as quais, em alguns casos, evoluíram para lagos de altitude (Souza-Filho et al. 2020).

Tais crostas lateríticas apresentam formação bem lenta, portanto, com inexpressiva estratificação do solo. Consequentemente, o solo ou sedimento é muito drenado, apresentando baixa retenção de água e poucos nutrientes, favorecendo o desenvolvimento da vegetação de canga, em detrimento das formações florestais predominantes no entorno. Consequentemente, manchas de floresta ombrófila ocorrem somente em locais onde o solo apresenta maior gradação, ao longo de feições estruturais e/ou diferentes litologias, como rochas máficas (basaltos). Essas rochas, mais sensíveis ao intemperismo, podem produzir horizontes espessos de solo, com altas cargas de nutrientes e disponibilidade de água (Nunes et al. 2015). Essas duas formações vegetais são comumente observadas nas bacias de drenagem dos lagos de altitude da região.

A partir da caracterização morfométrica e hidrológica de 48 lagos ao longo de quatro anos (2005-2008), feita pelo projeto “Estudos Limnológicos da Flona de Carajás”, fruto da parceria firmada entre a Vale e o Laboratório de Limnologia (UFRJ), ficou constatado que os ambientes aquáticos lênticos da região possuem uma pequena variação na distribuição de tamanho. Em geral, sua área varia em duas ordens de magnitude, de 0,13 a 227,7 hectares (ha), sendo a maioria de pequeno tamanho, com média de 5,91 ha. Por outro lado, a variação de volume foi substancialmente maior, compreendendo cerca de cinco ordens de magnitude, de 56 m<sup>3</sup> a 1 944 460 m<sup>3</sup>. Ainda com base nos dados morfológicos, frutos dos estudos geofísicos realizados na área, os lagos da região podem ser classificados como circulares a subcirculares

e côncavos, formados principalmente por processos de dissolução (Souza-Filho et al. 2020).

Os lagos de altitude são hidrologicamente restritos e possuem espaço de acomodação variável para a deposição de sedimentos, sendo classificados como: lagos ativos, que possuem lâmina d'água ao longo de todo o ano; e inativos, que representam pântanos de altitude (Reis et al. 2017). Os lagos ativos podem ser caracterizados como rasos temporários (com profundidade variando de 0 a 1,3 m ao longo do ano), rasos perenes (variando de 0,1 a 2,4 m) e profundos (profundidades sempre maiores do que 2,5 m). Considerando a área total compreendida pelos ecossistemas aquáticos da região, os ambientes rasos contribuem com 55,66 %, valor ligeiramente maior do que os profundos, com 44,34 %. Entretanto, em relação ao volume d'água, os ambientes profundos da Serra dos Carajás contribuem com 90,21 % do volume total estimado de água.

Os estudos hidrogeológicos na Serra dos Carajás focaram nas bacias dos lagos ativos profundos, especificamente nos lagos do Amendoim, do Violão e Três Irmãs (figura 2.2). As bacias de drenagem dos lagos ativos do Violão e do Amendoim são separadas por uma bacia intermediária que impede a conexão da água entre eles. A bacia do Lago do Amendoim foi outrora composta por dois lagos ativos, sendo o menor deles localizado na porção oeste, progressivamente preenchido por sedimentos detríticos e orgânicos, evoluindo então para um pântano de altitude, densamente colonizado por macrófitas (Guimarães et al. 2017). Por sua vez, o Lago Três Irmãs é constituído por três corpos, conectados onde a água flui, seguindo um gradiente topográfico do corpo 1 até o corpo 3, formando uma pequena cachoeira entre eles (Silva et al. 2018).

Com base nos dados sedimentares, o material depositado no fundo dos lagos foi gerado por processos de sedimentação/decantação sob condições de baixa energia hidrodinâmica, e pouco influenciados por processos pós-depositacionais, exceto o corpo 2 do Lago Três Irmãs, que é mais raso, e no período de estiagem tem uma grande área exposta às ações dos fatores climáticos/atmosféricos. As porções marginais e mais rasas do Lago do Violão apresentam crostas lateríticas e turfas, respectivamente, enquanto lamas oxidadas cobrem a maior parte de sua bacia central. Por outro lado, lamas orgânicas predominam no fundo dos lagos do Amendoim e Três Irmãs, exceto no corpo 3, onde turfas são amplamente encontradas em todas as profundidades.

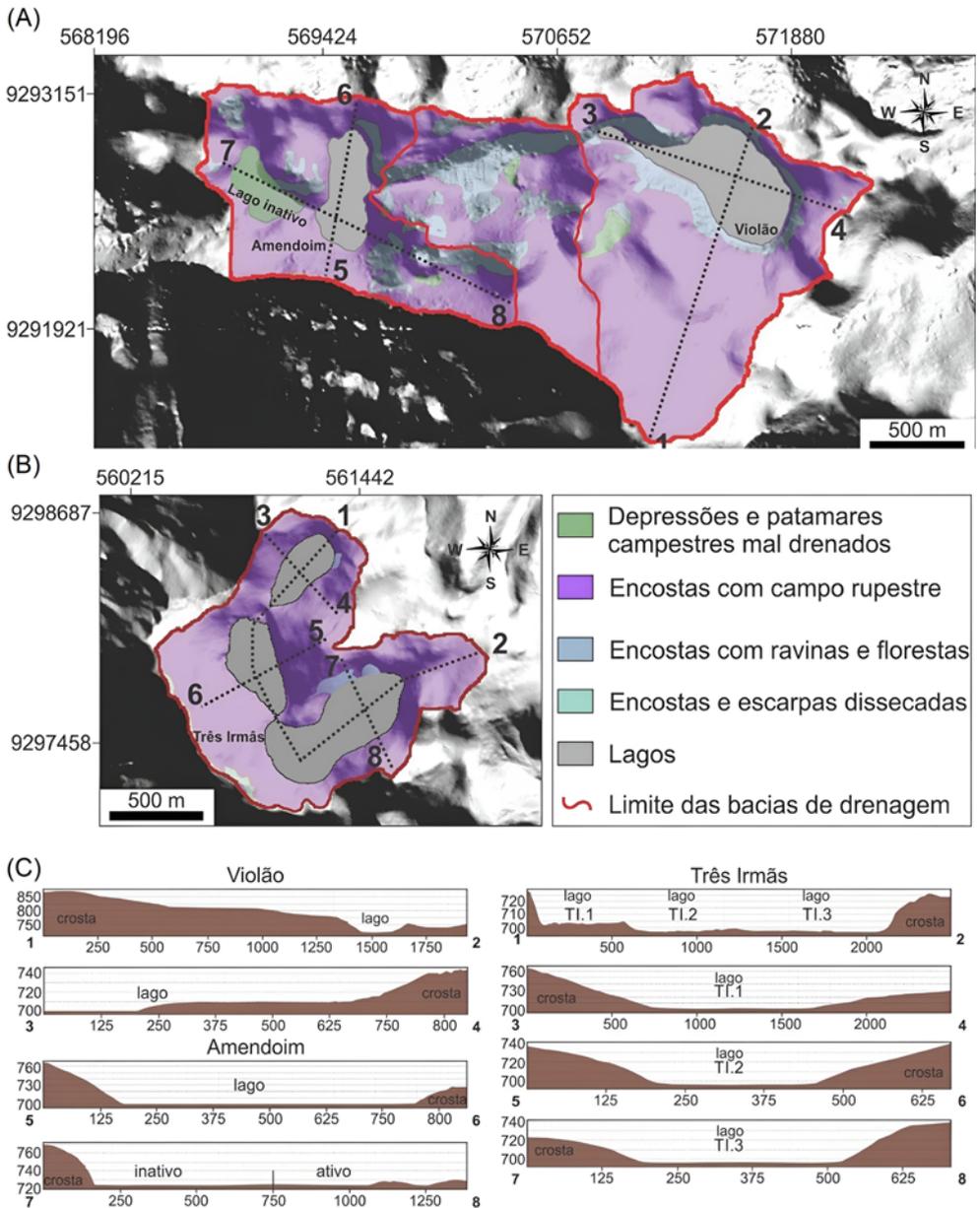


Figura 2.2 Mapa geomorfológico das bacias de drenagem dos lagos (A) do Violão, do Amendoim, e (B) Três Irmãs, conforme Rezende e Barbosa (1972), e Golder (2010), com (C) seções topográficas de cada bacia; altitude e distância estão em metros.

## 2.2.2 Caracterização climática e hidrológica

O clima na região da Serra dos Carajás é tropical de monções, com média anual de 26 °C (Alvares et al. 2014). O período chuvoso (outubro a maio) apresenta precipitação média acumulada de aproximadamente 1 450 mm, enquanto no período seco (junho a setembro) é de 235 mm (Sahoo et al. 2016a). Com períodos de seca e chuva bem definidos, aproximadamente 80 % de toda precipitação anual ocorre entre dezembro e maio (Silva Júnior et al. 2017).

Os ambientes aquáticos da Serra dos Carajás são tipicamente acumuladores de águas pluviais, e o nível d'água, mesmo dos ambientes com maior capacidade de carga (como os lagos profundos), responde, em questão de horas, às variações de precipitação (Sahoo et al. 2016a; figura 2.3). A figura 2.3 mostra a profundidade do Lago do Amendoim e corpo 3 do Lago Três Irmãs, medida em um ponto fixo em cada um deles, e indica as variações de nível, especificamente para esses pontos. Embora isso limite comparações a respeito da profundidade real dos ambientes, comparações em relação à magnitude de variação do nível d'água ao longo do tempo entre os lagos são factíveis. Tomando-se como exemplos esses lagos, localizados relativamente próximos, em Serra Sul, é possível verificar que uma precipitação semelhante repercute em tendências temporais de variação de nível d'água semelhantes em ambos os ambientes ao longo do tempo. A profundidade varia consideravelmente ao longo do ano, aumentando no período de chuvas e reduzindo à medida que as chuvas cessam, o que se dá principalmente a partir da evaporação da água. Mas as amplitudes de variação anual e total (ao longo dos seis anos avaliados) são maiores para o corpo 3 do Lago Três Irmãs (anual: máximo de 3,43 m, média de  $2,7 \pm 0,9$  m; total: 5,2 m) do que para o Lago do Amendoim (anual: máximo de 2,88 m, média de  $2,3 \pm 0,5$  m; total: 4,4 m). Para um volume semelhante de chuvas, a maior bacia de captação do Lago Três Irmãs repercute em maiores variações de nível d'água. Sendo assim, a dinâmica hidrológica reflete a interação do regime de chuvas, da temperatura e das características morfométricas das bacias lacustres da Serra dos Carajás.

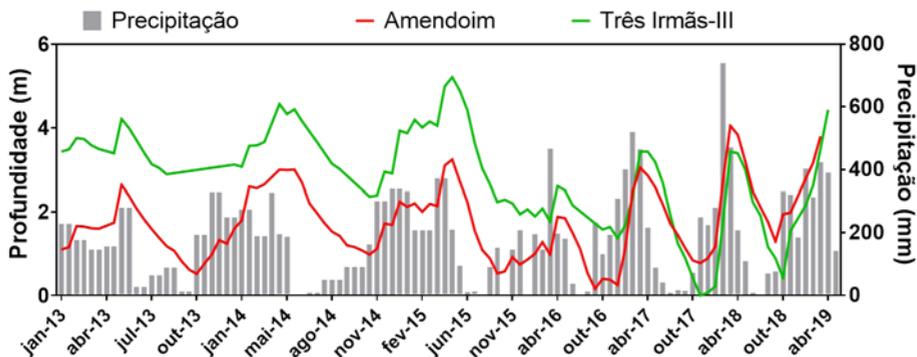


Figura 2.3 Variações de precipitação (mm; barras cinzas) e nível d'água (m) no Lago do Amendoim (vermelho) e no Lago Três Irmãs – corpo 3 (verde).

Fonte: Instituto Tecnológico Vale para o Desenvolvimento Sustentável.

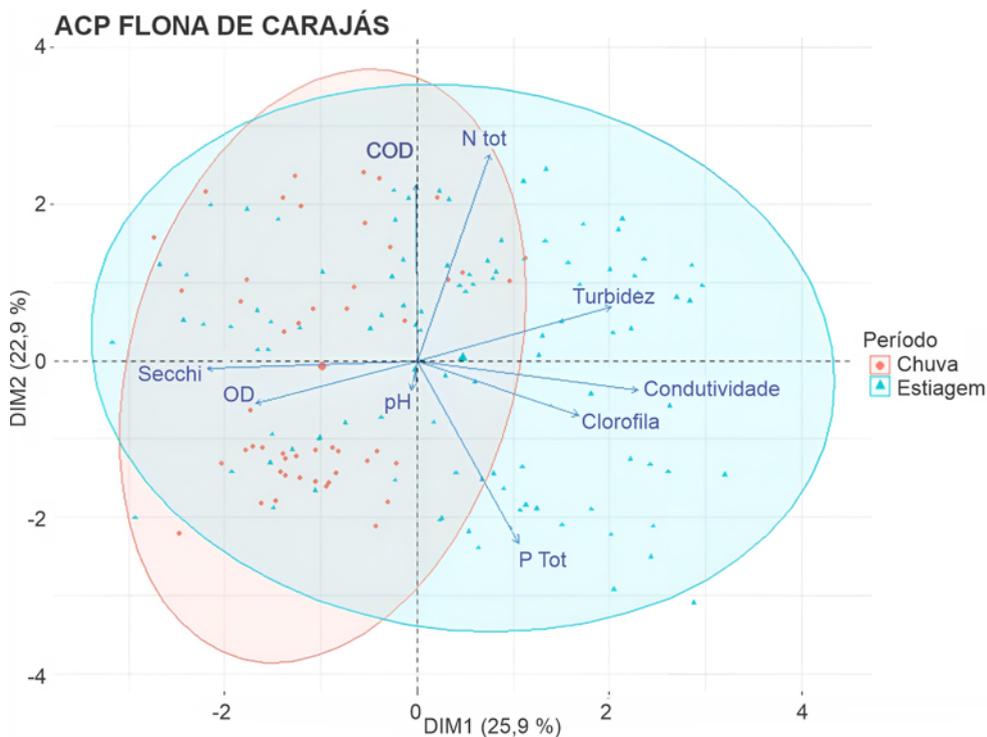
### 2.2.3 Caracterização limnológica

A avaliação da composição física, química e biológica das águas dos lagos da Serra dos Carajás, assim como o entendimento de diferentes processos que governam o fluxo de energia nesses ambientes são essenciais para o seu correto manejo e a sua conservação. Dessa forma, organizamos nesta seção os resultados oriundos dos “Estudos Limnológicos da Flona de Carajás” para o compartimento aquático, para o sedimento e para as comunidades aquáticas.

## 2.3 Variação Espacial e Sazonal nas Condições Limnológicas dos Lagos de Altitude

Os resultados desta seção baseiam-se nas amostragens de 48 ambientes lacustres, classificados como temporários ou permanentes, rasos ou profundos (figura 2.1), no período de 2004 a 2018. Uma análise dos gradientes ambientais, capaz de explicar cerca de 50 % da variação na dinâmica das características limnológicas desses lagos, sugere que as distinções existentes entre eles estão majoritariamente relacionadas à concentração de nutrientes e à condutividade elétrica da água (figura 2.4, eixo 1). Também se observa um gradiente em que o pH e a concentração de carbono orgânico dissolvido são inversamente correlacionados e abarcam a maior parte da variabilidade (figura 2.4, eixo 2). Esse gradiente diferencia os ambientes entre aqueles com maiores concentrações de oxigênio dissolvido e menores valores de nutrientes (lagos profundos), e

aqueles ambientes hipóxicos e anóxicos – que têm os maiores valores de nutrientes, clorofila a e condutividade elétrica (lagos rasos).



**Figura 2.4** Ordenação da análise de componentes principais das variáveis limnológicas e dos ambientes aquáticos da Flona de Carajás, mostrando a diferenciação entre períodos de chuva (outubro a março) e estiagem (abril a setembro). P.tot = fósforo total; N.tot = nitrogênio total; OD = oxigênio dissolvido; Condutividade = condutividade elétrica; Clorofila.a = clorofila a; Secchi = transparência aferida com o disco de Secchi; COD = carbono orgânico dissolvido; elipses são estimadas pelo cálculo da variância dos dados, intervalo de confiança de 95 %.

Um fato que pode explicar esse padrão é o efeito concentrador de solutos em virtude da evaporação da água durante períodos de estiagem. Assim, ambientes rasos passam por severa diminuição na profundidade durante esses períodos, o que provoca importantes mudanças limnológicas, principalmente na condutividade e nas concentrações de nutrientes e de clorofila a. Além disso, a presença de uma densa vegetação aquática nos ambientes rasos também pode contribuir com a maior concentração de nutrientes, já que a mortalidade e a decomposição de plantas, principalmente no período de estiagem, podem aumentar a reciclagem e a liberação de nutrientes.

Sendo assim, observa-se que a sazonalidade é um fator importante para os ambientes lênticos da Serra dos Carajás. Ressalta-se, também, que os ecossistemas em áreas mais planas e rasas são mais afetados por fatores extrínsecos, devido a uma elevada relação área-volume, do que lagos profundos, dispostos em áreas mais declivosas e encaixados (Rettig et al. 2006).

A maioria dos ambientes lacustres da Serra dos Carajás são mesotróficos ou eutróficos (Sahoo et al. 2016a e 2017a), um padrão discordante dos demais ambientes aquáticos amazônicos que, em sua maioria, são classificados como oligotróficos e mesotróficos (Esteves 2011). Também foi observado que, em média, os ambientes rasos têm maior turbidez da água e maior concentração de nutrientes (nitrogênio – N e fósforo – P), o que explica em parte os elevados graus de trofia observados, revelando características intrínsecas de ambientes aquáticos tropicais, e não de estados de elevada trofia decorrente de ações antrópicas.

Mas os lagos da região apresentam uma ampla variação na qualidade da água e no estado trófico, sendo encontrados ecossistemas que se enquadram entre ultraoligotróficos até hipereutróficos. Esses resultados permitem concluir que os ecossistemas aquáticos da Serra dos Carajás distribuem-se ao longo de um considerável gradiente de características, que refletem as variações espaciais (morfométricas) e sazonais (como o período do ano ou o clima, que determinam o tempo de renovação das águas), destacando-se a importância de pequenas áreas úmidas (Bozelli et al. 2018).

## 2.4 Caracterização e Variação de Parâmetros Físicos e Químicos dos Sedimentos

No sedimento de ambientes aquáticos lênticos acontecem importantes processos ecossistêmicos relacionados com a ciclagem de matéria e o fluxo de energia. O sedimento também se apresenta como um testemunho (no tempo e espaço) dos processos que ocorreram na coluna d'água. Os sedimentos de ambientes aquáticos são utilizados em estudos paleolimnológicos, tróficos e como indicadores do grau de alteração dos ecossistemas aquáticos (Esteves e Camargo 2011).

Os sedimentos dos ambientes aquáticos da Serra dos Carajás são majoritariamente orgânicos, cuja concentração de matéria orgânica (MO) é maior do que 10 % da massa seca. No entanto, os ambientes não se diferenciam em relação à concentração de MO, N ou P entre período chuvoso e de estiagem. Especialmente, também se nota pouca diferença quantitativa na concentração

de MO entre os sedimentos de ambientes rasos perenes (pequenos ambientes constantemente inundados; *vide* exemplo em figura 2.1C) e profundos. No entanto, os ambientes temporários diferenciam-se dos ambientes constantemente inundados, com menores valores médios de concentração de MO.

A quantidade de MO presente no sedimento é influenciada pelo tempo de inundação e origem do material orgânico (ex.: vegetais terrestres, vegetais aquáticos, animais, etc.; Larnet et al. 2010), o que pode explicar essas diferenças espaciais encontradas. A morfologia da bacia de captação do ambiente também influencia nesse aspecto que, quanto mais pronunciada, torna o acúmulo de sedimentos mais efetivo e, conseqüentemente, o desenvolvimento de camadas mais espessas de sedimentos. Essas camadas, por sua vez, irão progressivamente favorecer processos de colonização por plantas anfíbias e aquáticas que tendem a incrementar ainda mais a profundidade desse sedimento e a sua concentração de matéria orgânica.

Em relação às variações qualitativas da MO presente nos sedimentos dos ambientes lacustres da Serra dos Carajás, Sahoo et al. (2015) apontaram que a origem do material de áreas profundas diferencia-se de áreas rasas no Lago do Violão. Por meio de análises isotópicas ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) e estequiométricas (C/N), foi possível indicar que, na zona profunda, existe um predomínio de MO de fontes autóctones (providas da presença de esponjas e algas). Por outro lado, a região litorânea exibe maior influência de ambientes terrestres circundantes, principalmente derivadas de material alóctone (plantas vasculares C3). Já no Lago Três Irmãs, assinaturas isotópicas apontam para a predominância de fontes mistas: plantas terrestres C3, macrófitas e carbono orgânico dissolvido (Sahoo et al. 2017b, Guimarães et al. 2019). A composição mineral do sedimento indica ainda que nos lagos do Violão (Sahoo et al. 2015), do Amendoim (Sahoo et al. 2016b) e Três Irmãs (Sahoo et al. 2017b) existe uma assinatura geoquímica similar entre o sedimento lacustre e a crosta laterítica terrestre circundante, o que é resultante de processos mecânicos de erosão (Guimarães et al. 2019).

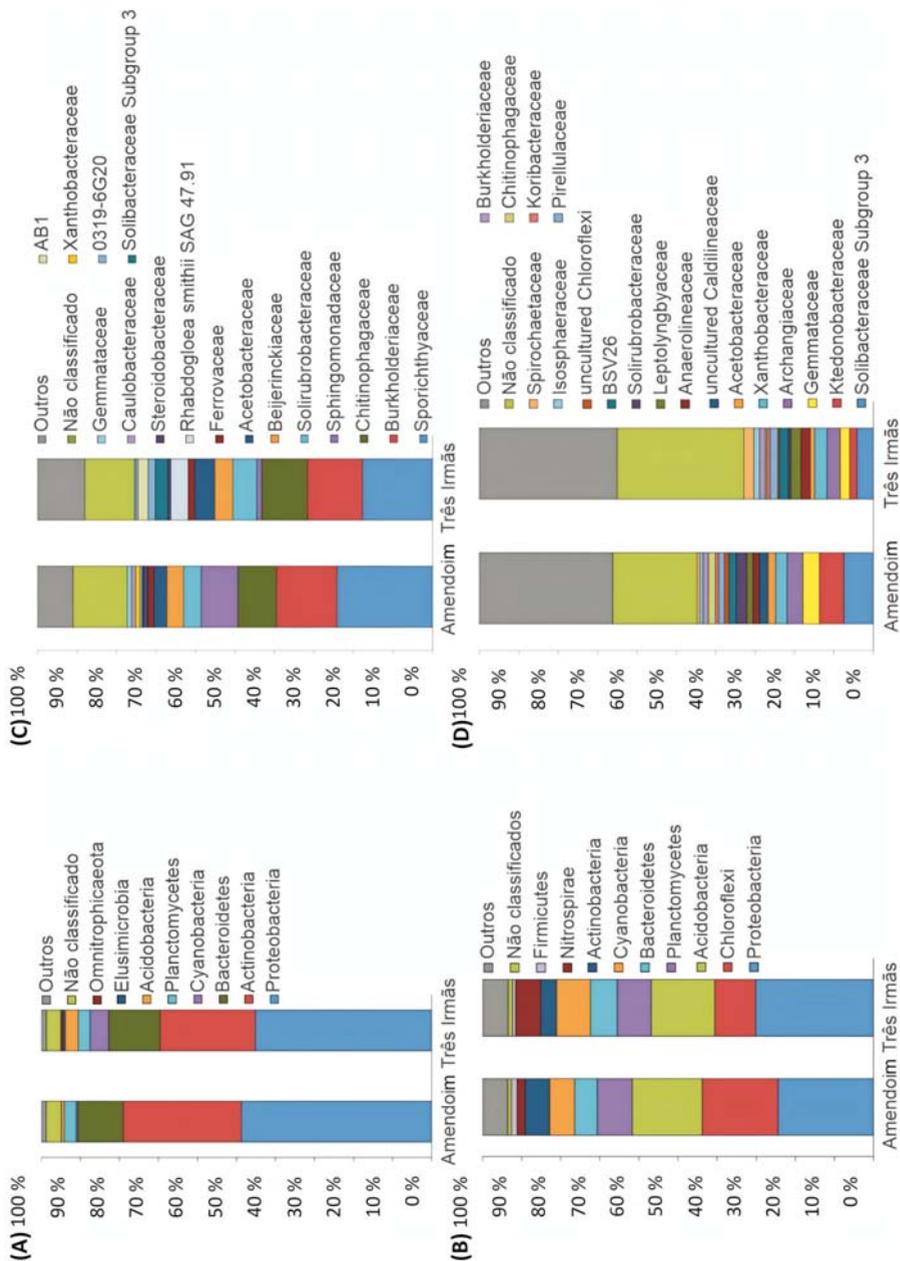
#### **2.4.1 Biodiversidade aquática: composição e padrões de distribuição dos organismos**

As comunidades aquáticas dos ambientes lênticos naturais da Flona de Carajás têm expressiva diversidade de táxons. Essa diversidade é influenciada por processos distintos que regem as interações ecológicas em ambientes rasos e profundos na região.

### **A) Comunidades bacterianas**

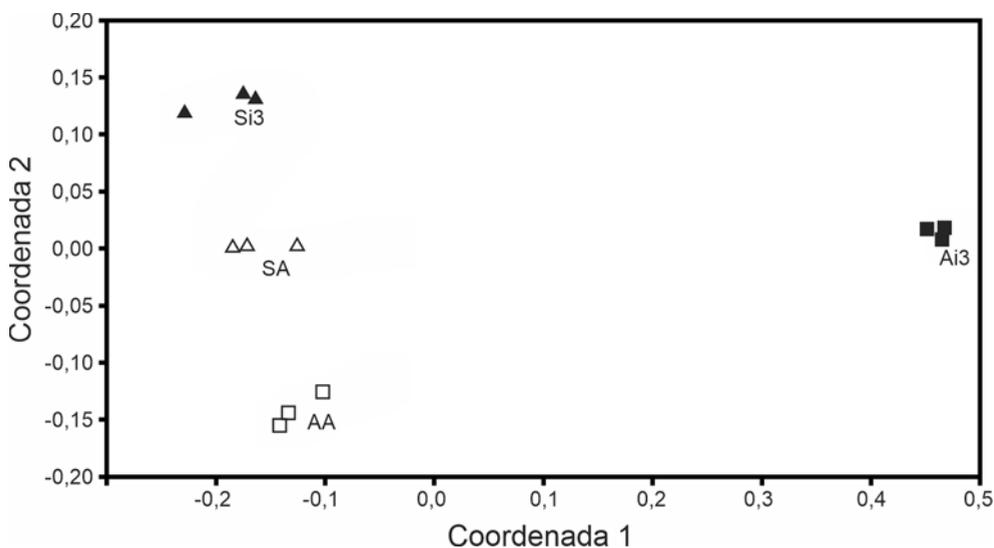
Os microrganismos exercem papel-chave nos ciclos biogeoquímicos de carbono e de outros elementos químicos, essenciais para manutenção dos ecossistemas, devido à grande abundância e às imensas diversidade e capacidade metabólica que as comunidades microbianas podem desempenhar. As informações disponíveis na literatura a respeito de muitos membros das famílias encontradas nesses ambientes ainda são escassas, e muitas sequer foram descritas. Relacionar a estrutura dessas comunidades às características dos ambientes é importante para compreender sua função e suas contribuições ecológicas, especialmente sobre a base da cadeia trófica e da especificidade que podem apresentar. Sendo assim, uma abordagem, utilizando sequenciamento massivo de DNA das comunidades bacterianas presentes nos lagos do Amendoim e Três Irmãs – corpo 3, foi realizada no período chuvoso de 2019.

A partir dos resultados obtidos com o sequenciamento, foi possível fazer uma caracterização das comunidades bacterianas presentes na água e sedimento de ambos os lagos estudados (figura 2.5). Como já descrito anteriormente, os lagos estudados estão próximos geograficamente, apresentam características limnológicas similares e homogêneas, mantendo, no entanto, algumas particularidades ecológicas. Isso foi observado com relação a alguns grupos taxonômicos encontrados na estrutura das comunidades bacterianas desses locais. Os filos bacterianos mais abundantes nas amostras de água (figura 2.5A) apresentaram uma ocorrência comum para ambos os lagos (Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes), com exceção da Cyanobacteria e da Acidobacteria, que apresentaram maior percentual no Lago Três Irmãs – corpo 3, quando comparado com o do Amendoim. Já nas amostras de sedimento (figura 2.5B), os filos mais abundantes e comuns aos dois ambientes foram Proteobacteria, Chloroflexi, Acidobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes, Cyanobacteria e Actinobacteria, em proporções similares entre os ambientes. Isto sugere um padrão de dominância equivalente entre as comunidades microbiológicas presentes no sedimento de ambos os ambientes.



**Figura 2.5** Abundância relativa dos filos (A e B) e famílias (C e D) da comunidade bacteriana de amostras de água (A e C) e sedimento (B e D) dos Lagos do Amendoim e Três Irmãos.

Além disso, uma análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) (figura 2.6) foi realizada com os dados da microbiota dos diferentes compartimentos (água e sedimento) de ambos os lagos estudados. As comunidades agruparam-se em função dos locais e dos compartimentos avaliados (PERMANOVA,  $p < 0,01$ ). As amostras de água oriundas do Lago Três Irmãs – corpo 3 agruparam-se mais distantes das amostras de água do Lago do Amendoim. Esta diferenciação entre os ambientes com relação à microbiota presente na água pode estar relacionada a diferenças na estrutura trófica desses locais. Enquanto no Lago do Amendoim ocorre grande cobertura de macrófitas aquáticas, sem a presença de ictiofauna expressiva, no Lago Três Irmãs – corpo 3 não são observadas macrófitas, e há a dominância de peixes herbívoros e onívoros.



**Figura 2.6** Análise da  $\beta$  diversidade da microbiota presente nos compartimentos água e sedimento dos lagos de altitude da Amazônia. O gráfico de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) foi construído baseado na matriz de dissimilaridade, utilizando a distância de Bray-Curtis (PERMANOVA dissimilaridade  $P = 0,0001$ ). AA: água Amendoim; Ai3: água Três Irmãs; SA: sedimento Amendoim; Si3: sedimento Três Irmãs.

Com relação aos grupos taxonômicos mais abundantes e comuns nas águas dos dois lagos estudados, destacam-se: Sporichthyaceae, Burkholderiaceae, Chitinophagaceae, Solirubrobacteraceae, Sphingomonadaceae (figura 2.5C), sendo que a última foi notadamente mais abundante no Lago do Amendoim. No sedimento presente no fundo dos dois lagos, as famí-

lias mais abundantes em ambos foram Solibacteraceae, Ktedonobacteraceae, Gemmataceae, Archangiaceae e Xanthobacteraceae (figura 2.5D).

As famílias Burkholderiaceae, Xanthobacteraceae, Solibacteraceae, Cyanobiaceae e Caulobacteraceae encontradas nos lagos de altitude podem estar envolvidas com o ciclo de carbono, tanto por quimio-heterotrofia como fotoautotrofia. A presença de microrganismos relacionados com metabolismo fotoautotrófico é esperada nos lagos de altitude da Amazônia, tipicamente rasos e de águas claras, que facilitam a passagem da luz, beneficiando, assim, as comunidades bacterianas fotossintéticas que utilizam a luz como fonte de energia.

A família Sporichthyaceae, uma das mais abundantes na água de ambos os lagos, já foi relacionada com os ciclos de carbono e nitrogênio (Liu et al. 2015), enquanto membros da família Xanthobacteraceae, com a ciclagem de enxofre (Buessecker et al. 2021). Outros grupos taxonômicos presentes no ambiente também podem estar relacionados a diferentes ciclos biogeoquímicos, como os ciclos do nitrogênio, do carbono e do enxofre. Membros das famílias Solibacteriaceae, Ktedonobacteraceae e Gemmataceae já foram relacionados ao ciclo do carbono. Uma nova espécie descrita como pertencente à família Ktedonobacteraceae foi associada com a degradação de matéria orgânica de origem vegetal (Yabe et al. 2017). Isto indica uma possível atuação de membros da família na ciclagem do carbono no Lago do Amendoim.

A família Solibacteraceae, pertencente ao filo Acidobacteria e presente em ambos os compartimentos, já foi descrita como um membro abundante de solos e com versatilidade fisiológica e metabólica, capaz de usar diversas fontes de carbono e nitrogênio para seu crescimento (Chen et al. 2021). Estudos prévios a descrevem como fator-chave em processos que envolvem a respiração do solo no Ártico e a capacidade de crescimento em diferentes gradientes de oxigênio (Chen et al. 2021, Zhang et al. 2017, Eichorst et al. 2018).

Dentre as famílias encontradas no sedimento, a Archangiaceae é composta por bactérias capazes de produzir sideróforos quando estão sob estresse de ferro (Whitworth 2011, Ahearne et al. 2021). Esses sideróforos agem na solubilização do ferro, permitindo que as bactérias incorporem o ferro no metabolismo celular, conectando-as à ciclagem desse metal. Além disso, já foi demonstrada a relação de bactérias da família Acetobacteraceae e dos filos Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Nitrospirae e Proteobacteria com ambientes ricos em metais, possivelmente pela presença de organismos com capacidade de metabolizar o ferro metálico (Ilbert e Bonnefoy 2013, Gagen et al. 2019, Gavrillov et al. 2019).

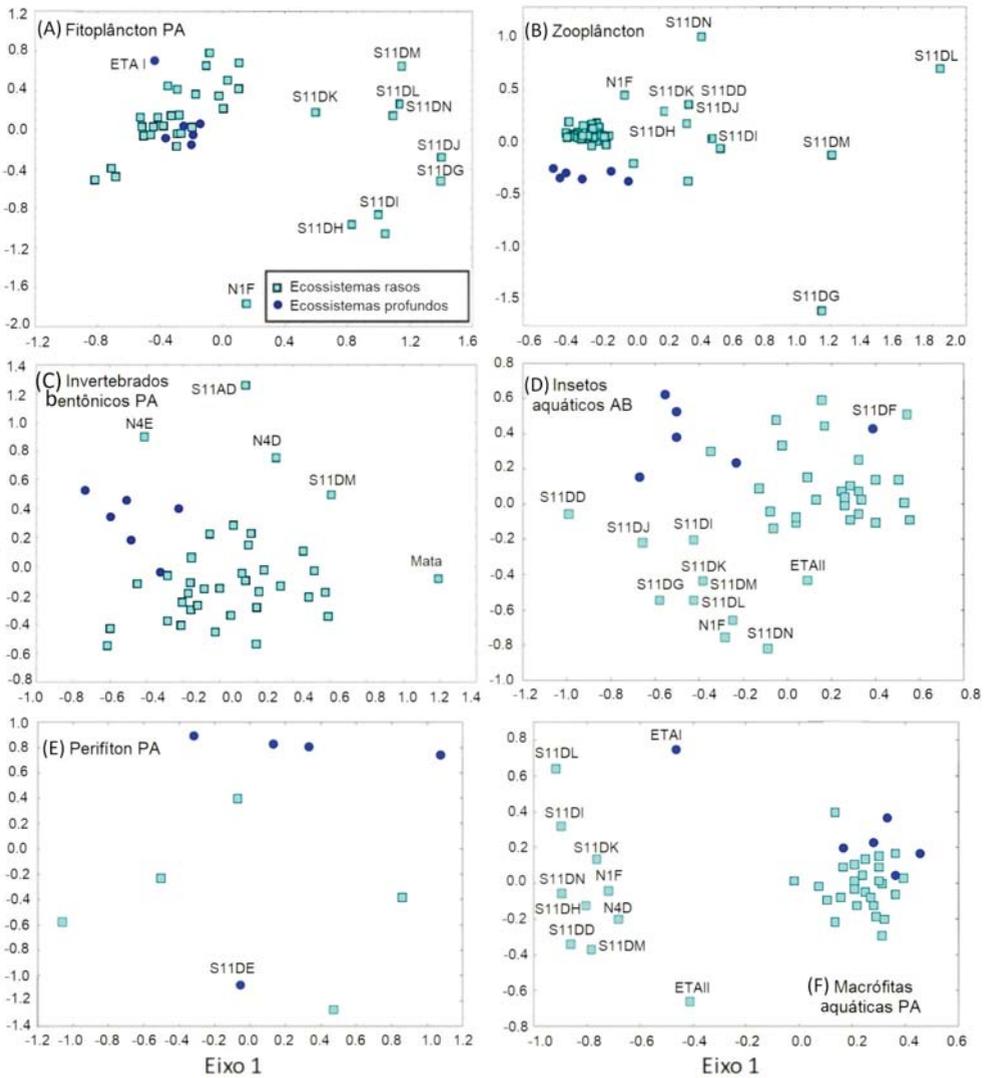
A presença desses táxons de microrganismos nos lagos do Amendoim e Três Irmãs indica que a microbiota presente é específica e adaptada à grande concentração de metais, em especial o ferro. Sobre este tema, destaca-se ainda, em ambos os lagos, a presença da família Ferrovaceae, pertencente ao filo Proteobacteria, tendo representantes reconhecidos como bactérias acidófilas oxidantes de ferro, com um importante papel no processo relacionado ao ciclo de ferro (Hedrich et al. 2011, Gagen et al. 2019). A grande concentração de metais é uma característica inerente a esses lagos e tem como origem a estrutura geológica do entorno desses lagos na Serra dos Carajás (Gagen et al. 2019). Todos esses fatores possivelmente contribuem para a associação da microbiota com diversos macro-organismos nesses locais, inclusive os organismos endêmicos, que devem ser levados em consideração para melhor entendimento das suas condições de desenvolvimento na região de Carajás.

### **B) Comunidade fitoplanctônica e perifítica**

Considerando a comunidade fitoplanctônica, foram amostrados 989 táxons de algas em levantamentos realizados de 2004 a 2018. Para táxons em que existiam informações disponíveis acerca de *status* de conservação e distribuição, constatou-se que 24,2 % são comuns aos ecossistemas aquáticos continentais brasileiros, 25,5 % já foram observados na Região Amazônica, e 14,6 % e 3,0 %, respectivamente, foram de espécies ainda não observadas e raramente observadas na Região Norte. Entre as espécies raras destacam-se *Pinnularia acrosphaeria*, *Eucapsis parallelepipedon*, *Peridinium cinctum*, *Strombomonas fluviatilis*, *Cosmarium botrytis* e *Xanthidium amazonense*.

Para a comunidade de algas perifíticas, um total de 651 táxons foi observado, embora um número muito menor de ambientes tenha sido amostrado para essa comunidade. Não foi possível estabelecer tendências de ocorrência de espécies em relação aos demais ecossistemas amazônicos devido à baixa disponibilidade desse tipo de informação na bibliografia especializada, o que ressalta a importância dessa caracterização.

É importante ressaltar que, em relação a essas duas comunidades de fitoplâncton e perifiton, o padrão de diferenciação entre lagos rasos e profundos é confirmado (figuras 2.7A e 2.7E). Cabe destacar que a maioria das espécies desses grupos pode ser considerada cosmopolita (ou seja, com potencial de distribuição mundial) de forma que a ocorrência ou não em lagos não está relacionada a endemismos, mas, sim, às condições ambientais locais (Hillebrand et al. 2001, Fenchel e Finlay 2004).



**Figura 2.7** Comparações da similaridade da composição de espécies pela análise NMDS entre ecossistemas rasos e profundos da Flona de Carajás, considerando diversas comunidades ecológicas: (A) fitoplânctônica; (B) zooplânctônica; (C) invertebrados bentônicos; (D) insetos aquáticos; (E) perifítica; e (F) macrófitas aquáticas. O índice de similaridade de Jaccard foi utilizado para o cálculo de similaridade entre os ambientes com dados de presença e ausência (PA), enquanto o índice de Bray-Curtis foi utilizado para o cálculo de similaridade entre os ambientes com dados de abundância (AB).

### **C) Comunidade zooplanctônica**

O zooplâncton da Flona de Carajás apresenta 253 táxons registrados, pertencentes a uma ampla gama de subgrupos (copépodes, cladóceros, rotíferos, etc.). Em relação à composição de espécies, em geral, é observada uma alta riqueza de rotíferos, especialmente daqueles da família Lecanidae. A alta heterogeneidade espacial encontrada nos lagos, com diferentes tipos de habitats e nichos, pode ser a principal responsável pela ocorrência dessa elevada diversidade de espécies. A presença de macrófitas aquáticas, por exemplo, seleciona espécies muito diferentes daquelas encontradas em ambientes com maior exposição do espelho d'água, além de propiciar a retenção de detritos e o desenvolvimento da comunidade perifítica, favorecendo a dominância de espécies zooplanctônicas litorâneas que possuem estruturas de alimentação aptas a consumir esse tipo de recurso. Os copépodes, estágios naupliares, juvenis e adultos, são numericamente dominantes em alguns ambientes. Cabe ressaltar a presença do copépode *Argyrodiaptomus paggi*, descrito como endêmico da Região Amazônica (Previatelli e Santos-Silva 2007).

A comunidade zooplanctônica pode responder à sazonalidade em ambientes profundos e rasos. Em um estudo em cinco lagos profundos da Flona de Carajás, Sahoo et al. (2017) apontam que a riqueza de espécies, tanto do fitoplâncton quanto do zooplâncton, é relacionada ao nível da água (figura 2.7B). A diversidade beta do zooplâncton, que indica o grau de similaridade na composição das comunidades, também se diferencia em relação à periodicidade de inundação e à conectividade dos ambientes, como apontam Lopes et al. (2014). Ambientes perenes e isolados têm maior diversidade beta do que aqueles temporários isolados, uma vez que estes últimos passam por eventos extremos de estiagem, quando poucas espécies são capazes de resistir a esse filtro ambiental.

Ainda em relação às peculiaridades da ocorrência de espécies zooplanctônicas, destaca-se o grupo dos grandes branquiópodes, especialmente das ordens Anostraca e Spinicaudata (Crustacea: Branchiopoda), presente exclusivamente em alguns ambientes aquáticos temporários da Flona de Carajás. Em ambientes aquáticos perenes, o zooplâncton é dominado por rotíferos, cladóceros e copépodes; já em ambientes temporários, normalmente livres de peixes planctófagos, têm destaque os Anostraca (Crustacea: Branchiopoda) (Dodson et al. 2009). A fauna de Anostraca é um exemplo de zooplâncton pioneiro em lagos temporários, onde eclodem pouco tempo depois da inundação e têm um rápido desenvolvimento (Dodson et al. 2009). Por serem espécies típicas de ambientes efêmeros, os Anostraca apresentam ciclos de

vida particulares, regidos pela intermitência desses ambientes. A capacidade de produzir ovos de resistência é uma adaptação comum desses organismos, e o acúmulo desses ovos no sedimento forma um banco de ovos, preparados para recolonizar a coluna d'água com a inundação.

Na Flona de Carajás, observa-se a ocorrência dos Anostraca *Dendrocephalus carajaensis* (Rogers et al. 2012) e dos *Dendrocephalus xikrini* (Rabet et al. 2018), até o momento endêmicas dos ambientes temporários da Serra dos Carajás. Mas *D. carajaensis* também ocorre no Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, na Serra da Bocaina. Em grandes branquiópodes, a morfologia e a ornamentação dos ovos podem diferir entre gêneros e espécies e, portanto, os ovos de resistência podem ser utilizados na identificação taxonômica (Rabet 2010). Análises focadas na avaliação da biodiversidade de ovos de resistência retirados diretamente de amostras de sedimento podem indicar a presença de espécies que, devido ao seu curto ciclo de vida, dificilmente são encontradas na fauna ativa desses lagos temporários.

#### **D) Macroinvertebrados bentônicos e insetos aquáticos**

Os organismos bentônicos, predominantemente insetos aquáticos e crustáceos, foram registrados geralmente associados à vegetação aquática. Foram registrados 399 táxons durante o período de inventário. No entanto, o número de espécies de invertebrados bentônicos e insetos aquáticos pode ser maior pelo fato de muitos espécimes terem sido identificados apenas até o nível de gênero ou, até mesmo, ao nível de família, já que a identificação em nível de espécie só pode ser feita a partir dos organismos adultos, os quais são, em sua maioria, organismos terrestres.

Espacialmente, o padrão de diferenciação entre lagos rasos e profundos também é confirmado para essas comunidades (figura 2.7C-D). Em lagos rasos, observa-se maior diversidade de espécies em comparação com ambientes profundos. Isto deve estar relacionado à maior diversidade de habitats ou à ausência de predadores de topo, como peixes, nos ambientes rasos e temporários, por exemplo. Mesmo em lagos profundos e permanentes, como os lagos do Amendoim e do Violão, é possível observar a relação entre a presença de peixes e a riqueza, a biomassa e a composição de insetos aquáticos. No Lago do Violão, onde ocorre, por exemplo, uma espécie de peixe do gênero *Astyanax*, a comunidade de macroinvertebrados tem menor riqueza e biomassa quando comparada com o Lago do Amendoim, que não tem a presença desse predador (Nobre et al. 2019). Espécies do gênero *Astyanax* têm efeitos diretos sobre a comunidade de macroinvertebrados e de Chaoboridae (Nobre et al. 2019).

### **E) Ictiofauna**

Dos 24 lagos inventariados na Flona de Carajás entre 2005 e 2010, em apenas quatro foi assinalada a presença de peixes, com registro de sete táxons pertencentes a quatro famílias. Este padrão de baixa diversidade está relacionado ao fato de ambientes rasos secarem completamente em períodos de estiagem severa, bem como em virtude de o pequeno tamanho e o isolamento não comportarem populações numerosas de espécies em níveis tróficos mais elevados, o que aumenta a probabilidade de extinção estocástica (Mittelbach et al. 1995). Apenas uma das espécies, *Synbranchus marmoratus*, foi registrada em mais de um lago da Flona de Carajás (três ao todo), ambos em Serra Sul. Particularmente *S. marmoratus*, conhecido como muçum, é capaz de suportar períodos de estiagem, devido à sua capacidade de se enterrar e permanecer em estado letárgico até o início das chuvas (Eduardo et al. 1979).

Nos lagos, os peixes capturados foram espécies não nativas do Brasil – como o caso da tilápia (*Coptodon rendalli*) – ou espécies introduzidas a partir de rios e igarapés pertencentes à bacia do Rio Tocantins, que drena a Serra dos Carajás, como o caso do lambari do gênero *Astyanax*. Pelo fato de os lagos não terem conectividade com a rede fluvial e as espécies registradas não terem sido capturadas em corpos d'água adjacentes a esses ambientes, assume-se que sua presença nesses lagos deve-se à ação humana.

É importante ressaltar os efeitos da presença de uma espécie de peixe onívora (*Astyanax* sp. grupo *A. bimaculatus*) na diversidade planctônica e bentônica do Lago do Violão, mais especificamente na riqueza, composição e abundância das comunidades litorâneas desses grupos de organismos (Nobre et al. 2019). Este trabalho ilustra, também, as consequências da introdução de espécies nos lagos da Serra dos Carajás, e seus potenciais efeitos sobre a diversidade e o funcionamento desses ecossistemas.

### **F) Macrófitas aquáticas**

Em relação à comunidade de macrófitas aquáticas, foram contabilizados 194 táxons, dos quais 59 % são comumente observados em ecossistemas aquáticos continentais brasileiros, mas também em outras partes do continente americano. A espécie *Nymphaea rudgeana*, por exemplo, ocorre na Serra dos Carajás, mais especificamente nos ambientes de Serra Sul, e é amplamente encontrada nas Américas Central, Sul, e no Caribe (Lima 2018). Contudo, espécies de ocorrência mais restrita também são encontra-

das como, por exemplo, a espécie *Utricularia physoceras*, *Isoëtes cangae* e *Isoëtes serracarajensis*, de ocorrência rara e endêmica da Serra dos Carajás (Giulietti et al. 2019, Mormul et al. 2015).

A comunidade de macrófitas aquáticas também responde às variações no tipo de ecossistema (figura 2.7F). Análises de redundância, com partição de variância, apontaram que essa comunidade tem sua composição de espécies afetada pelo espaço (distância entre os ecossistemas), além das condições abióticas de cada lago e do tempo (aspectos que afetaram todas as comunidades). Isso sugere que ambientes mais próximos apresentam comunidades de macrófitas mais similares do que ambientes mais distantes tanto do ponto de vista taxonômico quanto do funcional. Esses organismos são bem dependentes de conexões hidrológicas e/ou de animais para a sua dispersão, principalmente no caso de macrófitas submersas e flutuantes, que são altamente representadas na Flona de Carajás (Dahlgren e Ehrlen 2005). Esse padrão de similaridade na composição dependente da proximidade geográfica sugere que os ambientes estão isolados por um tempo geológico longínquo e que as comunidades são estruturadas com espécies cujos organismos apresentam relativamente baixa vagilidade.

Com base no exposto, é possível inferir que novos estudos poderão produzir avanços relacionados à compreensão dos endemismos presentes. A princípio, este livro pretende contar a história de duas espécies de plantas aquáticas endêmicas já identificadas: *I. cangae* e *I. serracarajensis*. Estas espécies são morfologicamente simplificadas, com algumas estruturas que tornam suas taxonomias bastante características (Pereira et al. 2016), diferenciando-se também em relação ao habitat: *I. cangae* é uma planta aquática submersa, enquanto *I. serracarajensis* é característica de ambientes sazonais e poças temporárias. Do ponto de vista da conservação, *I. cangae* merece maior atenção dada a sua ocorrência restrita e exclusiva no Lago do Amendoim.

## 2.5 Considerações Finais

Os estudos conduzidos até o momento mostram que, apesar de compartilharem origem e condições climáticas relativamente semelhantes, os lagos de altitude da Serra dos Carajás são ecossistemas bastante heterogêneos em condições ambientais. Por se distribuírem ao longo de um amplo gradiente de características morfométricas, sedimentológicas e limnológicas, esses sistemas, em conjunto, favorecem a manutenção da biodiversidade regional, ao promoverem a heterogeneidade ambiental.

A maior riqueza de espécies reportada para os ambientes rasos comparativamente aos ambientes profundos é um padrão geral da biodiversidade que emerge para as comunidades fitoplanctônica e perifítica, zooplanctônica, de macroinvertebrados bentônicos e insetos aquáticos, mas não para peixes e macrófitas aquáticas nesses ecossistemas. Além disso, as condições peculiares e, por vezes, únicas de alguns desses ecossistemas, o relativo grau de isolamento e as limitações de dispersão de alguns organismos que os habitam, os tornam importantes áreas de endemismo.

Lagos rasos e pequenos secam esporadicamente, possuem elevada razão perímetro/volume, o que os torna relativamente mais conectados ao ambiente terrestre. Por serem rasos, têm maior área de sedimento exposto à luminosidade e recebem mais luz por unidade de volume. Essas condições permitem o desenvolvimento de plantas aquáticas, organismos que conferem alta heterogeneidade a esses ambientes. A presença de plantas aquáticas aumenta o estoque interno de matéria orgânica, tornando esses ecossistemas rasos ainda mais produtivos por unidade de área, podendo sustentar teias tróficas mais complexas, e receber uma fauna mais móvel, como insetos aquáticos e aves. Esses organismos mais móveis conectam mais fortemente os lagos rasos entre si, estabelecendo dinâmicas de metacomunidades e metaecossistemas mais frequentemente do que os lagos profundos entre si, o que repercute em uma elevada – e em geral maior – biodiversidade nesses sistemas do que em lagos profundos (Scheffer et al. 2006). Por outro lado, a maior parte dos lagos rasos são também temporários, ou seja, sujeitos a dessecação, o que corresponde a um importante filtro ambiental para a ocorrência e a dispersão de alguns organismos aquáticos dessa região, condições essas que restringem a ocorrência, por exemplo, de plantas aquáticas submersas, como *Isoëtes cangae*.

## Referências

- Ahearne, A. et al. 2021. Assessment of evolutionary relationships for prioritization of myxobacteria for natural product discovery. – *Microorganisms* 9: 1376.
- Alvares, C. A. et al. 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. – *Meteorol Z* 22: 711-728.
- Beladjal, L. e Mertens, J. 2017. Risk reduction strategies in *Branchipus schaefferi* (Crustacea: Anostraca: Branchiopoda) as adaptation to a variable environment. – *Hydrobiologia* 801: 153-163.

- Bozelli, R. L. et al. 2018. Pequenas áreas úmidas: importância para conservação e gestão da biodiversidade brasileira. – *Biodivers Gest* 2: 122-138.
- Bozelli, R. L. et al. 2000. Mitigação do impacto: passado, presente e futuro. – In: Lago Batata – Impacto e Recuperação de um Ecossistema Amazônico. Sociedade Brasileira de Limnologia; UFRJ, Instituto de Biologia, pp. 332.
- Brendonck, L. 1996. Diapause, quiescence, hatching requirements: what we can learn from large freshwater branchiopods (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca, Notostraca, Conchostraca). – *Hydrobiologia* 320: 85-97.
- Buessecker, S. et al. 2021. Microbial communities and interactions of nitrogen oxides with methanogenesis in diverse peatlands of the amazon basin. – *Front Microbiol* 12: 659079.
- Chen, W.-C. et al. 2021. Metabolic potential and community structure of bacteria in an organic tea plantation. – *Appl Soil Ecol* 157: 103762.
- da Costa, M. L. et al. 2005. Mineralogia e geoquímica de sedimentos lacustres com substrato laterítico na Amazônia brasileira. – *Braz J Geol* 35: 165-176.
- Dahlgren, J. P. e Ehrlén, J. 2005. Distribution patterns of vascular plants in lakes – the role of metapopulation dynamics. – *Ecography* 28: 49-58.
- Dodson, S. L. et al. 2009. Cladocera and other branchiopoda. – In: Thorp, J. H. e Covich, A. P. (eds), *Ecology and classification of north american freshwater invertebrates*. 3rd Ed. Elsevier Inc, pp. 773-827.
- Eduardo, J. et al. 1979. Respiratory gas exchange in the airbreathing fish, *Synbranchus marmoratus*. – *Environ Biol Fish* 4: 55-64.
- Eichorst, S. A. et al. 2018. Genomic insights into the Acidobacteria reveal strategies for their success in terrestrial environments. – *Environ Microbiol* 20: 1041-1063.
- Esteves, F. de A. 2011. Fundamentos de limnologia. – Editora Interciência.
- Esteves, F. A. e Camargo, A. F. M. 2011. Sedimentos límnicos. – In: Esteves, F. de A. (ed), *Fundamentos de Limnologia*. 3a Edição. Editora Interciência, pp. 339-354.
- Fenchel, T. e Finlay, B. J. 2004. The ubiquity of small species: Patterns of local and global diversity. – *BioScience* 54: 777-784.

- Gagen, E. J. et al. 2019. Biogeochemical processes in canga ecosystems: Armoring of iron ore against erosion and importance in iron duricrust restoration in Brazil. – *Ore Geol Rev* 107: 573-586.
- Gavrilov, S. N. et al. 2019. Microbial communities of polymetallic deposits'acidic ecosystems of continental climatic zone with high temperature contrasts. – *Front Microbiol* 10: 1573.
- Giller, P. S. et al. 2004. Biodiversity effects on ecosystem functioning: emerging issues and their experimental test in aquatic environments. – *Oikos* 104: 423-436.
- Giulietti, A. M. et al. 2019. Edaphic endemism in the Amazon: vascular plants of the canga of Carajás, Brazil. *Bot Rev* 85: 357-383.
- Golder 2010. Anexo IV-Geologia. in press.
- Guimarães, J. T. F. et al. 2017. Modern pollen rain as a background for palaeoenvironmental studies in the Serra dos Carajás, southeastern Amazônia. – *Holocene* 27: 1055-1066.
- Guimarães, J. T. F. et al. 2023. Landscape and climate changes in southeastern Amazônia from quaternary records of upland lakes. – *Atmosphere* 14: 621.
- Hedrich, S. et al. 2011. The iron-oxidizing proteobacteria. – *Microbiology (Reading)* 157: 1551-1564.
- Hillebrand, H. et al. 2001. Differences in species richness patterns between unicellular and multicellular organisms. – *Oecologia* 126: 114-124.
- Ilbert, M. e Bonnefoy, V. 2013. Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. – *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1827: 161-175.
- Jolliffe, I. T. e Cadima, J. 2016. Principal component analysis: a review and recent developments. – *Phil Trans R Soc A* 374: 20150202.
- Junk, W. J. 1999. The flood pulse concept of large rivers: learning from the tropics. – *Large Rivers* 11: 261-280.
- Junk, W. J. et al. 2007. Freshwater fishes of the Amazon River basin: their biodiversity, fisheries, and habitats. – *Aquat Ecosyst Health Manag* 10: 153-173.
- Lamparelli, M. C. 2004. Degrees of trophic in water bodies of São Paulo: Evaluation of monitoring methods. Doctoral Thesis, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, 235 pp.
- Larned, S. T. et al. 2010. Emerging concepts in temporary-river ecology. – *Freshw Biol* 55: 717-738.

Lima, C. T. de 2018. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Nymphaeaceae. – *Rodriguésia* 69: 153-156.

Liu, J. et al. 2015. Phylogenetic shifts of bacterioplankton community composition along the Pearl Estuary: the potential impact of hypoxia and nutrients. – *Front Microbiol* 6: 64.

Lopes, P. M. et al. 2014. Correlates of zooplankton beta diversity in tropical lake systems. – *PLoS One* 9: e109581.

Martins, F. D. et al. 2018. Inserção territorial e histórica da Floresta de Carajás e sua relação com a mineração. In: Martins, F.D., Kamino, L.H.Y., & Ribeiro, K.T. (org). Projeto Cenários: conservação de campos ferruginosos diante da mineração em Carajás. Tubarão-SC: Editora Copiart, p.21-38.

Maurity, C.W. e Kotschoubey, B. 1995. Evolução recente da cobertura de alteração no platô N1-Serra dos Carajás-PA: Degradação, pseudocarstificação, espeleotemas. *Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi. Serie Ciênc. Terra* 7, 331-362.

Mittelbach, G. G. et al. 1995. Perturbation and Resilience: A Long-Term, Whole-Lake Study of Predator Extinction and Reintroduction. – *Ecology* 76: 2347-2360.

Mittermeier, R. A. et al. 2003. Wilderness and biodiversity conservation. – *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10309-10313.

Mormul, R. P. et al. 2015. Space and seasonality effects on the aquatic macrophyte community of temporary neotropical upland lakes. – *Aquat Bot* 126: 54-59.

Nobre, R. L. G. et al. 2019. Effects of the introduction of an omnivorous fish on the biodiversity and functioning of an upland Amazonian Lake. – *Acta Amaz* 49: 221-231.

Nunes, J. A. et al. 2015. Soil-vegetation relationships on a banded ironstone “island”, Carajás Plateau, Brazilian Eastern Amazonia. – *An Acad Bras Ciênc* 87: 2097-2110.

Pereira, J. B. D. S. et al. 2016. Two new species of *Isoëtes* (Isoetaceae) from northern Brazil. – *Phytotaxa* 272: 141-148.

Previattelli, D. e Santos-Silva, E. N. D. 2007. A new *Argyrodiaptomus* (Copepoda: Calanoida: Diaptomidae) from the southwestern Brazilian Amazon. – *Zootaxa* 1518: 1-29.

- Rabet, N. 2010. Revision of the egg morphology of Eulimnadia (Crustacea, Branchiopoda, Spinicaudata). – *Zoosystema* 32: 373-391.
- Rabet, N. et al. 2018. Richness of *Dendrocephalus* (Branchiopoda, Anostraca) in Brazil with the description of two new species. – *Eur J Taxon* 478: 1-20.
- Reis, L. S. et al. 2017. Environmental and vegetation changes in southeastern Amazonia during the late Pleistocene and Holocene. – *Quat Int* 449: 83-105.
- Resende, N. P. e Barbosa, A. de M. 1972. Relatório de pesquisa de minério de ferro, Distrito Ferrífero da Serra dos Carajás, estado do Pará. – AMZA.
- Rettig, J. E. et al. 2006. Seasonal patterns of abundance: do zooplankton in small ponds do the same thing every spring–summer? – *Hydrobiologia* 556: 193-207.
- Rogers, D. C. et al. 2012. A new species of *Dendrocephalus* (Crustacea, Anostraca) from Serra dos Carajás (Pará State, Brasil). – *Zootaxa* 3363: 52-58.
- Rubbo, M. J. et al. 2006. Terrestrial subsidies of organic carbon support net ecosystem production in temporary forest ponds: evidence from an ecosystem experiment. – *Ecosystems* 9: 1170-1176.
- Sahoo, P. K. et al. 2015. Use of multi-proxy approaches to determine the origin and depositional processes in modern lacustrine sediments: Carajás Plateau, Southeastern Amazon, Brazil. – *Appl Geochem* 52: 130-146.
- Sahoo, P. K. et al. 2016a. Influence of seasonal variation on the hydro-biogeochemical characteristics of two upland lakes in the Southeastern Amazon, Brazil. – *An Acad Bras Ciênc* 88: 2211-2227.
- Sahoo, P. K. et al. 2016b. Geochemistry of upland lacustrine sediments from Serra dos Carajás, Southeastern Amazon, Brazil: Implications for catchment weathering, provenance, and sedimentary processes. – *J South Am Earth Sci* 72: 178-190.
- Sahoo, P. K. et al. 2017a. Limnological characteristics and planktonic diversity of five tropical upland lakes from Brazilian Amazon. – *Ann Limnol Int J Lim* 53: 467-483.
- Sahoo, P. K. et al. 2017b. Geochemical characterization of the largest upland lake of the Brazilian Amazonia: impact of provenance and processes. – *J South Am Earth Sci* 80: 541-558.

- Scheffer, M. et al. 2006. Small habitat size and isolation can promote species richness: second-order effects on biodiversity in shallow lakes and ponds. – *Oikos* 112: 227-231.
- Silva, M. S. D. et al. 2018. Morphology and morphometry of upland lakes over lateritic crust, Serra dos Carajás, southeastern Amazon region. – *An Acad Bras Ciênc* 90: 1309-1325.
- Silva Júnior, R. O. et al. 2017. Estimativa de precipitação e vazões médias para a bacia hidrográfica do rio Itacaiúnas (BHRI), Amazônia Oriental, Brasil. – *R Bras Geogr Fís* 10: 1638-1654.
- Souza-Filho, P. W. M. et al. 2016. Four decades of land-cover, land-use and hydroclimatology changes in the Itacaiúnas River watershed, southeastern Amazon. – *J Environ Manage* 167: 175-184.
- Souza-Filho, P. W. M. et al. 2020. The role of fault reactivation in the development of tropical montane lakes. – *Earth Surf Process Landf* 45: 3732-3746.
- Viana, P. L. et al. 2016. Flora of the cangas of the Serra dos Carajás, Pará, Brazil: history, study area and methodology. *Rodriguésia* 67: 1107-1124.
- Vieira, I. C. G. et al. 2005. Estratégias para evitar a perda de biodiversidade na Amazônia. – *Estud Av* 19: 153-164.
- Wetzel, R. G. e Likens, G. E. 1991. *Limnological Analyses*. 2nd Ed. Springer Science & Business Media.
- Whitworth, D. E. 2011. Chapter 1 – Myxobacterial vesicles: Death at a distance? – In: Laskin, A. I. et al. (eds), *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 1-31.
- Wiegel, J. K. W. 2015. *Xanthobacter*. – In: Trujillo, M. E. et al. (eds), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1-22.
- Yabe, S. et al. 2017. *Dictyobacter aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a member of the family Ktedonobacteraceae, isolated from soil, and emended description of the genus *Thermosporothrix*. – *Int J Syst Evol Microbiol* 67: 2615-2621.
- Zhang, H. M. et al. 2017. Soil microbiomes modulate distinct patterns of soil respiration and methane oxidation in arctic active layer and permafrost. – *Acta Microbiol Sin* 57: 839-855.

## CAPÍTULO 3

---

---

### Descoberta da Espécie e sua Classificação

*\* Fernando Marino Gomes dos Santos \* Guilherme Oliveira  
\* Tais Nogueira Fernandes \* Maurício Takashi Coutinho Watanabe  
\* Jovani B. de S. Pereira*

TÍTULO CURTO (*RUNNING TITLE*)

---

---

A Descoberta da Espécie, sua Taxonomia e Filogenia do Grupo

## Resumo

O início dos estudos botânicos sobre a flora dos campos rupestres ferruginosos das Serras de Carajás tiveram início no final da década de 1960. Estas missões descreveram inúmeras espécies, entre elas, incluem-se duas novas de *Isoëtes*, das quais uma ganhou notório destaque, devido à sua ocorrência restrita a um lago situado em uma região-alvo para exploração mineral, localizado na Serra Sul da Flona de Carajás. Assim, uma série de estudos foram realizados, levando em consideração esses dois táxons, a fim de se encontrar caracteres que auxiliassem na identificação acurada das espécies, fornecendo um parecer correto sobre o risco de extinção que esses táxons possuíam frente à implantação do projeto. Embora apresentem grande similaridade, as espécies podem ser diferenciadas pelo hábitat e pela análise morfológica dos megásporos, sendo elas: *Isoëtes serracarajensis*, distribuída nos ambientes alagados da região, e *Isoëtes cangae*, conhecida até o momento com ocorrência natural em apenas um lago perene da região. Adicionalmente, mensurações foliares, embora sejam úteis, não são determinantes para a distinção das espécies. Por outro lado, medidas morfométricas e ornamentação do megásporo foram essenciais para uma distinção precisa neste grupo. Dados moleculares corroboram a hipótese de que se trata de táxons distintos, embora sejam proximamente relacionados (grupo irmão).

**Palavras-chave:** Isoetaceae; diversidade no Brasil, *Isoëtes cangae*, mineração; conservação; endemismo.

### 3.1 Histórico

A região de Carajás vem sendo alvo de estudos botânicos desde a descoberta das jazidas no final da década de 1960, quando os primeiros botânicos pisaram em suas serras ricas em ferro. O Dr. Paulo Cavalcante, do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), foi um desses desbravadores, fazendo as primeiras coletas das espécies das cangas de Carajás naquela época (Mota et al. 2015). As coletas prosseguiram, nas décadas de 1970 e 1980, especialmente restritas às formações rupestres da Serra Norte, que acabaram resultando na publicação da primeira listagem florística para a vegetação em Carajás (Secco e Mesquita 1983).

Após essa fase inicial de estudos florísticos em Carajás, houve um abrupto declínio no número de expedições botânicas na região com consequências desacelerações nos ritmos de depósito de material em herbários e novas publicações sobre avaliação da riqueza florística oriundas da região. Entretanto, o histórico dos espécimes provenientes de Carajás presentes nos herbários foi fonte para a descrição de diversas novas espécies para a flora brasileira (e. g., Barroso e King 1971, Austin 1981, Plowman 1984, Barneby 1991), sendo grande parte dessas conhecidas somente das formações ferríferas de Carajás. Com o tempo, os estudos botânicos ali desenvolvidos deixaram de ter enfoque exclusivamente acadêmico e passaram a compor os estudos de licenciamento ambiental para os projetos desenvolvidos pela Vale, sem perder relevância e cuidado científico.

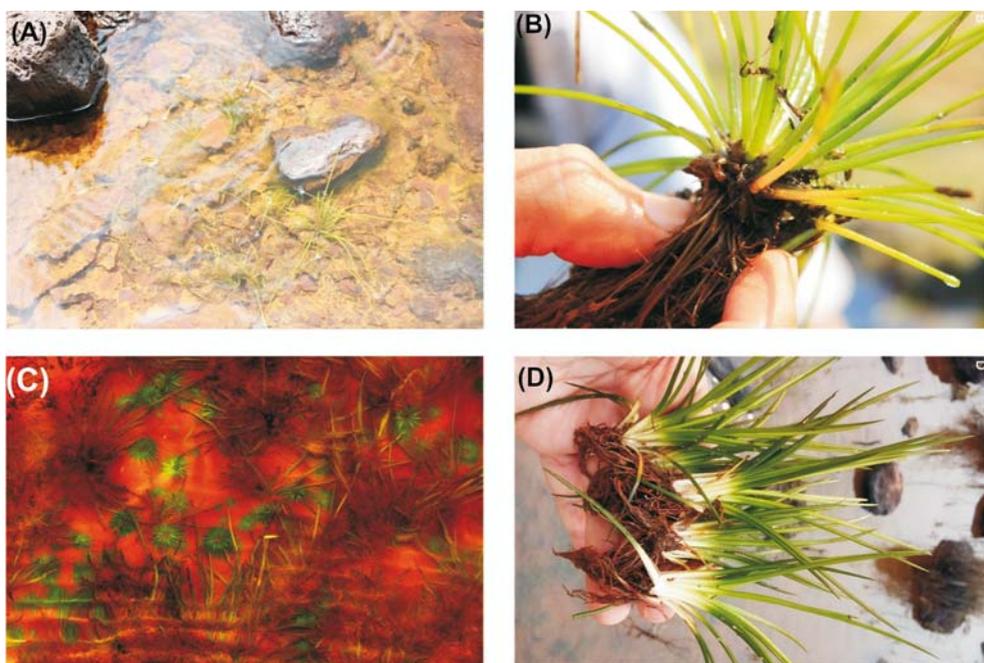
Assim, a partir de 2007, os campos rupestres ferruginosos da Serra dos Carajás começaram a ser mais profundamente estudados especialmente motivados pelo processo de licenciamento ambiental do “Projeto Ferro Carajás S11D” (Projeto S11D) (Golder 2010, 2011b, 2013a), Área Mínima de Canga (Golder 2007, 2009, 2011a) e estudo da Biodiversidade da Serra da Bocaina (Golder 2013b), sendo que este último subsidiou a criação do Parque Nacional dos Campos Ferruginosos em 2017. Esses estudos envolveram botânicos de diversas instituições de pesquisas, em especial da Universidade Federal de Minas Gerais, apoiados por pesquisadores de diversas outras instituições ao redor do mundo, que contribuíram significativamente para a ampliação do conhecimento da flora endêmica de Carajás.

Os estudos de licenciamento ambiental permitiram o reconhecimento de uma série de novas espécies de plantas com sementes, como *Philodendron carajasense* E. G. Gonç. e A. J. Arruda (Gonçalves e Arruda 2013), *Borreria elaiosulcata* e *B. carajasensis* E. L. Cabral e L. M. Miquel (Cabral et al. 2012),

além de um novo gênero de Rubiaceae restrito à Serra Sul, *Carajasia cangae* R. M. Salas, E. L. Cabral e Dessein (Salas et al. 2015). Novas espécies dos grupos de plantas sem sementes também foram descritas do local como *Blechnum areolatum* V. A. O. Dittrich e Salino (Dittrich et al. 2012), *Thelypteris amazônica* Salino e R. S. Fernandes (Salino et al. 2011) e *Thelypteris indusiata* Salino (Salino et al. 2014).

Entre novas espécies descritas para os campos rupestres ferruginosos de Carajás, a descoberta de duas espécies de *Isoëtes* fascinaram os botânicos envolvidos nos estudos. *Isoëtes* é reconhecido por muitos naturalistas como verdadeiros “fósseis vivos” por apresentar sua forma muito parecida com as plantas que dominaram as florestas do planeta há mais de 300 milhões de anos. A descoberta de espécies endêmicas como *Isoëtes* destacou Carajás como um berço de relevante endemismo e diversidade, dados o tempo geológico desse sistema continental e a possibilidade de ele abrigar representantes de floras ancestrais.

Esse intrigante grupo de plantas foi inicialmente registrado no ano de 2007 em Carajás por pesquisadores como Leonardo Vianna, Nara Mota, Pedro Viana e suas equipes. Subsequentemente, vários outros registros foram realizados por André Arruda, Bruno Falcão, Thaís Almeida, entre outros. Inicialmente, acreditava-se na ocorrência de uma única espécie. A possibilidade de existência de duas novas espécies de *Isoëtes* para Carajás emergiu posteriormente, na dissertação de mestrado de André Arruda (Arruda 2014), após diversas coleções terem sido analisadas pelo pesquisador Jovani Pereira, que estava realizando estudos taxonômicos e filogenéticos no gênero (figura 3.1). A efetiva confirmação e publicação dessas duas novas espécies, *I. cangae* e *I. serracarajensis*, ocorreu no ano de 2016 (Pereira et al. 2016).



**Figura 3.1** Primeiros registros fotográficos de *Isoëtes* sp2: (A) ambiente de ocorrência; (B) visão geral do indivíduo e *Isoëtes* sp1; (C) foto do hábitat; e (D) visão dos indivíduos retirados da dissertação de Arruda (2014).

Os nomes dessas espécies fazem referências aos locais dos registros de ocorrência. *Isoëtes serracarajensis* leva este nome por ser amplamente distribuída nos corpos de canga das diversas serras de Carajás (Serra Norte, Serra Sul, Cristalino, Serra do Tarzan e Serra da Bocaina) e *Isoëtes cangae* é registrada somente no Lago do Amendoim, um dos lagos naturais sobre um dos platôs de Serra Sul.

O ponto de relevância dessa descoberta é que o táxon, inicialmente denominado *Isoëtes* sp. 2 (= *I. cangae*), estava restrito a uma área destinada ao licenciamento ambiental do Projeto S11D, o que representava um alto risco de extinção de um táxon que ainda não havia sido descrito pela ciência, caso o projeto fosse autorizado pelo órgão licenciador. Esse quadro delineado demandou a adoção de ações específicas da empresa para a conservação das populações e a preservação da espécie, assim como a revisão do projeto em licenciamento.

Contudo, antes dessa avaliação pelo órgão licenciador, a pergunta que precisava ser respondida era se *Isoëtes* sp. 2, registrada unicamente no Lago do Amendoim e, tendo sua única população conhecida restrita à área dire-

tamente a ser impactada pelo futuro empreendimento, se diferenciava de *Isoëtes* sp1, cuja distribuição era mais ampla, embora tivesse também populações a serem impactadas pelo empreendimento em questão. Foram realizadas consultas ao material depositado no Herbário da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB), bem como novas coletas realizadas ao longo de estudos focados no Estudo de Impacto Ambiental (EIA) do Projeto S11D e em outras frentes dentro da Floresta Nacional de Carajás e seu entorno, sendo observados morfotipos intermediários com relação aos caracteres morfológicos utilizados por Arruda (2014), levantando novos questionamentos quanto à diferenciação das espécies e à necessidade de aprofundar os estudos morfométricos e genéticos.

Após nova análise do material pelo especialista Jovani Pereira, foi confirmado o reconhecimento de dois táxons distintos para a Floresta Nacional de Carajás, considerando, além dos caracteres já avaliados, o hábitat de registro e a análise morfológica dos megásporos (principal caráter utilizado na identificação e separação dos táxons no gênero). Assim, em 2015, foi publicado o manuscrito apresentando duas espécies de *Isoëtes* para a Flona de Carajás, *Isoëtes serracarajensis* (distribuída nos ambientes alagados da região) e *Isoëtes cangae* (Pereira et al. 2015).

Com a confirmação dos táxons como espécies distintas, surgiu a necessidade de um estudo aprofundado sobre as *Isoëtes* de Carajás, visando subsidiar o licenciamento do Projeto S11D, uma vez que a presença de uma espécie cuja única população representava um impeditivo relevante à instalação da futura mina, restringindo uma porção considerável da área prevista de exploração mineral.

Com base no contexto delineado, a Licença de Operação (LO nº 1 361) do Projeto Ferro Carajás S11D foi emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) em dezembro de 2016, incluindo condicionantes referentes às intervenções nos lagos do Violão e do Amendoim e à conservação das populações das espécies de fauna e flora que dependem desses ambientes. A condicionante 2.4 estabeleceu a preservação integral desses lagos, mantendo um raio de 500 metros de proteção, incluindo as respectivas áreas de contribuição, devendo essa área permanecer restrita ao avanço do projeto de mineração até que os estudos fossem concluídos. Adicionalmente, foi ainda estabelecida a condicionante 2.14, que determinava a necessidade de garantir a conservação *in situ* de percentuais viáveis das populações que dependem dos lagos do Amendoim e do Violão. Posteriormente, tal restrição ficou mais explícita com a Nota Técnica nº 10/2016 do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), em que o instituto reiterou que:

O lago do Amendoim é *habitat* de uma espécie que até o momento não foi encontrada em nenhum outro lugar, sendo que o atual plano de manejo da UC estabelece que mesmo na zona de mineração: áreas com a presença de espécies endêmicas da Floresta Nacional de Carajás só poderão ser mineradas caso a espécie esteja presente em outras áreas da FN, protegidas da mineração e que sejam suficientes para a manutenção de populações viáveis da mesma.

Com o intuito de embasar tomadas de decisão para execução de ações efetivas de conservação de *Isoëtes cangae*, foi iniciado em 2016 um grande projeto de pesquisas científicas, com a participação da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), representada pelo Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade (NUPEM) em parceria com o Instituto Tecnológico Vale para o Desenvolvimento Sustentável (ITVDS) para aprofundar o conhecimento sobre ecologia, genética, propagação, elaboração e execução de protocolos de reprodução e introdução da espécie. Os resultados dos estudos de pesquisa são de caráter multidisciplinar, no campo da biologia, garantindo extenso conhecimento sobre características ecológicas e exigências bióticas e abióticas da espécie. Esse conhecimento inclui a capacidade de garantir a sobrevivência, reprodução e diversidade biológica mesmo em situações artificiais de cultivo e em ambientes onde a espécie se desenvolve de forma experimental. Adicionalmente, práticas para conservação *ex situ* de seus esporos e de indivíduos vivos também têm tido sucesso, permitindo manter coleções vivas de indivíduos em viveiro e garantindo que a variabilidade genética da espécie seja preservada em bancos genéticos e de germoplasma.

## 3.2 História do Gênero no Brasil

*Isoëtes Linnaeus* consiste em um gênero cosmopolita de licófitas aquáticas, terrestres ou de ambientes sazonalmente inundados (Taylor e Hickey 1992). O gênero possui cerca de 250 espécies e é encontrado em todo o mundo. No Brasil, o gênero apresenta 33 espécies, das quais 28 são endêmicas. Espécies de *Isoëtes* ocorrem em quase todos os estados da Federação, sendo encontrados em ambientes aquáticos permanentes ou temporários em áreas de vegetação abertas.

Os primeiros registros do gênero no Brasil ocorreram no início do século 19, quando foram realizadas as coletas das duas primeiras espécies do gênero no Brasil, *Isoëtes amazonica* e *I. gardneriana*. Até recentemente a taxonomia do gênero havia sido pouco estudada, por pertencer a um grupo de plantas aparentadas das pteridófitas, negligenciada na maior parte dos

inventários botânicos, e que vivem submersas em ambientes aquáticos, onde acabam sendo confundidas com outras espécies de macrófitas típicas desses ambientes. Foram os trabalhos acadêmicos do pesquisador Jovani Pereira que suscitaram a realização de estudos taxonômicos e filogenéticos mais profundos do gênero do Brasil.

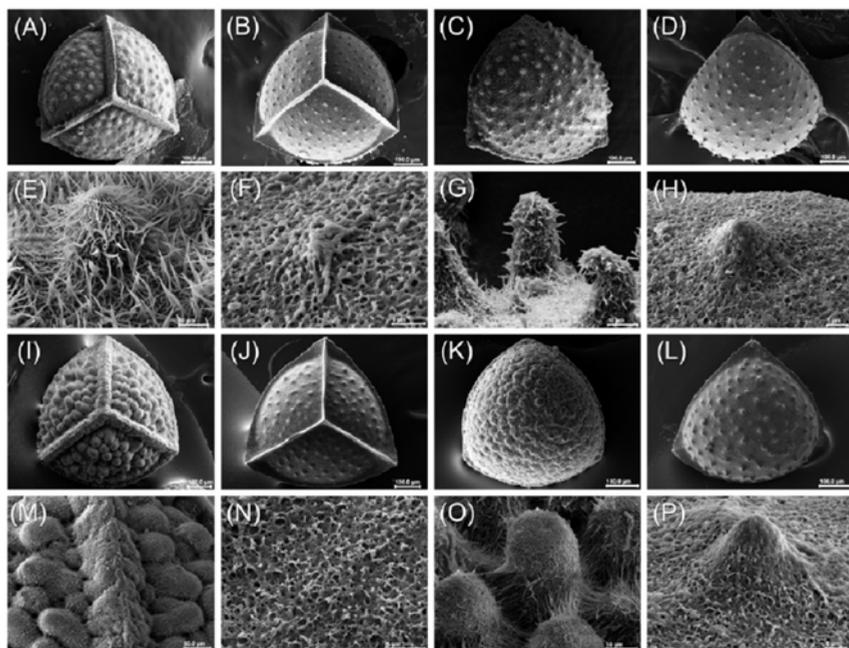
### 3.3 Estudos Moleculares e Morfométricos

A respeito das questões identitárias que envolviam as duas espécies de *Isoëtes* descritas para a Serra dos Carajás, uma série de estudos multidisciplinares foram executados a fim de se elucidar a natureza taxonômica de *I. cangae* e *I. serracarajensis*. Estas investigações culminaram na publicação de um estudo integrativo (Nunes et al. 2018), com diversas abordagens morfológicas e moleculares.

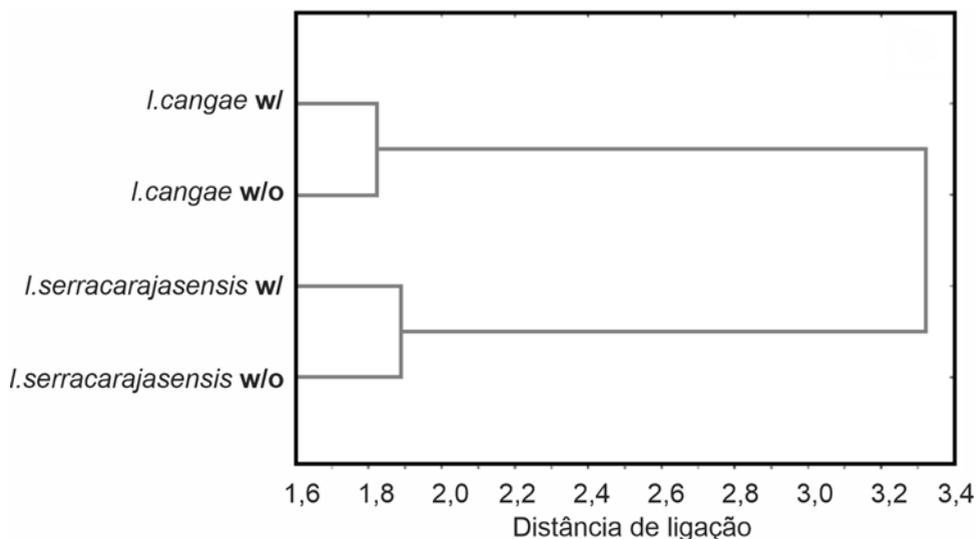
As duas espécies foram diretamente comparadas, tomando-se diversas medidas de suas estruturas. Foi revelada uma sobreposição dos fenótipos das espécies em relação à morfologia das folhas, evidenciada pelas análises de *cluster* com base em medidas morfométricas dessa estrutura. A comparação do conjunto de dados das duas espécies indica uma morfologia mais homogênea de *I. serracarajensis* e maior variação em *I. cangae*, com evidente sobreposição na morfometria foliar das espécies. De maneira geral, *I. cangae* apresenta folhas maiores do que *I. serracarajensis*, mas essa característica não pode ser tomada como diagnóstica para as espécies comparadas.

Outra estrutura analisada foi o megásporo, que, inclusive, foi determinante para a descrição desses táxons como espécies distintas. Dados levantados sobre a ornamentação do megásporo e análises morfométricas dessa estrutura revelaram grande poder de diferenciação entre as duas espécies de *Isoëtes* (figura 3.2). As análises foram conduzidas com e sem a cobertura de sílica que envolve o megásporo. Considerando os megásporos com sílica, em *I. cangae*, eles são verrucados a tuberculados, com hastes e radículas fundidas na face proximal e distal. Em *I. serracarajensis*, os megásporos são predominantemente verrucados, raramente tuberculados, com hastes e radículas também fundidas na face proximal e distal. Após a remoção da sílica, *I. serracarajensis* torna-se totalmente verrucado, e ambas as espécies apresentaram radículas em ambas as faces, além disso a distância entre as verrugas é geralmente menor em *I. serracarajensis*. A combinação de todos os parâmetros mensurados resultou em clara distinção das espécies com base na Análise de Componente Principal (PCA), sendo a presença de tubérculos um

fator dominante para distinguir as espécies. De maneira geral, a remoção da cobertura de sílica influenciou o resultado da análise de PCA, melhorando a separação das duas espécies (figura 3.3).



**Figura 3.2** Megásporos de *Isoetes* (marca trilete na face proximal). *I. cangae* (A) Ic5: face proximal, megásporo verrucado (com sílica); (B) Ic7: proximal face, megásporo verrucado a tuberculoso (sem sílica); (C) Ic4: face distal, megásporo verrucado a tuberculoso (com sílica); (D) Ic7: face distal, megásporo tuberculoso a verrucado (sem sílica); (E) Ic7, detalhe da verruga e varetas fundidas (com sílica); (F) Ic4: detalhe da verruga e radícula fundida na face proximal; (G) Ic8: tubérculos e varetas fundidas na face proximal (com sílica); (H) Ic7: detalhe da verruga e radícula fundida (densamente compactada) na face proximal (sem sílica); *I. serracarajensis*; (I) IsD8: face proximal, megásporo verrucado (com sílica); (J) IsD8: face proximal, megásporo verrucado (sem sílica); (K) IsB2: face distal, megásporo verrucado (com sílica); (L) IsD2: face distal, megásporo verrucado (sem sílica); (M) IsD1: detalhe dos raios e verrugas na face proximal (com sílica); (N) IsB1, detalhe das radículas fundidas na face distal (sem sílica); (O) IsB5: detalhe das verrugas e varetas fundidas na face distal (com sílica); (P) IsD2: detalhe das verrugas e radícula fundida (densamente compactada) na face proximal (sem sílica). Barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ , exceto F, H, N e P, que é 5  $\mu\text{m}$ . Ic: *I. cangae*, *I. serracarajensis*, I. (B e D): *I. serracarajensis* do S11B e do S11D, respectivamente.



**Figura 3.3** (A) PCA de dados morfológicos do megásporo *Isoëtes* mostrando grupo de tubérculos diferenciado de outros parâmetros (variância total: 91,5 %); (B) Agrupamento distinto de *I. cangae* de *I. serracarajensis* com (w/l) e sem (w/o) revestimento de sílica.

Não foi observada diferença no número de micrósporos produzidos a partir dos microsporângios na base de cada esporófito. Os micrósporos de *I. cangae* foram menores nas medidas equatoriais e polares em comparação com *I. serracarajensis*, embora isso não possa ser considerado um caráter diagnóstico.

Análises de DNA *barcoding* identificaram duas populações distintas de *Isoëtes*. Todos os marcadores de cloroplasto testados produziram sequências idênticas, ao passo que o marcador ITS2 foi capaz de separar, com alta confiabilidade, grupos correspondentes às espécies *I. cangae* e *I. serracarajensis*. Apesar de *I. serracarajensis* ser amplamente disseminada na região, não foi observada diferenciação entre unidades amostrais em áreas geograficamente distantes.

Em relação ao genoma do cloroplasto das duas espécies, ambos são muito semelhantes, mas possuem características que os permitem distinguir. Uma das pequenas diferenças entre as espécies de Carajás foi um éxon ausente no gene *clpP*, além de um fragmento intergênico entre os genes *atpB* e *ndhK*. Pequenas regiões com poucas semelhanças entre as espécies também foram registradas, como os genes *thepsaA* e *psaB*. Uma análise mais aprofundada dos genomas do cloroplasto indicou que a análise de SNP poderia diferenciar as duas espécies.

### 3.4 Buscas e Espécies do Brasil

Trabalhos de campo foram realizados em várias localidades na Amazônia, no Cerrado e na Caatinga para buscar novos registros de *I. cangae* e *I. serracarajensis*, além dos limites das áreas de canga. A escolha das áreas foi baseada em registro de herbários, bem como na seleção de localidades com características semelhantes às encontradas em Carajás (rios, lagos ou poças temporárias, oligotróficos, em ambientes com clima tropical). Nas pesquisas de campo foram buscadas as espécies morfológica e filogeneticamente mais próximas às espécies de *Isoëtes* da Flona de Carajás para entender os possíveis fatores evolutivos e ambientais que potencialmente levaram *I. cangae* e *I. serracarajensis* a serem endêmicas da canga. Os materiais coletados foram herborizados, usando técnicas usuais para preservação de material botânico e tombados no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi (acrônimo MG). Também, os materiais foram coletados para análises filogenéticas moleculares.

As espécies morfológica e/ou filogeneticamente próximas a *I. cangae* e *I. serracarajensis* foram encontradas em oito excursões de coletas: Apeú Salvador, PA – junho 2017 (*I. triangula*); Santarém, PA – julho 2017 (*I. amazonica*); Terenos, MS – novembro 2017 (*I. gardneriana*); Chapada das Mesas e Serra das Andorinhas, MA e PA, respectivamente – dezembro 2017 (*I. panamensis lato sensu*); Barreiras e Correntina, BA (*I. panamensis*); Patos e Estação Ecológica do Seridó, PB e RN, respectivamente – abril 2018 (*I. luetzelburgii strict sensu*); Serra do Cipó e Diamantina, MG – junho 2018 (*I. panamensis* e *I. gigantea*); Xique Xique e Iaçú, BA – abril 2019 (*I. luetzelburgii lato sensu*).

Entre as espécies coletadas destacam-se *I. gardneriana* e *I. amazonica*, conhecidas apenas pelos materiais originais coletados há mais de 164 anos (Pereira et al. 2019) – figura 3.4. Análises morfológicas preliminares mostram que *I. amazonica* e *I. serracarajensis* são mais similares entre si do que com qualquer outra planta da Amazônia (Pereira et al. 2016). Desta forma, a inclusão de mais populações de *I. amazonica* nas análises morfológicas e filogenéticas moleculares permitiu abordar de forma mais nítida a natureza das relações entre essas duas espécies.



**Figura 3.4** Distribuição geográfica, hábito e hábitat de *Isoëtes amazonica* e *I. gardneriana*. (A) Localização onde *Isoëtes amazonica* e *I. gardneriana* foram redescobertas no Brasil (localização tipo de *I. gardneriana* em pentágono azul); (B-C) *Isoëtes amazonica* (Pereira 1015, MG); (B) hábitat; (C) hábito; (D-E) *Isoëtes gardneriana* (Pereira 1028, MG); (D) hábitat; (E) hábito.

Ambos *I. panamensis* e *I. luetzelburgii* formam agregados de espécies morfológicamente bastante semelhantes, mas filogeneticamente distintas, e ocupam diferentes posições na filogenia (Pereira et al. 2021). Deste modo, para recuperar as relações filogenéticas entre essas espécies com os *Isoëtes* de Carajás, foi fundamental obter várias amostras dessas espécies de diferentes localidades.

Também, a coleta de *I. triangula* é o primeiro registro do gênero para área de restinga no Brasil (figura 3.1), demonstra a enorme capacidade do gênero de colonizar diferentes ambientes, dadas as características geológicas recentes das áreas de restinga.

### 3.5 Filogenia do Gênero

No contexto da conservação, a reconstrução das relações filogenéticas pode fornecer compreensão importante das condições ambientais em que as espécies viviam no passado e dos processos evolutivos e fatores que levaram as espécies a se manterem nos ambientes, bem como permitem traçar uma conexão entre ancestralidade filogenética e conservação dos habitats atuais, dando uma visão abrangente das condições ambientais requeridas pelas espécies. Entre os vários elementos necessários para reconstruir a história evolutiva de um grupo, estão a adequada amostragem de espécies (por meio de trabalho de campo), o reconhecimento do seu nível de ploidia (por meio de contagem cromossômica ou medida do tamanho de genoma) e a correta seleção dos marcadores moleculares.

No contexto de Carajás, entender a história natural e evolutiva de *I. cangae*, que ocorre em apenas um lago em Carajás, não é apenas cumprir com uma condicionante do licenciamento de suas atividades de conservação junto ao ICMBio, mas também uma forma de contribuir com o conhecimento e prever, estimar e contornar os iminentes riscos envolvidos em possíveis processos de colonização assistida de novos ambientes pela espécie. Consequentemente, isso tem impacto direto em planos de conservação e restauração.

Estudos filogenéticos recentes (Pereira et al. 2020, 2021) mostraram que *Isoëtes cangae* e *I. serracarajensis* são filogeneticamente próximas, pertencentes a um grupo de espécies bastante diverso, típico em áreas mais áridas do Brasil, como o Cerrado e a Caatinga. Deste modo, acredita-se que a ocorrência de *I. cangae* em um lago permanente seja uma adaptação derivada e específica dessa espécie, sendo que a maioria de seus parentes e, possivelmente, seu ancestral ocorriam em áreas sazonalmente alagadas.

### 3.6 Conclusão

Os estudos botânicos em Carajás, sempre contribuíram para o conhecimento botânico da região, especialmente em relação às duas espécies de *Isoëtes*, demonstrando a importância de pesquisas de cunho científico associadas ao licenciamento ambiental e da continuidade dessas pesquisas após o Estudo de Impacto Ambiental (EIA/RIMA). Para tal, um projeto de pesquisa científica foi iniciado para aprofundar o conhecimento sobre a ecologia, genética e reprodução dessas espécies, a fim de subsidiar ações efetivas de conservação, sendo a taxonomia apenas o início de tudo que foi desenvolvido. Além disso, a descoberta e a descrição dessas espécies destacaram a região como um berço de diversidade morfológica e genética e ressaltaram a necessidade de esforços contínuos para proteger e preservar as espécies endêmicas de Carajás.

### Referências

- Arruda, A. J. 2014. Samambaias e licófitas das serras ferruginosas da Floresta Nacional de Carajás, Pará, Brasil. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 224 pp.
- Austin, D. F. 1981. Novidades nas Convolvulaceae da flora amazônica. – Acta Amaz 11: 291-295.
- Barneby, R. C. 1991. *Sensitivae censitae*: a description of the genus *Mimosa* Linnaeus (Mimosaceae) in the New World. Memoirs of the New York Botanical Garden, New York 65: 835 pp.
- Barroso, G. M. e King, R. M. 1971. New Taxa of Compositae (Eupatorieae) from Brazil. – Brittonia 23: 118-121.
- Cabral, E. L. et al. 2012. Two new species of *Borreria* (Rubiaceae) from Brazil, with new distributional records for Pará State and a key to species with transversally sulcate seeds. – Ann Bot Fennici 49: 209-215.
- de Oliveira Dittrich, V. A. et al. 2012. Two new species of the fern genus *Blechnum* with partially anastomosing veins from Northern Brazil. – Syst Bot 37: 38-42.
- Golder Associates Brasil Consultoria E Projetos Ltda/VALE. 2007. Estudos de Similaridade das Paisagens de Savana Metalófila da Região de Carajás – PA. Arcabouço Metodológico Projeto de Pesquisa Científica Parauapebas e Canaã dos Carajás, PA.

Golder Associates Brasil Consultoria E Projetos Ltda/VALE. 2009. Relatório de Análise de Similaridade das Paisagens de Savana Metalófila – 2ª Aproximação e Recorte Espacial Preliminar da Área Mínima de Canga, Consoante com o Estudo para Avaliação do Tamanho Mínimo Viável de Áreas de Vegetação de Canga na Floresta Nacional de Carajás – ETAPA 2. Parauapebas e Canaã dos Carajás, PA.

Golder Associates Brasil Consultoria E Projetos Ltda/VALE. 2010. EIA/RIMA do Projeto Ferro Carajás S11D. Protocolado em Julho de 2010.

Golder Associates Brasil Consultoria E Projetos Ltda/VALE. 2011a. Projeto de Área Mínima de Canga/Relatório de Análise de Similaridade das Paisagens de Savana Metalófila – 3ª aproximação – Relatório Parcial R2.

Golder Associates Brasil Consultoria E Projetos Ltda/VALE. 2011b. Relatório Consolidado do Diagnóstico de Flora da ADA/AID do Projeto Ferro Carajás S11D. Protocolado em Agosto de 2011. Documento Golder RT-079-515-5020-0062-02-J.

Golder Associates Brasil Consultoria E Projetos Ltda/VALE. 2013a. Relatório Final do Projeto de Distribuição Geográfica das Espécies Novas para a Ciência Registradas na AID do Projeto Ferro Carajás S11D. RT-013\_119-515-5008\_04-J.

Golder Associates Brasil Consultoria E Projetos Ltda/VALE. 2013b. Projeto Bocaina/Diagnóstico da Biodiversidade da Serra da Bocaina. RT-010\_109-515-5008\_01-J.

Gonçalves, E. G. e Arruda, A. J. 2014. *Philodendron carajasense* sp. nov. (Araceae), a rheophyte from Carajás Mountain Range, northern Brasil. – Nord J Bot 32: 536-539.

Mota, N. de O. et al. 2015. Vegetação sobre sistemas ferruginosos da Serra dos Carajás. – Geossistemas Ferruginosos no Brasil. Instituto Prístino, Belo Horizonte: 289-315.

Nunes, G. L. et al. 2018. Quillworts from the Amazon: A multidisciplinary populational study on *Isoëtes serracarajensis* and *Isoëtes cangae*. – PLoS ONE 13: e0201417.

Pereira, J. B. D. S. et al. 2016. Two new species of *Isoëtes* (Isoetaceae) from northern Brazil. – Phytotaxa 272: 141-148.

Pereira, J. B. S. et al. 2019. Rediscovering two *Isoëtes* species in the Brazilian Amazon and Cerrado after 167 years. – PhytoKeys 135: 105-117.

- Pereira, J. B. S. et al. 2021a. Chloroplast genomes of key species shed light on the evolution of the ancient genus *Isoëtes*. – J Syst Evol 59: 429-441.
- Pereira, J. B. S. et al. 2021b. Plastome-based phylogenomics elucidate relationships in rare *Isoëtes* species groups from the Neotropics. – Mol Phylogenet Evol 161: 107177.
- Plowman, T. 1984. New taxa of *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae) from the Amazon basin. – Acta Amaz 14: 117-144.
- Salas, R. M. et al. 2015. *Carajasia* (rubiaceae), a new endangered genus from carajás mountain range, Pará, Brazil. – Phytotaxa 206: 14-29.
- Salino, A. et al. 2011. *Thelypteris amazonica* sp. nov. (Thelypteridaceae) from Amazonian Brazil. – Nord J Bot 29: 611-614.
- Salino, A. et al. 2014. *Thelypteris indusiata* (Thelypteridaceae), a new fern species from Amazonian Brazil. – Phytotaxa 156: 279-284.
- Secco, R. de S. e Mesquita, A. L. 1983. Notas sobre a vegetação de Canga da Serra Norte – I. – Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Nova Série Botânica, Belém 59: 1-13.
- Taylor, W. C. e Hickey, R. J. 1992. Habitat, evolution, and speciation in *Isoëtes*. – Ann Mo Bot Gard 79: 613-622.

## CAPÍTULO 4

---

---

# Ferramentas e Avanços no Campo da Genética da Conservação de *Isoëtes* sp. da Serra dos Carajás

\* Mirella Pupo Santos \* Antônio Jesus Dorighetto Cogo  
\* Rodrigo Nunes da Fonseca \* Lupis Ribeiro  
\* Arthur Vinícius de Sant'anna Lopes \* Luigi Pereira Cunha  
\* Cecílio Frois Caldeira; \* Jeronymo Dalapicolla  
\* Santelmo Vasconcelos \* Guilherme Oliveira

TÍTULO CURTO (*RUNNING TITLE*)

---

---

Genética da Conservação de *Isoëtes*

## Resumo

A diversidade genética das populações assegura possíveis adaptações às mudanças ambientais e aos demais eventos associados a perda ou degradação dos habitats. Populações reduzidas tendem a diminuir a variabilidade genética em poucas gerações como consequência da deriva gênica, da fixação ou extinção de alelos, enquanto em populações maiores o efeito é mais demorado. A genética para conservação busca preservar essa diversidade genética das populações, especialmente àquelas ameaçadas ou em vias de extinção, fornecendo subsídios capazes de definir as melhores estratégias para o manejo da espécie. Além disso, a caracterização da diversidade genética auxilia na previsão adaptativa de uma população, contribuindo, inclusive, no conhecimento sobre o processo sucessional de espécies. Em virtude de sua importância, métodos com marcadores moleculares têm sido utilizados para caracterizar a diversidade genética das populações, sendo esses marcadores normalmente categorizados como técnicas que utilizam a hibridização, a reação em cadeia de polimerase (ou PCR) e o sequenciamento de nova geração. Estudos iniciais conduzidos na espécie *Isoëtes cangae* e *Isoëtes serracarajensis*, encontradas nos ambientes de canga na Serra dos Carajás, indicaram um alto fluxo gênico e uma alta diversidade genética intrapopulacional. Em *Isoëtes serracarajensis*, foi encontrada variação geográfica entre populações de diferentes cangas, indicando que há algum grau de isolamento geográfico e baixo fluxo gênico nessa espécie. Já para *Isoëtes cangae*, dados genômicos indicaram ausência de endogamia apesar de sua distribuição restrita. Além disso, indivíduos de *Isoëtes* podem ser tratados como uma unidade demográfica, com tamanho populacional grande. Em conjunto, os dados fornecem informações para ações práticas nos programas de manejo de *Isoëtes*.

**Palavras-chave:** genética da conservação; diversidade genética; marcadores moleculares; manejo de populações.

## 4.1 A Importância dos Estudos de Diversidade Genética e a Conservação das Espécies

As perturbações ecológicas e a destruição de habitats causadas por mudanças climáticas associadas às atividades humanas têm colocado em risco um número sem precedentes de espécies, em um evento já denominado Extinção em Massa do Antropoceno (Ceballos et al. 2015, Ceballos e Ehrlich 2018). Nesse sentido, a diversidade genética despontou como elemento básico no estudo da biodiversidade desde a Convenção sobre Diversidade Biológica (CBD; [www.cbd.int](http://www.cbd.int)), iniciada com a Cúpula da Terra no Rio de Janeiro, em 1992, conforme apresentado no capítulo 1. A partir de então, a análise da diversidade genética tem sido utilizada como ferramenta de vigilância nos estudos de conservação de populações ameaçadas.

A diversidade genética constitui toda a variabilidade de alelos e genótipos entre indivíduos, grupos de indivíduos ou populações, refletindo as diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais, capazes de alterar a aptidão e a persistência dos indivíduos ou populações a longo prazo (Frankham et al. 2002, Toro e Caballero 2005). Cabe destacar que nem toda variação genética é potencialmente adaptativa, porém, dada a dificuldade de se prever as mudanças ambientais, a existência dessa variabilidade aumenta as chances de sobrevivência das espécies (Frankham et al. 2002, Markert et al. 2010, Ho e Zhang 2018). Em um contexto mais prático, a diversidade genética é classificada como neutra, deletéria ou adaptativa (Hedrick 2001). As variantes neutras são normalmente utilizadas em estudos de conservação, enquanto as variações deletérias e adaptativas, embora sejam importantes para a sobrevivência da população, são frequentemente utilizadas em programas de melhoramento genético de plantas e animais por fornecerem informações de características economicamente interessantes (Toro e Caballero 2005). Além da adaptação baseada em genes, é importante ressaltar que a plasticidade fenotípica como resultado de ajustes fisiológicos ou modificações epigenéticas também representa mecanismos alternativos da aptidão individual em ambientes variáveis (Kingsolver e Buckley 2017).

A baixa diversidade genética das populações está normalmente associada à redução na expectativa de vida e à menor capacidade de crescimento populacional (Spielman et al. 2004), enquanto níveis mais altos são frequentemente associados à sobrevivência e à garantia do potencial adaptativo frente às rápidas mudanças ambientais (Markert et al. 2010). O potencial adaptativo aumenta a capacidade de resposta das populações às pressões ambien-

tais e seletivas por mudanças fenotípicas e/ou moleculares (Hoffmann et al. 2017), tornando as populações mais robustas. Dessa forma, a variabilidade genética contribui na seleção natural por fornecer a plasticidade fenotípica da espécie a novos ambientes, além de proporcionar conhecimentos sobre as relações filogenéticas e a evolução molecular (Ho e Zhang 2018).

Ainda citando o primeiro capítulo, fatores ambientais e não genéticos, como destruição e fragmentação de habitats, introdução de espécies invasoras, rápida mudança climática ou poluição são os principais causadores da redução no crescimento populacional e propulsores da taxa de extinção (Foden et al. 2019). Neste contexto, a criação de unidades de conservação tem sido a abordagem preferível para a conservação da biodiversidade, pois proporciona o conhecimento sobre o manejo adequado de espécies ameaçadas. Apesar das vantagens da conservação *in situ*, o material genético de plantas também pode ser conservado *ex situ*, em bancos de sementes, pomares, coleções de clones e/ou jardins botânicos, principalmente quando o tamanho populacional é criticamente baixo na natureza (Koskela et al. 2013). A conservação das populações *in situ* tem a vantagem de garantir a manutenção de processos dinâmicos da evolução em habitats, que imprime mudanças temporais e espaciais na diversidade genética, enquanto populações *ex situ* são estáticas, mantendo uma alíquota da diversidade genética amostrada. Além disso, a conservação de populações *in situ* também é um modelo mais fácil e barato (Koskela et al. 2013).

A perda da diversidade genética é frequentemente interpretada como um indicador de depressão endogâmica e aumento da deriva gênica. Em populações de tamanho reduzido, poucas gerações podem ser suficientes para reduzir a variabilidade genética da população, seja por deriva gênica, pela fixação ou pela extinção de alelos, enquanto em populações maiores, esse efeito é mais demorado. Desequilíbrios ambientais que reduzem drasticamente o tamanho da população ou impedem sua reprodução também reduzem a variabilidade genética pelo declínio na taxa de heterozigosidade média da população por um evento conhecido como efeito gargalo (Mayr 1963, Nei et al. 1975). Essa redução, em especial em populações pequenas ou raras, pode ser devastadora, pois aumenta a susceptibilidade da espécie a pragas e doenças, bem como às variações ambientais estressantes (Markert et al. 2010).

A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) é uma forma comum de avaliar a variação genética dentro de uma população, e o declínio da heterozigosidade causado pela deriva gênica é calculado por  $1/(2N_e)$  para cada geração, onde  $N_e$  é o número efetivo da população capaz de reproduzir. Assim, o rápido

declínio no tamanho efetivo da população pode causar uma redução imediata no número de alelos (Kimura e Ohta 1969, Isagi et al. 2019). Dessa forma, uma população pequena que tenha, por exemplo,  $N_e = 10$  indivíduos, terá uma perda de 5 % de sua heterozigosidade a cada geração. Além dos efeitos negativos da endogamia, que favorece o aumento da homozigose em populações pequenas, variações genéticas recessivas deletérias também se acumulam com o passar das gerações devido à menor eficácia da seleção purificadora, elevando ainda mais o risco de extinção da espécie (Isagi et al. 2019).

Estudos de meta-análise indicam reduções significativas na diversidade genética de várias espécies após a revolução industrial e demais eventos associados a perda ou degradação dos habitats (Leigh et al. 2019, Miraldo et al. 2016). O avanço em metodologias e abordagens levou ao avanço de ferramentas estatísticas e modelos matemáticos. Modelos populacionais matriciais e análise de viabilidade populacional (PVA, do inglês *Populations Viability Analysis*) surgiram, portanto, como ferramentas para a previsão da trajetória de populações e a comparação de cenários que auxiliam na tomada de decisões que proporcionem a conservação (Menges 2000, Morris e Doak 2002, Brigham et al. 2003). Essas ferramentas podem ser utilizadas tanto na reintrodução de espécies raras (Menges 2008) ou mesmo como parte de um programa de colonização assistida (Vitt et al. 2010). A análise de viabilidade populacional pode responder perguntas decorrentes de novas colonizações de plantas como: quais locais devem ser escolhidos para a colonização assistida? Quais propágulos devem ser utilizados (sementes ou esporos, plantas jovens ou adultas)? Qual o número de propágulos necessários para garantir a criação de uma população viável (número mínimo viável ou tamanho da população fundadora)?

A análise de viabilidade populacional utiliza um modelo populacional estocástico para avaliar a viabilidade de uma espécie, subespécie, metapopulação ou a subpopulação isolada e relaciona-se com a análise da população mínima viável (MVP, do inglês *Minimum Viable Population*), ou seja, estima o número mínimo de organismos de uma determinada espécie, necessário para se constituir uma população viável (Shaffer 1981). Estudos que se baseiam na MVP definem o tamanho necessário a uma população isolada, para que ela tenha alta probabilidade (> 90 %) de persistir nos próximos 100 anos, assim como o número necessário de espécimes coletados e reintroduzidos que assegurarão a reconstrução de uma nova população (Shaffer 1981). O cálculo para obtenção desse número envolve fatores tais como o tipo de reprodução da espécie, o fluxo gênico, a variância genética dentro das popula-

ções e na progênie, além de ser restrito ao número de indivíduos existentes, à disponibilidade de propágulos adequados e ao potencial impacto de coleta nas populações amostradas (Franklin 1980, Shaffer 1981, Matthies et al. 2004). Quando utilizadas corretamente, essas ferramentas proporcionam o desenvolvimento de processos interativos de modelagem e pesquisa de longo prazo que revelam muito sobre a melhor forma de manejar uma espécie.

Conseqüentemente, a estimativa da diversidade genética tem se tornando um pré-requisito para iniciar programas de conservação de espécies ameaçadas. Dentre os parâmetros avaliados, podemos citar: diversidade alélica, estimativa da porcentagem de heterozigose e endogamia, diversidade de nucleotídeos, porcentagem de *Locus* polimórficos, coeficiente de variação genética e herdabilidade (Karp et al. 2001, De Vicente et al. 2004). Todas essas características são amplamente consideradas nos estudos de conservação por fornecerem subsídios para a previsão adaptativa de uma população (Solé et al. 2004, Wehenkel et al. 2011). Dessa forma, propomos expor neste capítulo um conjunto de metodologias de alto poder de produção de parâmetros de diversidade e os mais recentes estudos de diversidade genética realizados, todos utilizados no contexto da necessidade premente de produzir métricas para a conservação de *Isoëtes cangae* e *I. serracarajensis*.

## 4.2 Técnicas de Estudo de Diversidade Genética

Em 1865, o monge agostiniano Gregor Mendel formulou e apresentou um conjunto de trabalhos sobre as leis da hereditariedade a partir de inferências fenotípicas, que embasaria os estudos genéticos e predominaria nos trabalhos de seleções genômicas, melhoramento genético e mapas de ligação até o início da década de 1970. Após esse período, novas técnicas foram desenvolvidas, como a duplicação do DNA *in vitro* pela Reação em Cadeia de Polimerase ou PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) e, a partir da década de 1980, os marcadores fenotípicos foram gradativamente substituídos por marcadores moleculares nos estudos genéticos, inclusive em trabalhos relacionados à conservação de espécies.

Marcadores moleculares evidenciam polimorfismos, que podem surgir devido à alteração de um nucleotídeo ou por mutações no genoma (Hartl e Clark 1997), tornando-se possível identificar diferenças genéticas entre espécies ou organismos (Collard et al. 2005). Assim, marcadores moleculares podem ser definidos como qualquer tipo de dado molecular capaz de distinguir um indivíduo (Kumar 1999, Schulman 2007). Esses marcadores

são ferramentas utilizadas em estudos que estimam a variação genética de populações, no monitoramento do nível de diversidade genética em espécies-chave e na compreensão de mecanismos evolutivos relacionados à variação genética (Adhikari et al. 2017). Os marcadores moleculares evoluíram paralelamente aos avanços das técnicas da biologia molecular, com uma série de novas metodologias e ferramentas de análise. Eles podem ser divididos em três categorias principais: 1) os baseados em hibridização; 2) os baseados em PCR; e, por fim, 3) os marcadores baseados em sequenciamento. Os principais métodos de análise molecular da diversidade genética utilizados para o gênero *Isoëtes* são apresentados a seguir.

#### 4.2.1 Técnicas baseadas em hibridização

Sistemas de marcação genética baseados em hibridização estão apoiados na propriedade de pareamento de bases complementares. Os marcadores RFLP (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), ou Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição, baseiam-se em hibridização e foram não só os primeiros marcadores baseados em DNA desenvolvidos, mas também os primeiros utilizados para construção de mapas de ligação (Botstein et al. 1980, Paillard et al. 1996). A técnica baseia-se em digerir todo o DNA das amostras por meio da ação de enzimas de restrição e é especialmente adequada na análise de indivíduos com baixa divergência genética (Willians et al. 1993).

Nesse método, após a digestão do DNA pelas enzimas, os polimorfismos são revelados por um padrão único de marcação por meio de eletroforese em gel e o uso de sondas radioativas ou fluorescentes. Uma sonda RFLP é uma sequência de DNA que hibridiza com um ou mais fragmentos de DNA da amostra. O ensaio de RFLP é específico para combinação de um clone único e a sua enzima de restrição.

Uma grande vantagem do método é a sua ação *locus* específico, sendo um marcador informativo. A maioria dos marcadores RFLP são codominantes, isto é, ambos os alelos na amostra heterozigota são detectados. No entanto, esses marcadores têm baixo rendimento em função da grande quantidade de DNA genômico (gDNA) necessária e alto grau de pureza. O uso de RFLP tornou-se menos comum à medida que mais novos, baratos e poderosos marcadores foram desenvolvidos.

#### 4.2.2 Técnicas que utilizam a Reação em Cadeia da Polimerase ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Diversos métodos de análises de diversidade molecular foram desenvolvidos a partir do surgimento da PCR, uma vez que a técnica permite a ampliação de uma grande quantidade de DNA sem a necessidade de clonagem (Mullis 1994, Saiki 1988). Em síntese, na técnica de PCR, fragmentos de DNA específicos podem ser amplificados a ponto de serem detectados utilizando-se intercalantes de DNA, radioativos ou não. A amplificação do DNA é realizada pela DNA polimerase, que catalisa a síntese de uma nova fita, em uma reação contendo iniciadores curtos (*primers*) e um DNA de fita única como substrato. A separação e a análise dos produtos da PCR podem ser realizadas por meio da chamada eletroforese em gel. A técnica consiste na divisão dos fragmentos de DNA de tamanhos diferentes quando são carregados por um gel de agarose ou poliacrilamida, sob um campo elétrico. O gel, então, é corado com intercalantes de DNA (e. g., brometo de etídio) que marcam, sob luz UV, os fragmentos em bandas para visualização.

O DNA Polimórfico Aleatoriamente Amplificado (RAPD, do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*) é um método utilizado a partir de 1990 para identificação de polimorfismos genéticos, sendo o primeiro marcador baseado em amplificações via PCR (Orozco-Castillo et al. 1994; Williams et al. 1990). Essa é uma técnica não radioativa, que pode ser realizada em poucas horas e que requer uma pequena quantidade de DNA (15-25 ng). Mesmo com baixa reprodutibilidade, eles são utilizados ainda hoje em estudos de diversidade genética (Kim et al. 2008, Thanh Thi Pham et al. 2022). Esse método não requer uma sonda de DNA, sequer informações prévias sobre o genoma do organismo, pois usa um conjunto de iniciadores de PCR de oito a dez bases de sequência aleatória. Devido ao comprimento curto dos iniciadores aleatórios, eles anelam-se com o molde de DNA em sítios múltiplos que serão detectados pela separação por eletroforese em gel. As mutações que inibem a ligação dos iniciadores (*primers*) ou interferem na sua amplificação podem ser detectadas na ausência de bandas nesses indivíduos (Williams et al. 1990).

Outro tipo de marcadores são os *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados, que combina técnicas utilizadas nos marcadores tipo RFLP e RAPD. O AFLP baseia-se na clivagem do DNA por enzimas de restrição específicas, seguido de ligação de adaptadores oligonucleotídeos

complementares aos sítios dos fragmentos gerados e à amplificação por PCR. A avaliação dos fragmentos de DNA amplificados é feita por meio da presença ou ausência de bandas em gel de poliacrilamida.

A grande reprodutibilidade desses marcadores, que até supera os RAPD (Savelkoul et al. 1999), aliada à rápida geração dos fragmentos e à alta frequência de identificação de polimorfismos, a torna uma ferramenta muito útil para estudos de genética de populações e diversidade (Alexander et al. 2012), bem como em estudos ecológicos e evolutivos. O marcador AFLP traz informação apenas sobre herança dominante. E, por combinar técnicas de enzimas de restrição e PCR, é considerada uma metodologia relativamente cara, pois requer grande trabalho e conhecimento técnico. Apesar disso, outros trabalhos vêm modificando e aprimorando protocolos com o uso dos AFLP (Suazo e Hall 1999), que é considerado a base para o desenvolvimento de outros marcadores, como os microssatélites e o *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP).

Descrita por Meyer et al. (1993), outra técnica bastante utilizada são os marcadores *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR), ou Repetições Internas de Sequências Simples. Estas são sequências de DNA dominantes, tendo aproximadamente 100 a 3 000 pares de bases. A alta reprodutibilidade e a especificidade dos marcadores ISSR decorrem do fato de serem utilizados *primers* mais longos (16-20 pb) para amplificação e aplicação de temperaturas de anelamento mais altas durante a PCR (figura 4.1A).

Por ser um marcador dominante, é possível observar somente a ausência e a presença desses alelos. Por outro lado, uma vantagem da técnica de ISSR é que não é necessário conhecer previamente a sequência-alvo do organismo, podendo assim ser aplicados com facilidade em espécies não modelos. Além disso, os ISSR permitem a análise de múltiplos *loci* na mesma reação (Sharma et al. 1995). O ISSR é notável por não requerer etapas demoradas e caras, sendo uma forma rápida, simples e eficiente de se obter resultados (Pradeep Reddy et al. 2002).

Há também os marcadores SSR (do inglês, *Simple Sequence Repeats*), ou Sequências Simples Repetidas. Estes são caracterizados por elementos repetitivos presentes no DNA formado por sequências de um a cinco nucleotídeos. Os SSR são sequências que podem ser encontradas em regiões gênicas e não gênicas que, frequentemente, sofrem mutações. Possuem alto nível de polimorfismos, sendo adequadas para detecção de variação alélica em determinada população. Também conhecidos como microssatélites, os SSR foram desenvolvidos, inicialmente, em estudos de mapeamento genético em humanos (Litt e Luty 1989, Weber e May 1989).

A genotipagem por SSR envolve o desenho de *primers* para amplificar sequências de SSR a partir de DNA genômico extraído, seguido por amplificação de SSR por reação em cadeia da polimerase e visualização do DNA por eletroforese em gel. Esses marcadores necessitam de baixas quantidades de DNA extraído, são abundantes no genoma e trazem informações de codominância, além de serem altamente reprodutíveis. A grande limitação desses marcadores, por outro lado, é justamente o isolamento e o desenvolvimento de *primers* específicos para cada espécie estudada. No entanto, essa restrição já pode ser contornada com o advento das plataformas de Sequenciamento de Nova Geração ou NGS (do inglês *Next-Generation Sequencing*), que simplificaram o processo de isolamento de microssatélites e facilitaram o desenvolvimento de marcadores (Csencsics et al. 2010).

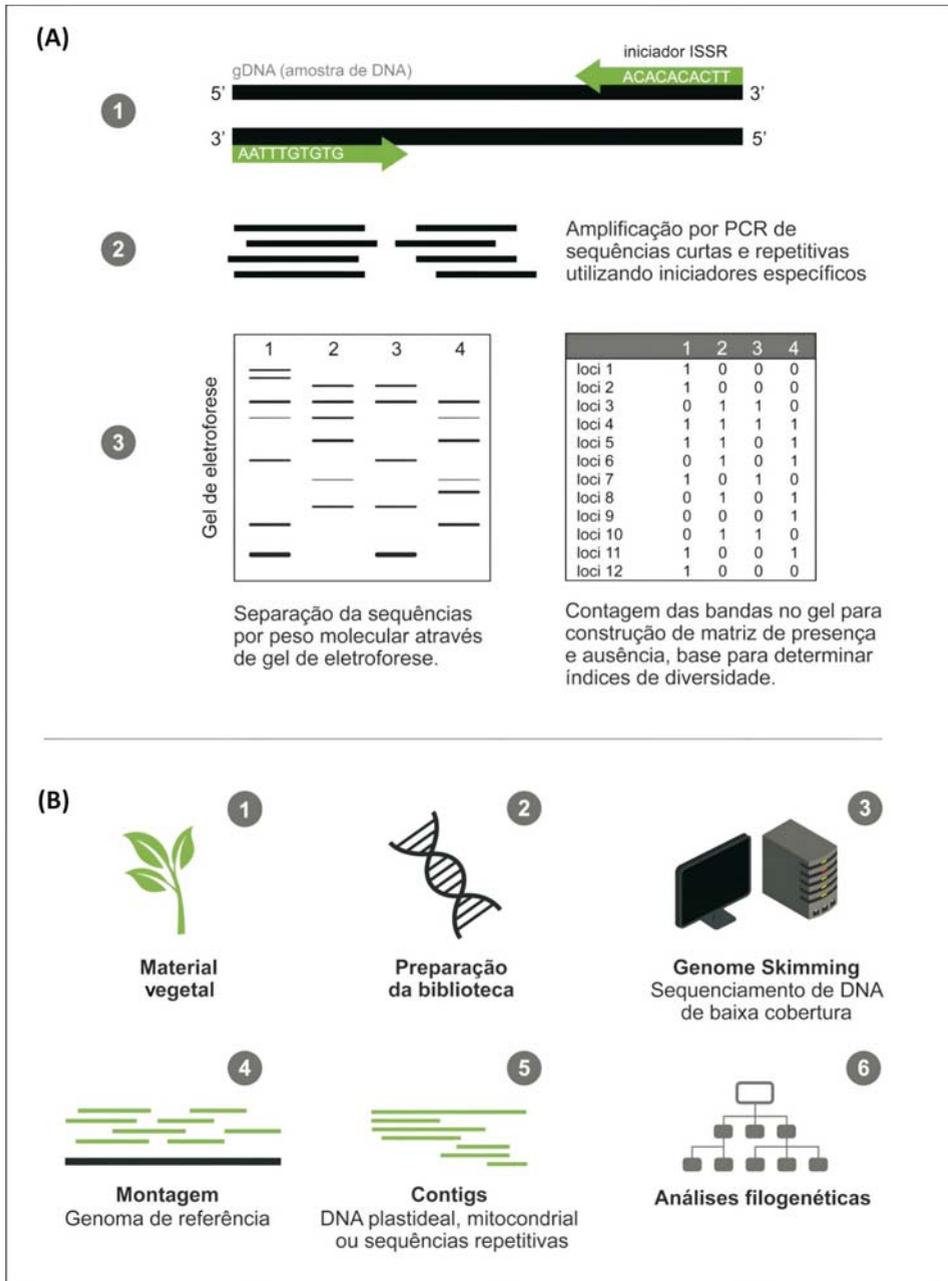


Figura 4.1 (A) Representação da técnica de ISSR. Iniciadores amplificam em regiões repetitivas do DNA genômico. Fragmentos de diferentes tamanhos são revelados por eletroforese. A contagem de bandas dos fragmentos amplificados é utilizada na matriz que será usada para cálculo dos índices de diversidade. (B) Representação da técnica *Genome Skimming*.

### 4.2.3 Técnicas que utilizam sequenciamento de nova geração

Apesar de diversas técnicas de estudos moleculares apoiarem-se na PCR, muitas podem não ser bem-sucedidas em recuperar dados de organismos preservados devido à fragmentação natural do DNA. Além disso, a escassez de dados genômicos e a necessidade de marcadores moleculares e *primers* otimizados dificultam a utilização dos métodos baseados em PCR para organismos não modelos (Ekblom e Galindo 2011). A chegada das plataformas de NGS, por sua vez, transformou o modo de se estudar biodiversidade e abriu novas alternativas e abordagens experimentais (Li et al. 2015). Diversas metodologias baseadas em NGS foram desenvolvidas, sendo capazes de detectar muitos marcadores de DNA, dentro de um curto período e com bom custo-benefício (Zhang et al. 2011).

Os *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) são caracterizados por uma única mudança de base nucleotídica na sequência de DNA de determinado organismo. Uma pequena parte dos SNP ocorre em regiões gênicas, causando mutações associadas a doenças e outros fenótipos. Porém, a maioria das substituições, deleções ou inserções ocorrem em regiões não codificantes do genoma. A principal vantagem dos SNP é o seu elevado potencial para uma análise automatizada de alto rendimento a custo moderado. O avanço nas plataformas NGS contribuiu significativamente para a detecção de um grande número de SNP, aumentando sua adoção como marcadores moleculares.

Um método descrito como RADSeq (do inglês *Restriction Site Associated DNA Sequencing*), ou Sequenciamento de Fragmentos de DNA Associados a Sítios de Restrição, é capaz de identificar milhares de marcadores genéticos, distribuídos ao longo do genoma, utilizando tecnologia *Illumina*. O método combina duas técnicas de biologia molecular associadas ao sequenciamento *Illumina*: o uso de enzimas de restrição para cortar o DNA em fragmentos e o uso de identificadores moleculares para associar sequências a um grupo particular de indivíduos. Caso não haja um genoma disponível, as *tags* geradas por RADseq podem ser analisadas *de novo*, ou seja, a partir de uma coleção de sequências sem o auxílio de uma referência (Willing et al. 2011).

Sequenciamentos de cloroplastos também têm se tornado uma ferramenta importante para estimar relações filogenéticas entre linhagens vegetais. O termo "*Genome Skimming*" foi cunhado recentemente para descrever o sequenciamento de material genético de uma pequena parte do genoma, ou seja, somente as sequências mais representativas, com maior número de cópias, como cloroplasto, mitocôndria e elementos repetitivos (Male et al. 2014). Essa técnica, também conhecida como sequenciamento de genoma

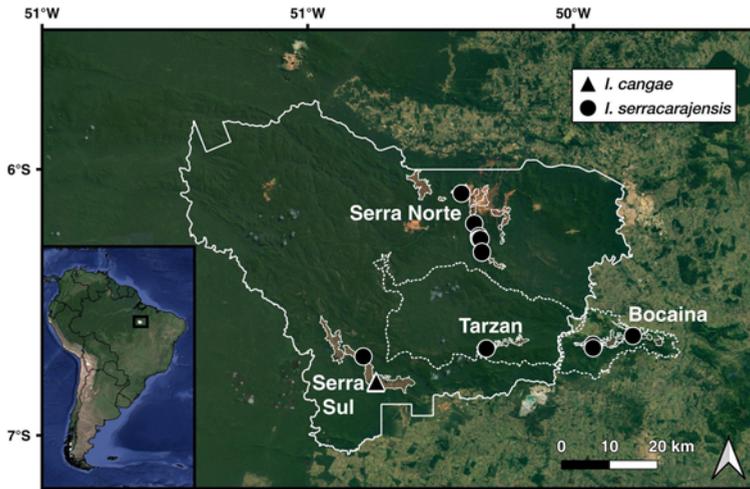
com baixa cobertura, permite a obtenção de sequências de DNA para análises filogenéticas e a identificação de divergências evolutivas (figura 4.1B). Os avanços metodológicos observados nos últimos anos com a diminuição dos custos de sequenciamento antevêm uma nova era em que cada planta poderá ter o seu DNA sequenciado e analisado em campo, diretamente ligando o genótipo de cada indivíduo com suas características fenotípicas.

A diversidade genética de espécies desempenha um papel importante na conservação. Técnicas clássicas ou modernas auxiliam no monitoramento e na inferência filogenética de gêneros pouco estudados e sua distribuição em áreas ao redor do mundo. Diversas técnicas expostas acima vêm sendo aplicadas no estudo da diversidade de várias espécies do gênero *Isoëtes*. Entre elas estão os marcadores ISSR, que são muito utilizados pela sua capacidade de detectar grande número de fragmentos polimórficos (Mengxue et al. 2018, Santos et al. 2020). A espécie *Isoëtes sinensis*, endêmica do leste da Ásia, por exemplo, tem sido estudada por meio de uma variedade de marcadores genéticos como aloenzimas, RAPD, ISSR, AFLP e SSR (Chen et al. 2009, Chen et al. 2004, Chen et al. 2007, Kang et al. 2005, Li et al. 2012). A seguir serão apresentados os estudos de genética aplicados à conservação de duas espécies do gênero *Isoëtes* encontradas no norte do Brasil.

### 4.3 Avanços nos Estudos de Genética da Conservação de *I. cangae* e *I. serracarajensis*

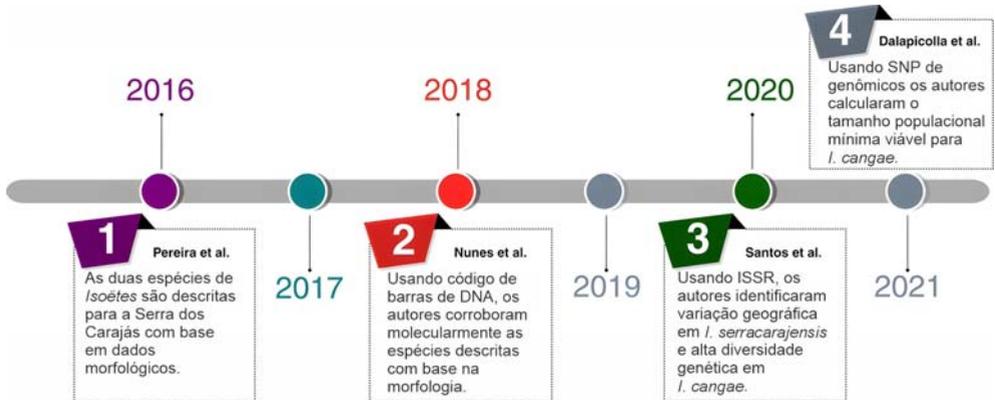
Diante de todo o quadro de ferramentas de avaliação de diversidade disponível, o Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade da Universidade Federal do Rio de Janeiro (NUPEM/UFRJ) e o Instituto Tecnológico Vale para o Desenvolvimento Sustentável (ITVDS), trabalharam em conjunto nos últimos anos para levantar informações genéticas importantes sobre as espécies de *Isoëtes* que ocorrem na Serra dos Carajás: *Isoëtes cangae* e *I. serracarajensis* (Pereira et al. 2016) (figura 4.2). *Isoëtes cangae* é uma planta subaquática restrita ao Lago do Amendoim, um lago permanente no planalto ferruginoso da Serra Sul da Serra dos Carajás, classificada como “criticamente ameaçada” na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (Lansdown 2019). Essa espécie é bissexual com reprodução sexuada, embora não se possa descartar a possibilidade de reprodução assexuada na espécie (Pereira et al. 2016, Caldeira et al. 2019). *Isoëtes serracarajensis* contrasta com seu congênere, pois é encontrada em vários planaltos ferruginosos do sudeste do estado do Pará (figura 4.2) e está

associada a ambientes sazonalmente alagados ou habitats terrestres em solos úmidos. *Isoëtes serracarajensis* também é bissexual, com registro de reprodução assexuada e classificada como espécie vulnerável, segundo Pereira et al. (2016). Veja mais detalhes sobre as espécies nos capítulos 3 e 6.



**Figura 4.2** Distribuição geográfica das duas espécies de *Isoëtes* da Serra dos Carajás, sudoeste do Pará, norte do Brasil. A linha branca contínua indica os limites da Floresta Nacional de Carajás (Flona de Carajás), e a linha tracejada indica os limites do Parque Nacional dos Campos Ferruginosos (PARNA Campos). Os nomes indicam os quatro principais planaltos com registro das espécies de *Isoëtes*: Bocaina, Tarzan, Serra Norte e Serra Sul.

Como as duas espécies de *Isoëtes* foram relacionadas em estudos sobre o grau de ameaça e ocorrem de forma endêmica, há um esforço para criar diferentes estratégias de conservação *in situ* e *ex situ*. Estratégias que congregam tecnologias de colonização assistida e avaliações genéticas que garantam a conservação da diversidade genética adaptativa. Os dados também são importantes para manter o estoque de diversidade genética em estratégias de conservação *ex situ*, como a criação de bancos de germoplasma ativos e bancos de esporos (Caldeira et al. 2019, Santos et al. 2020) (figura 4.3).



**Figura 4.3** Linha do tempo indicando os trabalhos com genética da conservação para as espécies de *Isoëtes* da Serra dos Carajás, sudoeste do Pará, norte do Brasil, desde a descrição das espécies em 2016. Para cada estudo, além dos autores e ano, há uma descrição dos principais resultados alcançados. No texto há mais detalhes dos resultados e da metodologia utilizada em cada estudo.

As primeiras informações genéticas sobre essas espécies foram adquiridas a partir de métodos de código de barras de DNA (*DNA barcoding*) de genes nucleares (ITS2) e pelo sequenciamento completo do cloroplasto (figura 4.3; Nunes et al. 2018). Nunes e colaboradores identificaram marcadores moleculares eficientes para a diagnose de *Isoëtes* da Serra dos Carajás, pois essas espécies são morfologicamente muito semelhantes entre si. Os códigos de barras de DNA derivados de cloroplastos não trouxeram muitas informações, mas os códigos de barras oriundos do ITS2 delimitaram as duas espécies de *Isoëtes*.

Além de corroborar os estudos anteriores de taxonomia, Nunes e colaboradores também forneceram informações moleculares para os futuros trabalhos de genética de conservação para as espécies de *Isoëtes*. Um ponto interessante do estudo de Nunes et al. (2018) é que os códigos de barras de DNA foram ineficientes para recuperar a estruturação geográfica em *I. serracarajensis*, a espécie de *Isoëtes* que ocorre em várias localidades ao longo da Serra dos Carajás. Nessa altura, não era possível determinar se a falta de variação geográfica entre as populações seria devido ao tipo de marcador genético utilizado ou a uma falta natural de estruturação. Essas informações são cruciais para determinar as unidades de manejo em projetos de conservação (Frankham et al. 2017).

Dessa forma, novos estudos com genética de populações foram executados, usando dessa vez outros marcadores genéticos. Santos et al. (2020) avaliaram a diversidade genética nas duas espécies de *Isoëtes*, aplicando 16 marcadores de ISSR, um marcador genético dominante de natureza multialélica, que possui alta reprodutibilidade e grande cobertura genômica (figura 4.3). O ISSR consegue produzir muitos fragmentos polimórficos e, portanto, constitui um marcador adequado para estimar a estrutura genética, a sua variação geográfica e a diversidade genética intra e interpopulacional de *Isoëtes* (Chen et al. 2005, Gentili et al. 2010). Os resultados desse estudo revelaram um alto fluxo gênico e uma alta diversidade genética intrapopulacional para *I. cangae*. Os autores indicaram a prevalência da reprodução sexuada para explicar a alta diversidade genética encontrada em *I. cangae*. Além disso, a presença de indivíduos longevos e a sobreposição de gerações observadas na população do Lago do Amendoim também poderiam ser fatores que contribuem para a diversidade genética dessa espécie.

Já as populações de *I. serracarajensis*, em que não há reprodução sexuada, apresentaram menores índices de diversidade genética e de fluxo gênico quando comparados com *I. cangae*, mas que ainda assim são considerados altos quando comparados a outras espécies de *Isoëtes* (Santos et al. 2020, Caldeira et al. 2021). Santos e colaboradores encontraram muita diferenciação genética entre populações de diferentes cangas, indicando que o isolamento geográfico, o baixo fluxo gênico e a reprodução assexuada da espécie *I. serracarajensis* poderiam estar relacionados à alta divergência entre as populações. Essa variação genética na espécie não havia sido identificada com os dados anteriores de código de barras de DNA (Nunes et al. 2018).

Outros parâmetros essenciais para delinear futuras ações de conservação também são derivados dos estudos genéticos, como o tamanho efetivo da população e o número mínimo viável ou a população mínima viável (Hoban et al. 2020). Essas informações não puderam ser acessadas com os marcadores moleculares usados por Nunes et al. e Santos et al., pois para seus cálculos, o ideal seria usar milhares de SNP (polimorfismo de nucleotídeo único), estimativas demográficas mais precisas (Morin et al. 2009, Helyar et al. 2011, Torkamaneh et al. 2018). Esses SNP poderiam ser oriundos de sequenciamento de nova geração, tecnologia que nunca havia sido aplicada a estudos de genética de populações de *Isoëtes*, a maioria dos trabalhos anteriores com essa tecnologia foram restritos a estudos filogenéticos (Wood et al. 2020), filogeográficos (Wood et al. 2018) ou adaptação local (Yang e Liu 2016).

Para testar essa nova tecnologia, foi escolhida a espécie mais ameaçada de extinção e que possui a distribuição mais restrita, *I. cangae*, que ocorre apenas no Lago do Amendoim, na Serra Sul. O primeiro passo para identificar os SNP na população de *I. cangae* foi a montagem do esboço do genoma de referência. Com leituras (*reads*) curtas pareadas (*paired-end*) de 150 pares de bases (nucleotídeos), o genoma de um indivíduo de *I. cangae* (ITV2008) foi montado, totalizando 4,3 Gb de leituras emparelhadas (*paired-end reads*). Posteriormente, foram sequenciadas com a técnica de *Genome-Skimming* 55 amostras do Lago do Amendoim, que, mapeadas contra esse genoma de referência, identificaram mais de 30 mil SNP para as análises demográficas e populacionais (figura 4.3; Dalapicolla et al. 2021). Os resultados genômicos demonstraram que *I. cangae* é composta por uma população pan-mítica com diversidade genética moderada. Dalapicolla e colaboradores não encontraram evidências de endogamia em *I. cangae*, como visto em outras espécies de *Isoëtes* (Stelt et al. 2017), apesar de *I. cangae* apresentar uma distribuição restrita sem outras populações para manter o fluxo gênico.

Os dados de genômicos sugerem que os indivíduos de *I. cangae* devem ser tratados como uma unidade demográfica para fins de conservação e manejo. Além disso, as estimativas para o tamanho efetivo da população nas espécies mostraram que, mesmo nos limites inferiores dos intervalos de confiança, o tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ) foi maior do que 500, o que provavelmente permitiria que a espécie resistisse às mudanças ambientais (Jamieson e Allendorf 2012, Hoban et al. 2020). As estimativas de população mínima viável geradas a partir dos dados de genoma podem ser interpretadas como o número mínimo de indivíduos que precisam ser resgatados para uma estratégia de conservação *ex situ*, a fim de manter a diversidade genética atual nas gerações futuras de *I. cangae*. Essas estimativas são dependentes de dados de censo populacional, que indicaram que 2 195 indivíduos deveriam ser resgatados/preservados/mantidos em um cenário mais conservador. Esse resultado de número mínimo de indivíduos analisado para estratégias de manejo e conservação, devem ser vistos com cautela, pois essa estimativa não leva em consideração outros parâmetros populacionais, como tempo de geração, taxa de recrutamento de espécies, adaptação local, entre outros (Frankham et al. 2014). Mesmo considerando as ressalvas, essa estimativa de população mínima viável é um bom ponto de partida para uma estratégia viável de conservação *ex situ* visando uma população mínima que não sofrerá com endogamia nos curto e médio prazos (Allendorf et al. 2010, Jamieson e Allendorf 2012).

Os resultados de genética da conservação resumidos acima ao longo dos últimos anos forneceram dados para ações práticas nos programas de manejo de *Isoëtes*, como:

- i) o número de populações e as unidades de manejo;
- ii) o número mínimo de indivíduos para uma abordagem de conservação *ex situ*;
- iii) a seleção de indivíduos para estudos de propagação ao longo do Lago do Amendoim para *I. cangae* e ao longo da variação geográfica de *I. serracarajensis*.

As análises demográficas, de diversidade genética e de estrutura populacional dentro da genética da conservação funcionam hoje como uma ferramenta útil no monitoramento e na avaliação de populações ameaçadas. Com base nessas ferramentas, os pesquisadores de diferentes instituições estão fornecendo dados importantes para a conservação das espécies ameaçadas de *Isoëtes* da Serra dos Carajás.

## Referências

- Adhikari, S. et al. 2017. Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. – *Nucleus* 60: 283-297.
- Alexander, L. M. et al. 2012. Mapping and Quantitative Trait Loci Analysis of Drought Tolerance in a Spring Wheat Population Using Amplified Fragment Length Polymorphism and Diversity Array Technology Markers. – *Crop Sci* 52: 253-261.
- Allendorf, F. W. et al. 2010. Genomics and the future of conservation genetics. – *Nat Rev Genet* 11: 697-709.
- Botstein, D. et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. – *Am J Hum Genet* 32: 314-331.
- Brigham, C. A. 2003. *Population Viability in Plants: Conservation, Management, and Modeling of Rare Plants*. – Springer Science & Business Media.
- Caldeira, C. F. et al. 2019. Sporeling regeneration and *ex situ* growth of *Isoëtes cangae* (Isoetaceae): Initial steps towards the conservation of a rare Amazonian quillwort. – *Aquat Bot* 152: 51-58.

- Caldeira, C. F. et al. 2021. Distinct Reproductive Strategy of Two Endemic Amazonian Quillworts. – *Diversity* 13: 348.
- Capy, P. 1998. Evolution and Impact of Transposable Elements. – Springer Science & Business Media.
- Ceballos, G. e Ehrlich, P. R. 2018. The misunderstood sixth mass extinction. – *Science* 360: 1080-1081.
- Ceballos, G. et al. 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. – *Sci Adv* 1: e1400253.
- Chen, J.-M. et al. 2004. RAPD analysis for genetic diversity of *Isoëtes sinensis*. – *Biodivers Sci* 12: 348.
- Chen, J.-M. et al. 2005. Genetic variation within the endangered quillwort *Isoëtes hypsophila* (Isoetaceae) in China as evidenced by ISSR analysis. – *Aquat Bot* 82: 89-98.
- Chen, J. et al. 2007. Genetic diversity in *Isoëtes yunguiensis*, a rare and endangered endemic fern in China. – *Front. Biol. China* 2: 46-49.
- Collard, B. C. Y. et al. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. – *Euphytica* 142: 169-196.
- Csencsics, D. et al. 2010. Cost-Effective, Species-Specific Microsatellite Development for the Endangered Dwarf Bulrush (*Typha minima*) Using Next-Generation Sequencing Technology. – *J Hered* 101: 789-793.
- Dalapicolla, J. et al. 2021. Conservation implications of genetic structure in the narrowest endemic quillwort from the Eastern Amazon. – *Ecol Evol* 11: 10119-10132.
- De Vicente, M. C. et al. 2004. Genetic diversity analysis with molecular marker data: learning module. – International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) in press.
- Devecchi, M. F. et al. 2020. Beyond forests in the Amazon: biogeography and floristic relationships of the Amazonian savannas. – *Bot J Linn Soc* 193: 478-503.
- Ekblom, R. e Galindo, J. 2011. Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. – *Heredity* 107: 1-15.
- Foden, W. B. et al. 2019. Climate change vulnerability assessment of species. – *Wiley Interdiscip Rev Clim Change* 10: e551.

Frankham, R. et al. 2002. Introduction to Conservation Genetics. – Cambridge University Press.

Frankham, R. et al. 2014. Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. – Biol Conserv 170: 56-63.

Frankham, R. et al. 2017. Genetic Management of Fragmented Animal and Plant Populations. – Oxford University Press.

Franklin, I. R. 1980. Evolutionary change in small populations. – In: Soule, M. E. and Wilcox, B. A. (eds), Conservation Biology – An evolutionary-ecological perspective. Sinauer Associates, U.S.A., pp. 135-149.

Gentili, R. et al. 2010. Population structure and genetic diversity of the threatened quillwort *Isoëtes malinverniana* and implication for conservation. – Aquat Bot 93: 147-152.

Giulietti, A. M. et al. 2019. Edaphic endemism in the Amazon: vascular plants of the canga of Carajás, Brazil. – Bot Rev 85: 357-383.

Green, M. R. e Sambrook, J. 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hartl, D. L. e Clark, A. G. 1997. Principles of population genetics. – Sinauer associates.

Hedrick, P. W. 2001. Conservation genetics: where are we now? – Trends Ecol Evol 16: 629-636.

Helyar, S. J. et al. 2011. Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. – Mol Ecol Resour 11: 123-136.

Ho, W.-C. e Zhang, J. 2018. Evolutionary adaptations to new environments generally reverse plastic phenotypic changes. – Nat Commun 9: 350.

Hoban, S. et al. 2020. Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity Framework must be improved. – Biol Conserv 248: 108654.

Hoffmann, A. A. et al. 2017. Revisiting Adaptive Potential, Population Size, and Conservation. – Trends Ecol Evol 32: 506-517.

Hunter, M. E. et al. 2018. Next-generation conservation genetics and biodiversity monitoring. – Evol Appl 11: 1029-1034.

- Isagi, Y. et al. 2020. Significant loss of genetic diversity and accumulation of deleterious genetic variation in a critically endangered azalea species, *Rhododendron boninense*, growing on the Bonin Islands. – *Plant Species Biol* 35: 166-174.
- Jacobi, C. M. et al. 2007. Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. – *Biodivers Conserv* 16: 2185-2200.
- Jamieson, I. G. e Allendorf, F. W. 2012. How does the 50/500 rule apply to MVPs? – *Trends Ecol Evol* 27: 578-584.
- Kang, M. et al. 2005. Genetic Consequence of Restricted Habitat and Population Decline in Endangered *Isoëtes sinensis* (Isoetaceae). – *Ann Bot* 96: 1265-1274.
- Karp, A. et al. 2012. Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals. – Springer Science & Business Media.
- Kim, C. et al. 2008. Genetic diversity and population structure of endangered *Isoëtes coreana* in South Korea based on RAPD analysis. – *Aquat Bot* 89: 43-49.
- Kimura, M. e Ohta, T. 1969. The Average Number of Generations until Fixation of a Mutant Gene in a Finite Population. – *Genetics* 61: 763-771.
- Kingsolver, J. G. e Buckley, L. B. 2017. Evolution of plasticity and adaptive responses to climate change along climate gradients. – *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 284: 20170386.
- Kokoska, R. J. et al. 1998. Destabilization of Yeast Micro- and Minisatellite DNA Sequences by Mutations Affecting a Nuclease Involved in Okazaki Fragment Processing (*rad27*) and DNA Polymerase  $\delta$  (*pol3-t*). – *Mol Cell Biol* 18: 2779-2788.
- Koskela, J. et al. 2013. Translating conservation genetics into management: Pan-European minimum requirements for dynamic conservation units of forest tree genetic diversity. – *Biol Conserv* 157: 39-49.
- Kumar, L. S. 1999. DNA markers in plant improvement: an overview. – *Biotechnol Adv* 17: 143-182.
- Lansdown, R. V. 2019. *Isoëtes cangae*. – The IUCN Red List of Threatened Species 2019 10: e.T136249847A136250011.
- Leigh, D. M. et al. 2019. Estimated six per cent loss of genetic variation in wild populations since the industrial revolution. – *Evol Appl* 12: 1505-1512.

- Li, Z. et al. 2012. Microsatellite primers in the endangered quillwort *Isoëtes hypsophila* (Isoetaceae) and cross-amplification in *I. sinensis*. – *Am J Bot* 99: e184-e186.
- Litt, M. e Luty, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. – *Am J Hum Genet* 44: 397-401.
- Ma, M. et al. 2019. Outcrossing Rates and Gene Flow in Natural Population of the Endangered Endemic Aquatic Lycophyte *Isoëtes yunguiensis* as Revealed by ISSR Markers. – *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca* 47: 339-346.
- Malé, P.-J. G. et al. 2014. Genome skimming by shotgun sequencing helps resolve the phylogeny of a pantropical tree family. – *Mol Ecol Resour* 14: 966-975.
- Markert, J. A. et al. 2010. Population genetic diversity and fitness in multiple environments. – *BMC Evol Biol* 10: 205.
- Matthies, D. et al. 2004. Population size and the risk of local extinction: empirical evidence from rare plants. – *Oikos* 105: 481-488.
- Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. – Harvard University Press.
- Menges, E. S. 2000. Population viability analyses in plants: challenges and opportunities. – *Trends Ecol Evol* 15: 51-56.
- Menges, E. S. 2008. Restoration demography and genetics of plants: when is a translocation successful? – *Aust J Bot* 56: 187-196.
- Meyer, W. et al. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. – *J Clin Microbiol* 31: 2274-2280.
- Miraldo, A. et al. 2016. An Anthropocene map of genetic diversity. – *Science* 353: 1532-1535.
- Mitre, S. K. et al. 2018. Nutrient and water dynamics of Amazonian canga vegetation differ among physiognomies and from those of other neotropical ecosystems. – *Plant Ecol* 219: 1341-1353.
- Morin, P. A. et al. 2009. Assessing statistical power of SNPs for population structure and conservation studies. – *Mol Ecol Resour* 9: 66-73.
- Morris, W. F. e Doak, D. F. 2002. *Quantitative Conservation Biology: Theory and Practice of Population Viability Analysis*. – Sinauer Associates.

- Mota, N. de O. et al. 2015. Vegetação sobre sistemas ferruginosos da Serra dos Carajás. – In: Carmo, F. F. e Kamino, L. H. Y. (eds), Geossistemas Ferruginosos no Brasil. Instituto Prístino, pp. 289-315.
- Mota, N. F. de O. et al. 2018. Amazon canga: the unique vegetation of Carajás revealed by the list of seed plants. – *Rodriguésia* 69: 1435-1488.
- Mullis, K. B. 1994. The polymerase chain reaction (KB Mullis, F Ferré, and RA Gibbs, Eds.). – Birkhäuser Boston, MA.
- Nei, M. et al. 1975. The Bottleneck Effect and Genetic Variability in Populations. – *Evolution* 29: 1-10.
- Nunes, G. L. et al. 2018. Quillworts from the Amazon: A multidisciplinary populational study on *Isoëtes serracarajensis* and *Isoëtes cangae*. – *PLoS ONE* 13: e0201417.
- Orozco-Castillo, C. et al. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. – *Theor Appl Genet* 87: 934-940.
- Paillard, M. et al. 1996. Construction of a molecular linkage map in coffee. – *Theor Appl Genet* 93: 41-47.
- Pereira, J. B. D. S. et al. 2016. Two New Species of *Isoëtes* (Isoetaceae) from northern Brazil. – *Phytotaxa* 272: 141-148.
- Pradeep Reddy, M. et al. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. – *Euphytica* 128: 9-17.
- Saiki, R. K. et al. 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. – *Science* 239: 487-491.
- Santos, M. P. et al. 2020. The genetic diversity and population structure of two endemic Amazonian quillwort (*Isoëtes* L.) species. – *PeerJ* 8: e10274.
- Savelkoul, P. H. M. et al. 1999. Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. – *J Clin Microbiol* 37: 3083-3091.
- Schulman, A. H. 2007. Molecular markers to assess genetic diversity. – *Euphytica* 158: 313-321.
- Shaffer, M. L. 1981. Minimum Population Sizes for Species Conservation. – *BioScience* 31: 131-134.

- Sharma, P. C. et al. 1995. The potential of microsatellites for hybridization- and polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and related species. – *Electrophoresis* 16: 1755-1761.
- Solé, M. et al. 2004. Genotypic and Genetic Diversity of the Common Weed *Cirsium arvense* (Asteraceae). – *Int J Plant Sci* 165: 437-444.
- Soulé, M. E. 1985. What Is Conservation Biology? – *BioScience* 35: 727-734.
- Spielman, D. et al. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. – *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15261-15264.
- Thanh Thi Pham, T. et al. 2022. High Genetic Diversity of 16 Indian lettuce (*Lactuca indica* L.) Accessions from Vietnam. – *Pak J Biol Sci* 25: 201-209.
- Torkamaneh, D. et al. 2018. Efficient genome-wide genotyping strategies and data integration in crop plants. – *Theor Appl Genet* 131: 499-511.
- Toro, M. A. e Caballero, A. 2005. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. – *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 1367-1378.
- Vander Stelt, E. et al. 2017. Assessing habitat requirements and genetic status of a rare ephemeral wetland plant species, *Isoëtes butleri* Engelm. – *Aquat Bot* 138: 74-81.
- Vitt, P. et al. 2010. Assisted migration of plants: Changes in latitudes, changes in attitudes. – *Biol Conserv* 143: 18-27.
- Vos, P. et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. – *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.
- Weber, J. L. e May, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. – *Am J Hum Genet* 44: 388-396.
- Weeks, A. R. et al. 2016. Conservation of genetic uniqueness of populations may increase extinction likelihood of endangered species: the case of Australian mammals. – *Front Zool* 13: 31.
- Wehenkel, C. et al. 2011. Genetic diversity in relation to secondary succession of forest tree communities. – *Pol J Ecol* 59: 45-54.
- Welsh, J. e McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. – *Nucleic Acids Res* 18: 7213-7218.

- Williams, J. G. K. et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. – *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.
- Williams, J. G. K. et al. 1993. [51] Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. – In: Wu, R. (ed), *Methods in Enzymology. Recombinant DNA Part I*. Academic Press, pp. 704-740.
- Wood, D. P. et al. 2018. Contrasting phylogeographic structures between freshwater lycopods and angiosperms in the British Isles. – *Bot Lett* 165: 476-486.
- Wood, D. et al. 2020. Phylogenomics indicates the “living fossil” *Isoëtes* diversified in the Cenozoic. – *PLoS ONE* 15: e0227525.
- Yang, T. e Liu, X. 2016. Comparative Transcriptome Analysis of *Isoëtes sinensis* Under Terrestrial and Submerged Conditions. – *Plant Mol Biol Rep* 34: 136-145.
- Yang, J. et al. 2022. The vegetable SNP database: An integrated resource for plant breeders and scientists. – *Genomics* 114: 110348.
- Zhang, J. et al. 2011. The impact of next-generation sequencing on genomics. – *J Genet Genomics* 38: 95-106.



## CAPÍTULO 5

---

---

# Desenvolvimento Ontogenético e Reprodução de *Isoëtes cangae*

\* Naiara Viana Campos \* Mirella Pupo Santos \* Cecílio Frois Caldeira  
\* Laís Barreto Jordão \* Arthur Víncius de Sant'anna Lopes  
\* Silvio Junio Ramos \* Sérgio Luís Cavalheiro Filho  
\* Markus Gastauer \* Lísia Mônica de Souza Gestinari

TÍTULO CURTO (*RUNNING TITLE*)

---

---

Ontogenia e Reprodução de *I. cangae*

## Resumo

*Isoetes cangae* é uma licófito aquática heterosporada endêmica da Serra dos Carajás. O ciclo de vida, as formas de reprodução e o desenvolvimento do esporófito (plântula) de *I. cangae* foram investigados por meio de experimentos conduzidos em laboratório. Os esporos femininos (megásporos) e masculinos (micrósporos) são produzidos dentro de estruturas presentes na base das folhas, os esporângios. Quando maduros, eles são liberados e germinam, formando os gametófitos. O gametófito feminino apresenta uma abertura de germinação que permite a entrada do gameta masculino (anterozoide), móvel, o qual perpassa pelas células do canal que conduz até o gameta feminino (oosfera). Após a fecundação, o embrião desenvolve-se em um esporófito jovem, que inicialmente apresenta apenas uma folha e uma raiz, e permanece por um tempo ligado aos tecidos do gametófito feminino. Com o desenvolvimento de novas folhas e raízes, o esporófito é capaz de aderir ao substrato e potencializar o seu desenvolvimento. Folhas mais largas e compridas são produzidas, assumindo uma disposição espiralada. Entre 6-9 meses de idade, observa-se a presença de folhas contendo esporângios, indicando que as plantas atingiram a idade adulta. Megásporos maduros, quando cultivados *in vitro*, são capazes de germinar, mas imaturos não. A taxa de germinação dos megásporos e geração de esporófitos é bastante variável podendo chegar a 90 %. Os megásporos dependem da presença do micrósporo para gerar um novo indivíduo, uma vez que não se observa a ocorrência de apomixia. A reprodução em *I. cangae* é majoritariamente sexuada, não sendo constatada a formação de gemas ou brotamento, e pode se dar por meio da autofecundação (entre esporos de um mesmo indivíduo) ou por fecundação cruzada (entre diferentes indivíduos). A maturação dos esporângios femininos e masculinos em diferentes momentos temporais sugere um mecanismo que favorece a reprodução cruzada e, dessa forma, uma maior diversidade genética.

**Palavras-chave:** licófito; propagação; megásporo; micrósporo; ciclo de vida.

## 5.1 Ciclo de Vida e Morfologia Externa

As licófitas são plantas vasculares caracterizadas pela dispersão por esporos e por possuírem ciclo de vida com duas gerações: uma fase esporofítica longa e uma fase gametofítica efêmera. Os esporófitos, como são chamados os organismos na fase esporofítica, são diploides ( $2N$ ) e são constituídos por um caule subterrâneo, folhas e raízes. Os gametófitos, da fase gametofítica, são haploides ( $N$ ) e apresentam tamanho reduzido (figura 5.1).

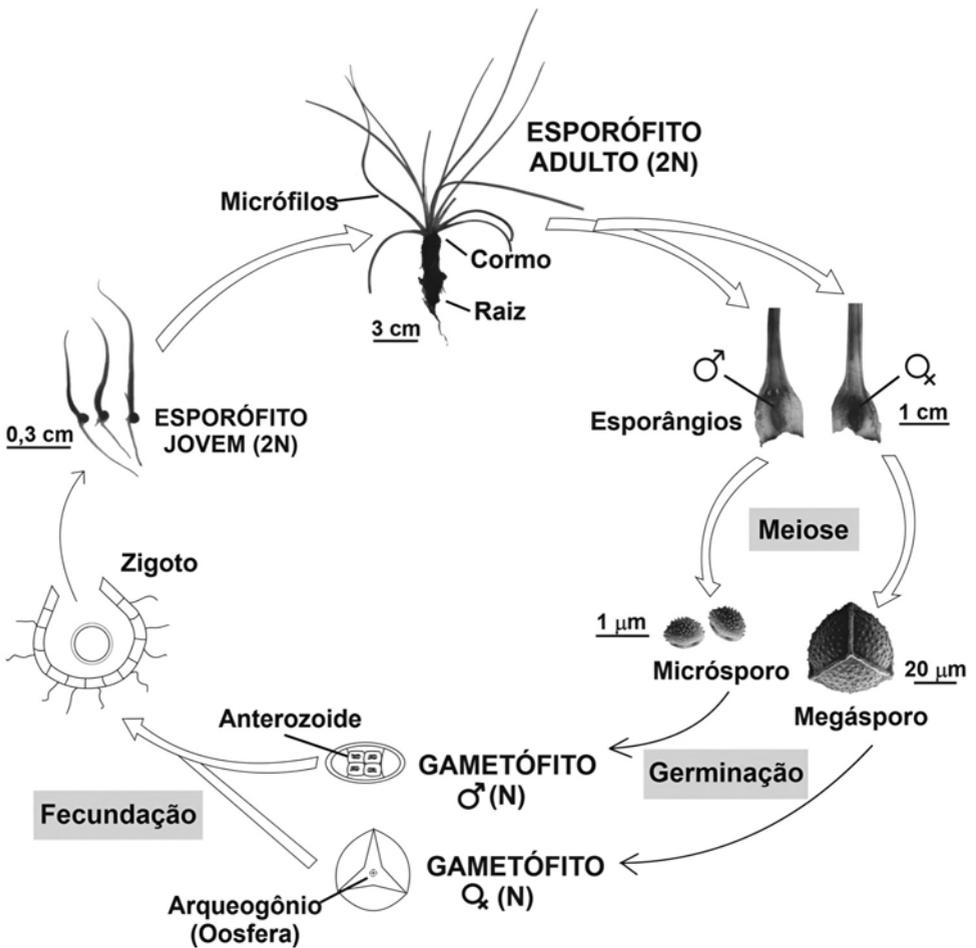


Figura 5.1 Representação esquemática do ciclo de vida de *Isoëtes sp.* (Isoetaceae).

O esporófito apresenta um caule encurtado, denominado cormo, de formato globoso com dois ou três lobos (Kott e Britton 1983). Na porção superior do cormo, as folhas emergem perfazendo um arranjo helicoidal e, na porção inferior, as raízes. As raízes são geradas em sulcos verticais localizados entre os lobos do cormo e apresentam ramificação dicotômica (Kott e Britton 1983, Garrett e Kantvilas 1992). As folhas possuem formato cilíndrico ou semicilíndrico e são classificadas como micrófilos, uma vez que apresentam apenas um feixe vascular.

Na nossa espécie focal, *Isoëtes cangae*, as folhas são eretas a levemente recurvadas, e apresentam coloração verde-clara, com exceção da base foliar, que é vermelha-amarronzada em função do substrato rico em ferro (Pereira et al. 2016, Cavalheiro-Filho et al. 2021). Cada folha apresenta quatro lacunas aeríferas, as quais são subdivididas por septos transversais visíveis a olho nu (Cavalheiro-Filho et al. 2021). Em indivíduos adultos, as folhas podem atingir cerca de 40 cm de altura e 1,6 mm de largura.

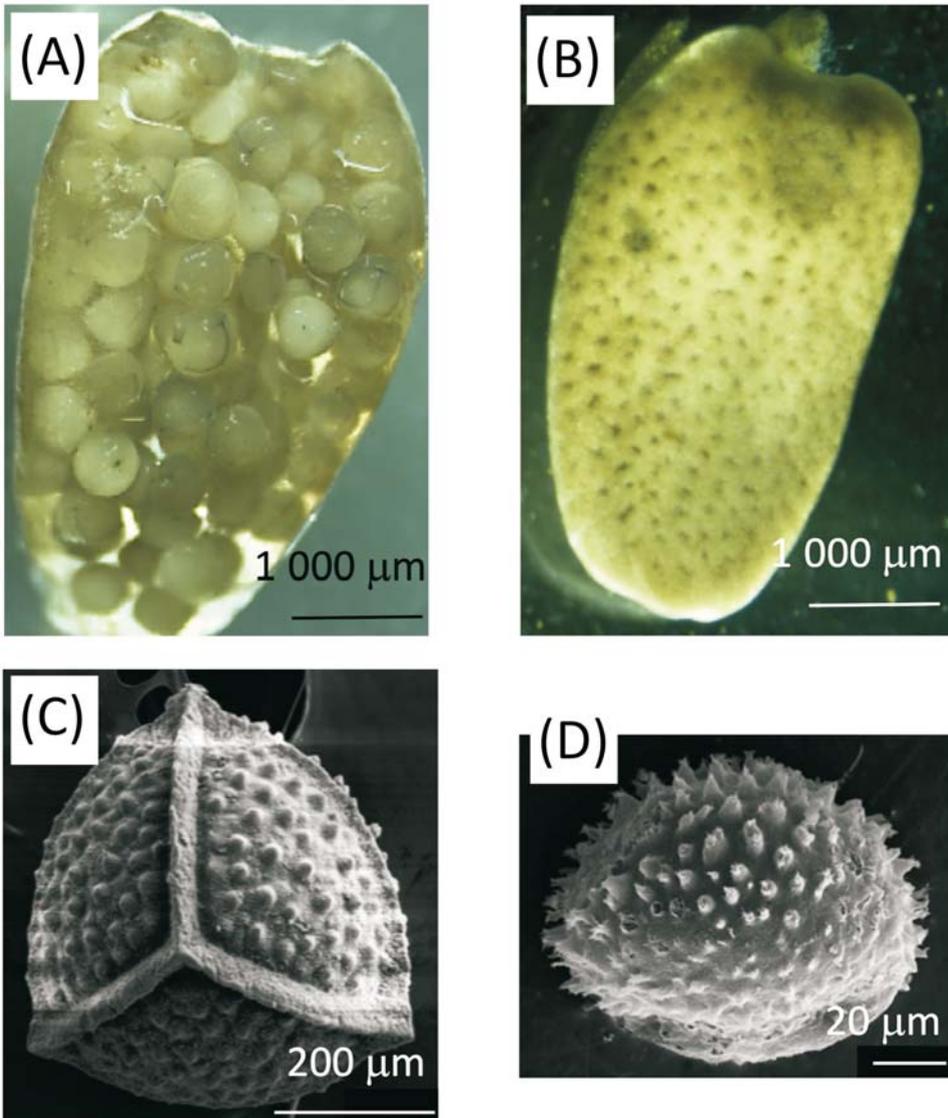
## 5.2 O Esporófito Produz Esporos Femininos e Masculinos

As espécies de *Isoëtes* são heterosporadas, de modo que na base de cada folha desenvolve-se um esporângio que pode ser masculino (microsporângio) ou feminino (megasporângio). A folha fértil também é denominada esporófilo (microsporófilo e megasporófilo, respectivamente). Os esporângios podem ser parcial ou completamente cobertos por uma fina membrana chamada velo (Garrett e Kantvilas 1992). Em *Isoëtes cangae*, o velo cobre 20-25 % da superfície do esporângio (Cavalheiro-Filho et al. 2021). Os esporângios variam quanto ao tamanho e à quantidade de esporos produzidos, conforme a idade e a saúde da planta. Plantas de *I. cangae* produzem em média 126 megásporos ou 318 mil micrósporos por esporângio (Caldeira et al. 2019). Esporângios mistos, contendo megásporos e micrósporos, podem ser encontrados na espécie (Campos et al. 2021b).

Os esporos são produzidos como resultado das divisões meióticas das células-mãe presentes nos esporângios e, portanto, são haploides (N). Os esporos femininos (megásporos), que podem variar de 200 a 750  $\mu\text{m}$  de diâmetro entre as espécies de *Isoëtes*, possuem formato globoso e apresentam perisporo ornamentado (parede externa constituída por esporopolenina e sílica). Os megásporos apresentam três sulcos proximais proeminentes radialmente simétricos, que compreendem as aberturas de germinação e marcam o ponto de separação dos outros três esporos da tétrade produzida ao

fim da meiose, sendo assim denominados triletes (Blackmore et al. 2012). Já os esporos masculinos (micrósporos) possuem entre 10 e 30  $\mu\text{m}$  de comprimento, apresentam simetria bilateral e apenas uma abertura de germinação, sendo considerados monoletes. Os megásporos e os micrósporos de *Isoëtes cangae* apresentam cerca de 500  $\mu\text{m}$  e 30  $\mu\text{m}$  de diâmetro, respectivamente, sendo a ornamentação do megásporo do tipo verrucosa a tuberculada, e a do micrósporo, equinada (figura 5.2) (Pereira et al. 2016).

Os esporos podem germinar tão logo sejam liberados dos esporângios. Na maioria das espécies de *Isoëtes*, as folhas entram em senescência logo após o término da estação de crescimento (Gifford e Foster 1989). Na Região Amazônica, local de ocorrência de *Isoëtes cangae*, o clima é quente o ano inteiro, e as estações são mais bem definidas pelas mudanças na pluviosidade. O período seco, que ocorre de junho a outubro na região (Silva et al. 2018), representa um marco para a senescência foliar que é evidenciada pela redução do número de folhas, especialmente de esporófilos maduros (Campos et al. 2021a). Os tecidos da folha amolecem e rompem-se, restando apenas o esporângio aderido ao corno. O esporângio maduro é facilmente rompido em função do amolecimento da sua parede. Em plantas adultas de *Isoëtes cangae*, é muito comum observar megásporos aderidos às raízes.

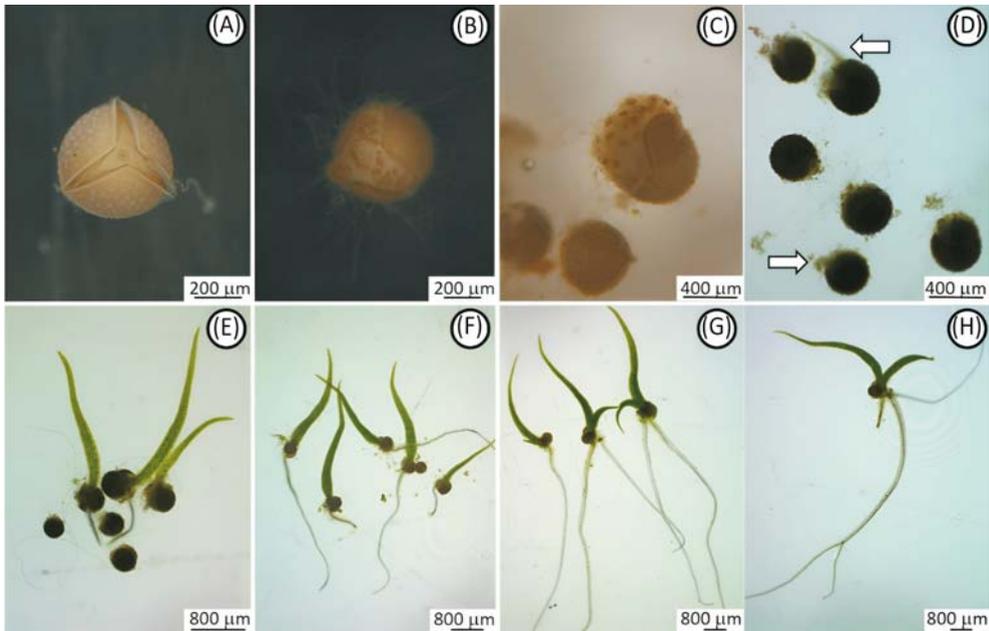


**Figura 5.2** Estruturas reprodutivas de *Isoëtes cangae*. Micrografias de (A) megasporângio e (B) microsporângio obtidas com microscópio ótico; micrografias de (C) megásporo e (D) micrósporo obtidas com o uso de microscopia eletrônica de varredura.

### 5.3 Os Esporos Germinam e Dão Origem aos Gametófitos

Ao germinar, os megásporos dão origem ao gametófito feminino (megagametófito), enquanto os micrósporos originam o gametófito masculino (microgametófito). Ambos os gametófitos apresentam desenvolvimento endospórico, isto é, que ocorre no interior dos esporos. O microgametófito fica totalmente retido dentro da parede do esporo e, após completar seu desenvolvimento, a parede é rompida e são liberados quatro anterozoides multiflagelados (Gifford e Foster 1989). O desenvolvimento do megagametófito ocorre por meio da divisão nuclear, da celularização e do acúmulo de substâncias de reserva. Com o crescimento e o aumento do volume do megagametófito, a parede rompe-se, ocasionando a protrusão dos tecidos gametofíticos. O rompimento da parede forma uma janela que expõe centralmente um arquegônio, que é uma estrutura multicelular que abriga a oosfera – gameta feminino (figura 5.3A-B). Caso a fecundação não ocorra seguidamente, o gametófito continua a desenvolver-se, e muitos outros arquegônios podem ser formados ao longo da superfície do gametófito (figura 5.3C). Cada arquegônio é constituído por quatro fileiras de células que delimitam um canal central, e, ao final desse canal, encontra-se a oosfera.

A fecundação ocorre quando o anterozoide encontra a oosfera. Após a fecundação, o zigoto passa por diversas divisões mitóticas, dando origem a um embrião globoso. A parte de cima do embrião dá origem ao pé e à raiz, enquanto a parte inferior produz o ápice caulinar e a primeira folha (Gifford e Foster 1989). Não ocorre formação de suspensor. O pé cresce em direção ao tecido de reserva, na região basal do gametófito. A primeira folha e a primeira raiz crescem, ambas, perpendicularmente ao maior eixo do arquegônio, porém, em direções opostas. Enquanto a primeira folha continua o seu processo de alongamento e diferenciação, assim como a raiz que cresce em direção ao solo, um novo par de folha e raiz é formado. O esporófito jovem ainda permanece por um tempo ligado aos tecidos gametofíticos, mas já é capaz de aderir ao substrato por meio das novas raízes geradas (Gifford e Foster 1989).



**Figura 5.3** Germinação do megásporo (A-C) e desenvolvimento inicial do esporófito de *Isoëtes cangae* (Isoetaceae) (D-H). (A) Abertura do megásporo na marca do trilete, expondo um arqueogônio central. (B) Emissão de rizoides a partir do tecido gametofítico e presença de arqueogônios nos três polos da abertura. (C) Formação de inúmeros arqueogônios na superfície do megagametófito não fecundado. (D) Emissão da primeira folha (seta branca) após dois dias de abertura do megásporo. (E-H) Esporófitos com uma, duas, cinco e oito semanas de desenvolvimento após fecundação, respectivamente.

## 5.4 Desenvolvimento do Esporófito

O estudo da germinação e do desenvolvimento inicial do esporófito de *Isoëtes cangae* foi realizado por meio de ensaios conduzidos em laboratório (Caldeira et al. 2021). Megásporos e micrósporos foram obtidos a partir de plantas provenientes do Lago do Amendoim. Megásporos ( $n = 300$ ) coletados na estação chuvosa, entre novembro e maio (Silva et al. 2018), apresentaram maior grau de maturidade e foram capazes de germinar após 12-20 dias de exposição a condições favoráveis. Após  $20 (\pm 5)$  dias da união dos megásporos e micrósporos nos tubos experimentais, foi observada a emissão da primeira folha e da primeira raiz. Já aqueles coletados na estação seca germinaram tardiamente, com cerca de dois meses de diferença. Em ambos os casos, os percentuais de geração de esporófitos, a partir dos megásporos germinados, foi

acima de 95 %. Inúmeros rizoides são observados antes e após a fecundação da oosfera e desaparecem após cerca de 30 dias. Em *Isoëtes lithophila*, os rizoides são formados após a fecundação e auxiliam na adesão ao solo (La Motte 1933). Em *Isoëtes cangae*, foi observado que os rizoides apresentam papel adicional de adesão de micrósporos, bem como de outros megásporos, o que pode favorecer a fecundação e a formação de grupos de esporófitos.

Em estudo conduzido por Campos et al. (dados não publicados), megásporos e micrósporos obtidos de plantas cultivadas em casa de vegetação (cultivo *ex situ*) foram incubados conjuntamente, e o desenvolvimento dos esporófitos foi acompanhado durante oito semanas após a germinação (figura 5.3). Foi observado que os megásporos germinaram de forma assíncrona após cinco, seis semanas de incubação. O primeiro sinal externo do desenvolvimento do embrião é a emissão do primórdio foliar. Inicialmente vê-se apenas uma emergência de coloração clara, e com cerca de um a três dias já é possível observar o primórdio clorofilado (figura 5.3D). A primeira raiz surge após sete a nove dias (figura 5.3E-F). A segunda folha e a raiz geralmente são emitidas simultaneamente após 23-25 dias (figura 5.3G). Entretanto, observou-se que em alguns indivíduos foi emitida individualmente a folha ou raiz, e o outro elemento desenvolveu-se posteriormente. A partir da oitava semana, foi observado o início da emissão da terceira folha e da raiz (figura 5.3H). Esporófitos com dois meses de idade apresentam em média  $0,6 \pm 0,1$  e  $0,9 \pm 0,3$  cm de comprimento foliar e radicular, respectivamente. De acordo com Caldeira et al. (2019), durante os primeiros dias de emissão, as folhas e as raízes apresentam um rápido alongamento, o qual ocorre de forma mais lenta nas semanas seguintes.

Durante a fase inicial de desenvolvimento do esporófito, as folhas jovens são produzidas alternativamente em cada lado do eixo apical embrionário; o meristema apical caulinar é pouco desenvolvido e forma traços vasculares que direcionam para as folhas e as raízes (Paollilo 1963). Com a expansão desse meristema, a configuração bilateral é perdida, e os primórdios foliares seguintes são formados em espiral, configurando uma simetria radial. Essa mudança de simetria é observada em *Isoëtes cangae* após os primeiros meses de crescimento.

## 5.5 Plantas Cultivadas *In Vitro* São Capazes de Atingir a Maturidade

Esporófitos obtidos em ensaios de laboratório foram transferidos para frascos de 500 mL contendo substrato original do Lago do Amendoim e fo-

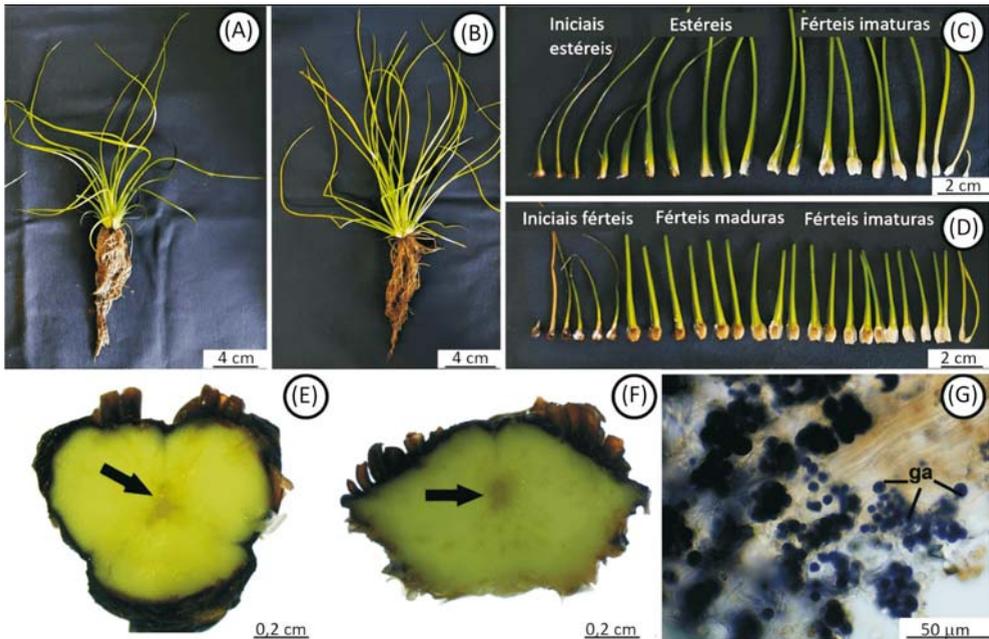
ram acompanhados quanto ao seu desenvolvimento. Foi observado que as novas folhas geradas são bem mais largas e crescem em comprimento conforme a disponibilidade de espaço, de luz e de nutrientes. As raízes tornam-se mais robustas e ramificam-se. Com seis meses de idade, os esporófitos apresentam em média  $11 \pm 2$  folhas,  $8 \pm 2$  cm de comprimento foliar e  $3 \pm 1$  cm de comprimento radicular.

Plantas com seis meses de idade foram transferidas, em seguida, para aquários contendo sedimento do Lago do Amendoim e substrato comercial Jiffy® (1:2). Após nove meses de idade, os esporófitos apresentam cerca de  $21 \pm 2$  cm de comprimento foliar e  $10 \pm 2$  cm de comprimento radicular (figura 5.4A). Plantas com nove e doze meses apresentam em média  $25 \pm 5$  e  $35 \pm 5$  folhas, respectivamente (figura 5.4A-B). Diferentes morfotipos foliares são encontrados: as folhas mais externas que são estreitas e relativamente curtas (folhas iniciais); as folhas intermediárias que são mais desenvolvidas, porém, estéreis; e os esporófitos que constituem as folhas férteis, geralmente mais compridas (figura 5.4C-D). Com nove e doze meses de idade, as plantas possuem, respectivamente, cerca de  $7 \pm 3$  e  $15 \pm 5$  esporófitos. Em alguns indivíduos com um ano de idade, foram observados esporângios também nas folhas iniciais, os quais são geralmente pequenos e esféricos (figura 5.4D). Esses esporângios são provavelmente formados precocemente em resposta a algum estímulo.

Assim como descrito para outras espécies do gênero, em *I. cangae* os primeiros esporângios a formarem-se são os femininos, os quais se encontram parcialmente maduros, enquanto os masculinos são ligeiramente mais numerosos e imaturos. De acordo com Smith (1900), os megasporângios, em *Isoëtes*, são produzidos no início da temporada de crescimento e, portanto, são encontrados em folhas mais externas em relação aos microsporângios.

O alargamento do meristema apical caulinar tem como consequência também a produção de um núcleo central de tecidos vasculares primários e o crescimento vertical da planta. Entretanto, o eixo caulinar permanece encurtado. O crescimento adicional do cormo ocorre quando o meristema lateral (câmbio vascular) é ativado, e tecidos secundários são formados, ocorrendo o aumento em espessura (Rury 1978). Frequentemente é observado um parênquima de reserva de amido na região subjacente ao tecido de revestimento do órgão. Plantas com nove e doze meses de idade apresentam cormo com aproximadamente  $0,5 \pm 0,1$  a  $0,6 \pm 0,1$  cm de comprimento e  $0,8 \pm 0,1$  a  $0,9 \pm 0,2$  cm de largura, respectivamente. Em corte transversal, o cormo apresenta formato trilobado (figura 5.4E) enquanto, em corte longitudinal, é possível observar que se trata de uma estrutura mais larga do que alta (figura 5.4F).

Cortes a mão livre do corno submetidos ao teste histoquímico com lugol (Johansen 1940) evidenciam a presença de grãos de amido no parênquima cortical (figura 5.4G). A região central é constituída por xilema secundário (figura 5.4E-F). O corno, embora apresente crescimento contínuo, de tempos em tempos passa por um processo de descamação e eliminação das camadas mais externas (Bray et al. 2018).



**Figura 5.4** Esporófitos adultos de *Isoëtes cangae* (Isoetaceae). (A-B) Indivíduos com nove e doze meses de idade, respectivamente. (C) Micrófilos destacados de um indivíduo com nove meses de idade com predomínio de folhas estéreis e esporófilos imaturos. (D) Micrófilos destacados de um indivíduo com doze meses de idade com presença de esporófilos maduros e imaturos (as folhas estéreis foram omitidas). (E-F) Corte transversal e longitudinal, respectivamente, do corno trilobado de um indivíduo com doze meses de idade, evidenciando o córtex e a região central do xilema (seta). (G) Acúmulo de grãos de amido no córtex (ga).

## 5.6 Plantas Coletadas *In Situ* Apresentam Produção Contínua de Esporângios

Adicionalmente às observações feitas em laboratório, foi realizado o acompanhamento fenológico *in situ* de plantas de *Isoëtes cangae* ao longo de dois anos (Campos et al. 2021a). Foram realizadas oito expedições a campo,

sendo amostrados 15 indivíduos em cada campanha. O número de folhas em indivíduos adultos varia em média de  $33 \pm 15$ , na estação seca, a  $42 \pm 15$ , na estação chuvosa. O comprimento foliar é, em média,  $28 \pm 6$  cm, na estação chuvosa, e  $30 \pm 6$  cm, na estação seca. As folhas novas, tênues, emergem do centro da planta e apresentam coloração bem mais clara. A folha totalmente expandida apresenta-se relativamente rígida, com base alargada, ala transparente a verde-claro com comprimento de até  $1/5$  da lâmina foliar (Cavalheiro-Filho et al. 2021). Os esporângios maduros apresentam coloração amarronzada, sendo possível distinguir os femininos dos masculinos pelo relevo da parede adaxial do esporângio. Plantas coletadas na estação chuvosa apresentaram em média  $54 \pm DP$  megásporos por esporângio, e na estação seca  $98 \pm DP$  (Cavalheiro-Filho et al. 2021). Embora não seja possível inferir a idade das plantas coletadas *in situ*, o número de folhas e o tamanho dos esporângios parecem estar relacionados com a idade da planta e/ou o grau de desenvolvimento do cormo. De acordo com Vöge (1997), existe uma relação direta entre o número de folhas por planta e o número de megásporos por megasporângio em *Isoëtes lacustris*.

Os esporângios são produzidos ao longo de todo o ano, com predomínio dos megasporângios na maior parte do tempo, com exceção do final do período chuvoso em que os microsporângios maduros podem prevalecer (Campos et al. 2021a). Fatores como radiação luminosa, altura da coluna da água, temperatura e concentração de macro e micronutrientes podem interferir na morfologia e no desenvolvimento do esporófito, embora esses efeitos ainda sejam em boa parte desconhecidos. A morfologia de *Isoëtes* é fortemente influenciada pelas condições do micro-habitat (Rury 1978), as quais podem interferir, também, no desenvolvimento reprodutivo (Vöge 1997, 2006).

## 5.7 As Distintas Formas de Reprodução das Espécies de *Isoëtes* de Carajás

A propagação sexuada é predominante dentre as espécies de *Isoëtes* para as quais se conhece a forma de reprodução. No entanto, apesar de ser observada mais raramente, a propagação vegetativa normalmente ocorre por dicotomias apicais seguidas de fragmentação ou por meio de gemas (Hickey 1986), e tem se apresentado fundamental para a reprodução de espécies, tais como *Isoëtes andicola* (Karrfalt 1999) e *Isoëtes savatieri* (Hickey et al. 2003). O conhecimento da forma de reprodução de espécies raras como as duas *Isoëtes* que ocorrem em Carajás constitui uma das etapas iniciais para o estabelecimento de programas de conservação.

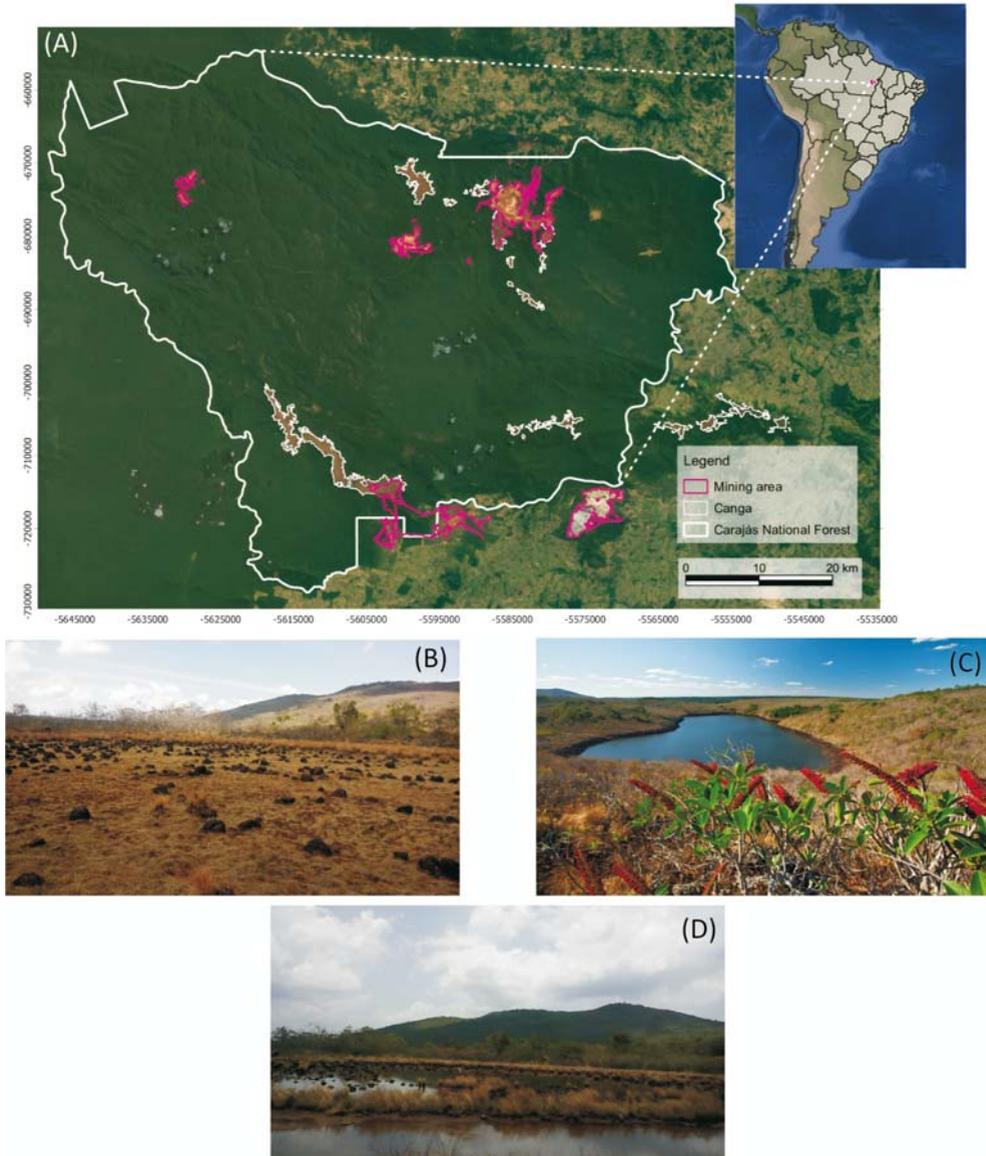
As formas de reprodução de *I. cangae* e *I. serracarajensis* foram examinadas em diferentes estudos (Caldeira et al. 2019, 2021, Zandonadi et al. 2021) por meio de plantas adultas coletadas no Lago do Amendoim e em diferentes lagos temporários das serras Norte e Sul das cangas de Carajás. Em estudo com as estruturas reprodutivas isoladas em condições controladas, foi realizada uma série de testes de germinação e regeneração de esporófitos a partir de micrósoros adicionados a um *pool* de megásporos em água destilada estéril (fertilização *in vitro*). Em todas as avaliações (mais de 4 mil esporos) foram observadas a germinação de megásporos e a emergência de esporófitos somente para *I. cangae*, confirmando a propagação sexuada desta espécie (figura 5.3). Megásporos de *I. serracarajensis* permaneceram fechados mesmo após longo período de cultivo *in vitro*. Por outro lado, a propagação vegetativa por meio da produção de rebentos ou via perfilhamento foi observada em *I. serracarajensis* (figura 5.5), mas não em *I. cangae*, mesmo após mais de 24 meses de cultivo. Em geral, quatro novas plantas são produzidas a partir do cormo de uma planta de *I. serracarajensis*. Vale destacar que, assim como observado para as espécies como *Isoëtes savatieri* e *Isoëtes chubutiana*, mesmo as plantas de *I. serracarajensis* que perfilham continuam produzindo estruturas reprodutivas (Caldeira et al. 2021, Hickey et al. 2003).



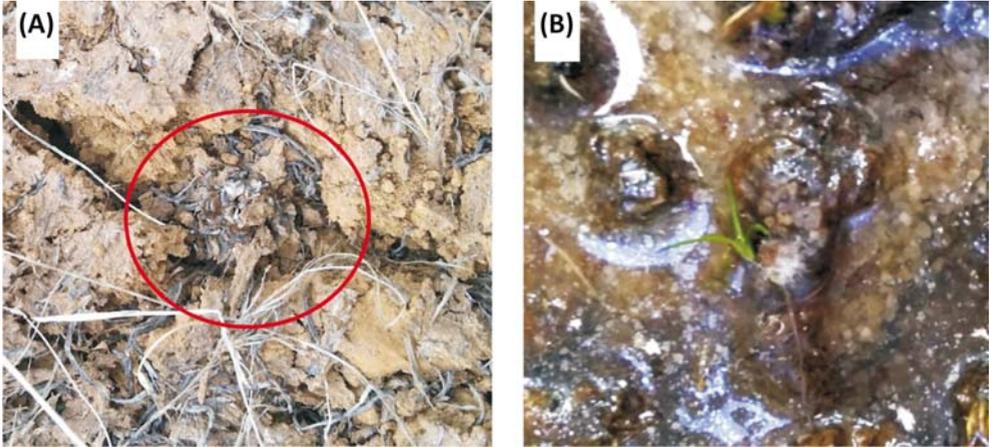
**Figura 5.5** A reprodução vegetativa de *Isoëtes serracarajensis*. (A) Novos esporófitos (perifilhos) ligados à planta-mãe que podem ser facilmente destacados. (B). Planta adulta e seus respectivos perifilhos são mostrados (C, D, E). Detalhes da emissão de raízes do fragmento do corno na base da folha são mostrados em E.

Essas estratégias reprodutivas distintas para as duas espécies de *Isoëtes* de Carajás podem estar ligadas aos seus habitats contrastantes. *Isoëtes cangae* habita um lago oligotrófico permanente com relativamente poucas alterações ambientais ao longo do ano, enquanto plantas de *I. serracarajensis* são encontradas em lagos temporários, enfrentando secas sazonais severas (figura 5.6), onde a propagação assexuada pode representar uma vantagem adaptativa ao curto período (cinco a seis meses) de crescimento durante o qual essas plantas possuem acesso à água. Esse curto período em condições favoráveis pode ser insuficiente para que plantas jovens atinjam a fase adulta e dispersem esporos viáveis para a geração de novos esporófitos. No entanto,

vale ressaltar a possibilidade de plantas de *I. serracarajensis* com dois anos ou mais possam também produzir estruturas reprodutivas capazes de tolerar períodos de seca, os quais podem germinar com o início das chuvas e o reabastecimento dos lagos temporários, desencadeando a reprodução sexuada sincronizada com condições ambientais favoráveis. Curiosamente, plantas de *I. serracarajensis* permaneceram vivas e mantiveram folhas verdes ao longo dos 12 meses na presença de água disponível, sugerindo que tais espécies podem apresentar crescimento contínuo, uma vez em ambientes favoráveis. Além disso, observações de campo sugerem que a escassez de água é acompanhada de dessecação e queda das folhas, enquanto o cormo da planta permanece protegido e vivo no solo até o início da próxima temporada de chuva, quando o crescimento é retomado. Quando coletados durante estação seca e reidratados em condições controladas, esses cormos, anteriormente secos, são capazes de regenerar completamente e desenvolver plantas normais (figura 5.7).



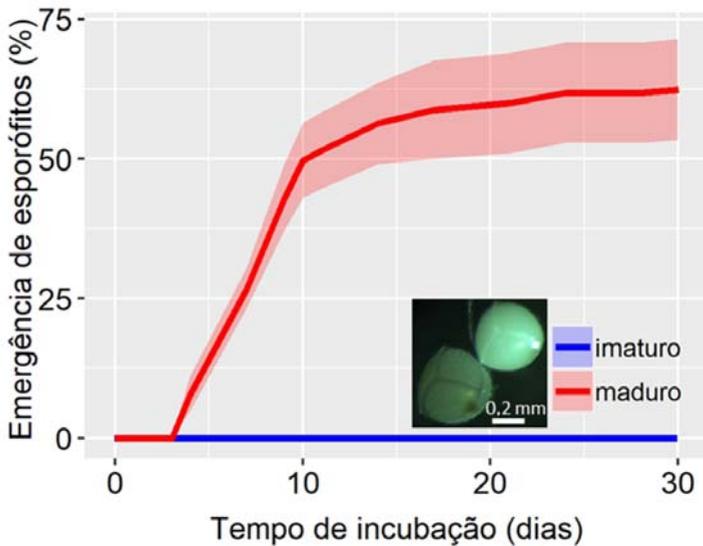
**Figura 5.6** Mapa da Floresta Nacional de Carajás e os locais onde são encontrados *Isoëtes serracarajensis* e *Isoëtes cangae*. (A) As áreas de mineração e os quatro afloramentos de montanhas ricas em ferro que abrigam os ecossistemas de canga de Carajás: Serra Norte, Serra Sul, Tarzan e Bocaina. Detalhes dos lagos temporárias (sítios com *I. serracarajensis*) durante as estações. (B) Seca. (C) Chuvosa. (D) O lago permanente onde se encontra *I. cangae* submersa.



**Figura 5.7** Emergência de folhas do corno de plantas de *Isoëtes serracarajensis* após período de dessecação em condições naturais. (A) Destaque para o corno de planta de *I. serracarajensis* em lago temporário seco no platô de canga S11B. (B) Emissão de folhas de *I. serracarajensis* após reidratação em condições controladas.

### 5.8 A Reprodução de *I. cangae* Requer Megásporos Maduros

Os ensaios de propagação sexuada com *I. cangae* mostraram uma grande variação na porcentagem de esporófitos obtidos, havendo amostras com mais de 90 % de germinação, assim como casos de germinação nula (Caldeira et al. 2021). Em um estudo em que os megásporos foram separados em diferentes estágios de maturação, foi observado que esporos maduros (de coloração marrom-escuro) obtidos de folhas mais externas de plantas adultas apresentaram elevadas taxas de germinação e produção de novas plantas. Entretanto, esporos imaturos (coloração marrom-clara a branca) retirados de folhas em desenvolvimento não apresentaram germinação (figura 5.8). Uma vez que, em condições naturais, a liberação de esporos está normalmente associada à decomposição do tecido que os envolve, formando o esporângio, e, portanto, requer a abscisão foliar, somente esporos em folhas “mais velhas” (senescentes) estarão aptos a germinar, enquanto esporos jovens ainda não são viáveis.



**Figura 5.8** Série temporal da emergência *in vitro* de esporófitos de *Isoëtes cangae* a partir de megásporos maduros (linha vermelha) e imaturos (linha azul) cultivados na presença de micrósoros. A área sombreada representa o intervalo de confiança em  $P < 0,05$ . A micrografia interna mostra megásporos maduros e imaturos.

### 5.9 *Isoëtes cangae* Reproduz-se de Forma Sexuada por Autofecundação e Fecundação Cruzada

Em estudos com esporos coletados de várias plantas adultas não foram observadas diferenças significativas de geração de esporófitos quando usadas estruturas reprodutivas masculinas e femininas de uma mesma planta (autofecundação) ou de plantas diferentes (fecundação cruzada) (Caldeira et al. 2021). Apesar da proximidade física dos esporângios masculinos e femininos e de a liberação das estruturas reprodutivas aumentar as chances de autofecundação, especialmente em condições de baixa movimentação da água (lagos e pântanos), como descrito para a espécie *I. hypsophila* (Chen et al. 2010), essa não parece ser a principal forma de reprodução para *I. cangae* (Caldeira et al. 2021). No Lago do Amendoim, onde a espécie ocorre naturalmente, estudos anteriores mostram que a fecundação cruzada possivelmente deva ocorrer com maior frequência em *I. cangae*, uma vez que a espécie possui alta diversidade genética e não apresenta sinais de endogamia, constituindo, portanto, uma população pan-mítica (Santos et al. 2020, Dalapicolla et al. 2021). Neste caso, é possível que movimentos por correntes de água e

animais dentro do Lago do Amendoim facilitem a migração dos esporos e dos gametas, assim como de esporófitos jovens, permitindo o aumento da frequência da fertilização cruzada na espécie.

### 5.10 A Propagação de *I. cangae* Requer a Presença de Micrósporos

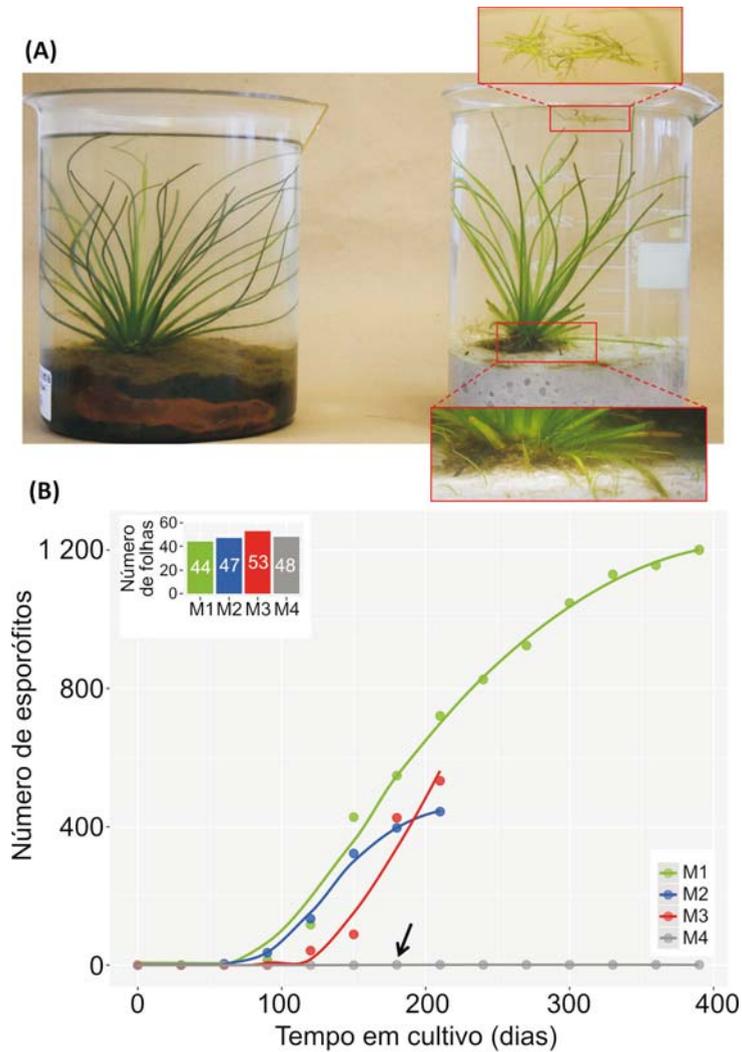
Assim como demonstrado para outras espécies de *Isoëtes*, em *I. cangae* também foi observado que megásporos maduros são capazes de efetuar a abertura de trilete, exposição de arquegônio e emissão de rizoides independente da presença de micrósporos no meio. Em geral, mesmo aptos ao desenvolvimento, esses gametas não são capazes de gerar um novo indivíduo por apomixia, ou seja, sem a presença do gameta masculino. De fato, a apomixia é considerada um evento raro no gênero *Isoëtes*, sendo reportada até o momento para a espécie *Isoëtes andicola* (Karrfalt 1999). No entanto, em um grupo de megásporos de *I. cangae* isolados como controle (sem a presença de micrósporos), observou-se o aparecimento de esporófitos em frequência muito baixa (2 %) e originados de uma única planta. Para verificar o requerimento do gameta masculino no processo de reprodução dessa espécie, lotes de megásporos que efetuaram a emissão de rizoides sem adição de micrósporos no meio foram separados e mantidos isolados por 15 dias. Após esse período, em sublotes em que houve a adição de micrósporos, a taxa de obtenção de esporófitos foi próxima a 100 %, enquanto não foram obtidos esporófitos durante os 30 dias seguintes, na ausência de micrósporos ao meio. Além disso, o uso de marcadores do tipo ISSR revelaram que as plantas-mãe eram diferentes genótipos das progênies, reforçando a ausência de reprodução via apomixia em *I. cangae*, ou seja, deixando indícios de que a espécie requer a presença de gameta masculino para propagação.

### 5.11 A Elevada Obtenção de Esporófitos de *Isoëtes cangae*

A propagação de *I. cangae* por meio da fertilização *in vitro* tem permitido a geração de novas plantas em condições controladas. O sucesso do cultivo dessas plantas até a fase adulta tem levado à obtenção de grande número de estruturas reprodutivas, as quais são posteriormente usadas para geração de novas plantas. Milhares de plantas têm sido propagadas nas dependências do ITVDS e do Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade (NUPEM), empregando essas técnicas.

O cultivo de plantas de *I. cangae* em condições ultraoligotróficas também leva à obtenção de elevado número de novos esporófitos (Caldeira et al. 2019). Para tal, procede-se a transferência de plantas adultas de *I. cangae* para aquários contendo areia quartzosa estéril e água destilada. O cultivo nessas condições acelera o envelhecimento das folhas mais velhas (tornam-se amareladas inicialmente e em seguida marrons), ou seja, expostas na parte mais externa do cormo, iniciando o processo de abscisão foliar e a consequente decomposição do tecido que envolve os esporângios, liberando as estruturas reprodutivas no meio. Uma vez executado com plantas adultas contendo grande número de folhas, é possível a obtenção de centenas de esporófitos de uma única planta (figura 5.9). Apesar de trazer consigo o depauperamento gradual da planta matriz, essa forma de propagação pode ser facilmente executada em ambientes em que não é possível a manutenção de condições assépticas, como em cultivo *in vitro*, assim como também é possível a recuperação da planta matriz, retornando-a para uma condição de cultivo na presença de nutrientes.

Em suma, os estudos obtidos nos permitem compreender o ciclo de vida e as etapas de desenvolvimento do esporófito de *I. cangae*, seja em ambiente natural, seja em condições *ex situ*. O acompanhamento fenológico da população ocorrente no Lago do Amendoim evidenciou que as plantas apresentam produção contínua de esporófilos, e que os esporos, uma vez amadurecidos, apresentam elevada viabilidade. Além disso, a produção numerosa de esporos femininos e masculinos, os quais são dispersos pelo movimento da água, indica uma grande capacidade colonizadora da espécie. A reprodução sexuada em *I. cangae* constitui assim uma forma eficiente de propagação da espécie que favorece a diversidade genética dentro da população. A fácil manipulação dos esporos e a possibilidade de obtenção de muitas plantas por meio do cultivo *in vitro* contribuem para a implementação de planos de manejo e conservação da espécie.



**Figura 5.9** (A) Série temporal do aparecimento cumulativo de esporófitos ao redor das quatro plantas adultas de *Isoëtes cangae*. (B) Os esporófitos foram coletados das três plantas (M1, M2 e M3) e transferidos para ambiente pobre em nutrientes. A seta preta destaca um único esporófito que surgiu ao redor de uma planta mantida sobre sedimentos do lago (M4). O gráfico inserido na figura principal mostra o número de folhas da planta no início do experimento.

## Referências

- Blackmore, S. et al. 2012. Development of megaspores and microspores in *Isoëtes japonica* A. Br. (Lycopodiophyta: Isoetaceae). – Grana 51: 84-96.
- Bray, R. D. et al. 2018. Interesting, Provocative, and Enigmatic: Morphological Observations on Southeastern Quillworts (*Isoëtes* Isoetaceae, Lycopodiophyta). – Castanea 83: 263-269.
- Caldeira, C. F. et al. 2019. Sporeling regeneration and *ex situ* growth of *Isoëtes cangae* (Isoetaceae): Initial steps towards the conservation of a rare Amazonian quillwort. – Aquat Bot 152: 51-58.
- Caldeira, C. F. et al. 2021. Distinct Reproductive Strategy of Two Endemic Amazonian Quillworts. – Diversity 13: 348.
- Campos, N. V. et al. 2021a. Climatic triggers and phenological responses in *Isoëtes cangae* (Isoetaceae), an endemic quillwort from Amazon Iron Rocky Outcrops, Brazil. – Limnologica 89: 125889.
- Campos, N. V. et al. 2021b. Discovery of Mixed Sporangia in the Amazonian Quillwort *Isoëtes cangae*. – Am Fern J 111: 327-331.
- Cavalheiro-Filho, S. L. et al. 2021. Morphological Plasticity in the Endemic *Isoëtes* Species from Serra dos Carajás, Amazonia, Brazil. – Am Fern J 111: 174-195.
- Chen, Y.-Y. et al. 2010. Genetic diversity and population structure of the endangered alpine quillwort *Isoëtes hypsophila* Hand.-Mazz. revealed by AFLP markers. – Plant Syst Evol 290: 127-139.
- Dalpicolla, J. et al. 2021. Conservation implications of genetic structure in the narrowest endemic quillwort from the Eastern Amazon. – Ecol Evol 11: 10119-10132.
- Garrett, M. e Kantvilas, G. 1992. Morphology, ecology and distribution of *Isoëtes* L. in Tasmania. – Pap Proc 126: 115-122.
- Gifford, E. M. e Foster, A. S. 1989. Morphology and Evolution of Vascular Plants. – W. H. Freeman.
- Hickey, R. J. 1986. The early evolutionary and morphological diversity of *Isoëtes*, with descriptions of two new Neotropical species. – Syst Bot 11: 309-321.

- Hickey, R. J. et al. 2003. A re-evaluation of *Isoëtes savatieri* Franchet in Argentina and Chile. – *Am Fern J* 93: 126-136.
- Karrfalt, E. 1999. Some Observations on the Reproductive Anatomy of *Isoëtes andicola*. – *Am Fern J* 89: 198-203.
- Kott, L. e Britton, D. M. 1983. Spore morphology and taxonomy of *Isoëtes* in northeastern North America. – *Can J Bot* 61: 3140-3163.
- La Motte, C. 1933. Morphology of the Megagametophyte and the Embryo Sporophyte of *Isoëtes lithophila*. – *Am J Bot* 20: 217-233.
- Oh, M. J. et al. 2013. High Frequency Sporophytes Regeneration from the Spore Culture of the Endangered Aquatic Fern *Isoëtes coreana*. – *Am J Plant Sci* 4: 14-20.
- Pereira, J. B. D. S. et al. 2016. Two New Species of *Isoëtes* (Isoetaceae) from northern Brazil. – *Phytotaxa* 272: 141-148.
- Rury, P. M. 1978. A New and Unique, Mat-Forming Merlin's-Grass (*Isoëtes*) from Georgia. – *Am Fern J* 68: 99-108.
- Santos, M. P. et al. 2020. The genetic diversity and population structure of two endemic Amazonian quillwort (*Isoëtes* L.) species. – *PeerJ* 8: e10274.
- Silva, M. S. D. et al. 2018. Morphology and morphometry of upland lakes over lateritic crust, Serra dos Carajás, southeastern Amazon region. – *An Acad Bras Ciênc* 90: 1309-1325.
- Vöge, M. 1997. Plant size and fertility of *Isoëtes lacustris* L. in 20 lakes of Scandinavia: a field study. – *Arch Hydrobiol*: 171-185.
- Vöge, M. 2006. The reproductive phenology of *Isoëtes lacustris* L.: Results of field studies in Scandinavian lakes. – *Limnologica* 36: 228-233.
- Zandonadi, D. B. et al. 2021. Ecophysiology of two endemic Amazon quillworts. – *Aquat Bot* 170: 130.



## CAPÍTULO 6

---

---

### Fisiologia da Conservação de *Isoëtes*

\* Daniel Basílio Zandonadi \* Cecilio Fróis Caldeira \* Mirella Pupo Santos  
\* Emiliano Nicolas Calderon \* Luis Alfredo dos Santos Prado  
\* Janielio Gonçalves da Rocha \* Heitor Monteiro Duarte  
\* Rodrigo Lemes Martins

TÍTULO CURTO (*RUNNING TITLE*)

---

---

Aspectos acerca da Dinâmica da Eficiência  
no Uso da Luz por *Isoëtes*

## Resumo

A fisiologia da conservação envolve a avaliação de diversos aspectos que relacionam a fisiologia vegetal ao ambiente. Essas análises permitem compreender tanto a plasticidade quanto a vulnerabilidade da espécie à flutuação ambiental, de forma a gerar conhecimento e previsibilidade, contribuindo, portanto, para a conservação da espécie. As análises das condições luminosas e nutricionais do ambiente, *in situ*, bem como *ex situ*, são uma das principais avaliações necessárias. A espécie *Isoëtes cangae* habita o Lago do Amendoim, que possui espectro de luz bem peculiar. A espécie habita o fundo desse lago, onde há baixa irradiância relativa (de 20 a 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  dependendo da época do ano). As nossas análises mostram que, apesar de estar presente nesse local de baixa luminosidade, a espécie possui alta plasticidade fotoquímica; *I. cangae* pode apresentar fotoinibição, refletida na redução das taxas de crescimento e reprodução, mas sobrevive por muitos meses em condições de alta irradiância. O lago possui baixa concentração de nutrientes na água e no sedimento, com exceção dos micronutrientes ferro e manganês, que têm elevada concentração. O metabolismo de nutrientes minerais avaliado sugere que a espécie não é exigente nutricionalmente, mas parece ter predileção por sedimento com baixo pH e potencial redox, contribuindo para elevada disponibilidade de ferro. A espécie apresenta tolerância a baixa ou a nenhuma nutrição por longo período. Uma vez que a espécie dispõe de reservas no corno, essas podem ser mobilizadas durante o período de escassez. Em relação ao metabolismo do carbono, descobrimos que essa espécie possui metabolismo MAC (metabolismo ácido das crassuláceas), o que é comum entre as espécies de *Isoëtes* subaquáticas. As taxas de crescimento *ex situ* são consideradas altas quando comparadas a outras *Isoëtes*, havendo grande capacidade de rebrota e reprodução de novas folhas, mesmo durante condições de estresse. Essas taxas de crescimento foram positivamente relacionadas às atividades das bombas de prótons da membrana plasmática, enzima central do metabolismo energético. O conhecimento produzido e apresentado neste capítulo em relação às respostas fisiológicas de *I. cangae* é essencial para a conservação da espécie.

**Palavras-chave:** fisiologia vegetal; plasticidade fotoquímica; nutrição mineral; conservação da espécie.

## 6.1 Introdução

As mudanças climáticas que o planeta vem enfrentando são reconhecidas há pelo menos 30 anos e a Ciência tem abordado o tema por meio de estudos que apontam os riscos que a humanidade poderá enfrentar, caso não haja reversão de uma série de fatores, tais como desmatamento, emissão de gases e crescimento populacional. Uma das consequências desse processo afeta diretamente cerca de 5 milhões de km<sup>2</sup> da área da superfície da Terra que se encontra coberta por lagos naturais e artificiais, componentes-chave dos sistemas ecológicos e hidrológicos globais. As projeções de aumentos da duração e da intensidade das ondas de calor indicam que as mudanças no ambiente físico dos lagos gerarão desafios para a biodiversidade desses ambientes e os consequentes benefícios que proporcionam às populações humanas (Woolway et al. 2021). Uma recente avaliação do conjunto de dados de volume global de evaporação de lagos (1,42 milhão de lagos de 1985 a 2018) indicou um incremento na taxa de evaporação de cerca de 60 %, correspondendo a uma perda anual de quase 50 km<sup>3</sup> de água (Zhao et al. 2022).

O quadro acima descrito coloca a sociedade e a comunidade científica em alerta, para que se avance no entendimento desses sistemas e suas espécies. Cabe destacar que os processos produtivos mantenedores dos sistemas, assim como nos ambientes terrestres, encontram-se regulados pelas plantas, organismos especializados em utilizar a fonte de energia mais abundante disponível no planeta, os fótons originados da luz solar.

O conhecimento dos detalhes acerca dos processos vegetais, tais como crescimento e desenvolvimento durante a interação das plantas com outros seres vivos e com o ambiente físico, é essencial para a conservação desses sistemas. Isto é justamente o que estuda o campo da ciência conhecido como Fisiologia Vegetal. Quando os cientistas deparam-se com novas espécies, é muito importante compreender os aspectos básicos da fisiologia vegetal. O caso da licófito *Isoëtes cangae* não seria diferente. Por conta das alterações do ambiente onde essa espécie ocorre naturalmente é essencial estudar as respostas fisiológicas de *I. cangae* para evitar o declínio da sua população. Essa estratégia é contemplada em um campo de estudos científicos apenas nos últimos 16 anos, a “Fisiologia da Conservação”. A fisiologia da conservação é o estudo das respostas fisiológicas dos organismos à alteração humana do ambiente que pode causar ou contribuir para o declínio populacional (Wikelski e Cooke 2006). Os estudos iniciais concentraram-se em animais selvagens. A fisiologia da conservação deve ser aplicável a todos os organismos

e populações, incluindo as plantas (van Kleunen 2014). Neste capítulo serão abordadas questões gerais relacionadas à fisiologia das plantas do gênero em uma visão geral, e da espécie *I. cangae* em especial. Parte das descobertas recentes em relação a fotossíntese, metabolismo, nutrição e crescimento dessa espécie será comentada.

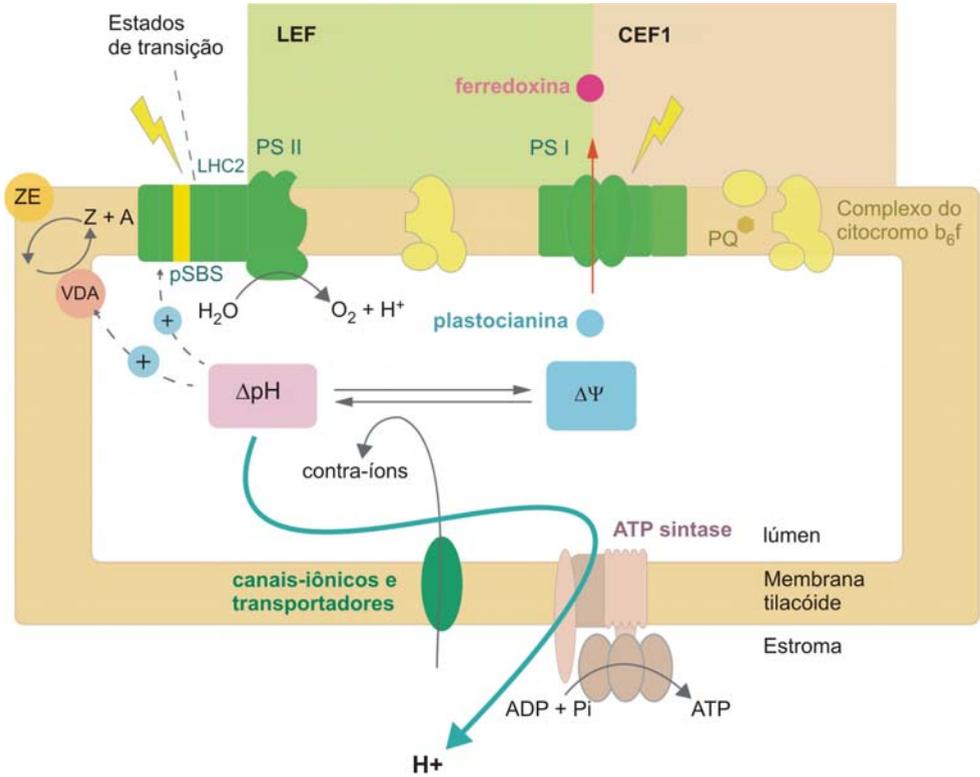
## 6.2 Qualidade e Quantidade de Luz no Crescimento de *Isoëtes cangae*

A fotossíntese é o processo mais importante de um ecossistema, pois responde pela capacidade dos sistemas vivos de incorporar a energia na forma de moléculas orgânicas, que são a base da vida. Esse processo dá-se pela fotossíntese, que é um conceito que resume um conjunto de reações, por meio das quais as plantas e outros organismos autotróficos utilizam gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) como fonte de carbono para a produção de moléculas orgânicas a partir da energia proveniente da radiação solar. De maneira simplificada, a fotossíntese consiste em duas fases principais: a fase das reações relacionadas à luz, ou reações luminosas, e a fase das reações do carbono, ou de carboxilação. Uma vez que a fase luminosa da fotossíntese é parte da fisiologia vegetal diretamente relacionada ao funcionamento e à função das plantas, o conhecimento dessa área da Ciência é imprescindível para a compreensão dos requisitos de hábitat de plantas nativas ameaçadas de extinção e de plantas exóticas potencialmente invasoras.

Os estudos relacionados à fluorescência da clorofila em *I. cangae* têm auxiliado na compreensão de parte dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento de *I. cangae* tanto *in situ* quanto *ex situ*. Estes estudos são realizados de forma pioneira mediante a utilização de técnicas que avaliam a fluorescência da clorofila.

A fluorescência da *clorofila a* é considerada um indicador bastante útil das reações da fotossíntese, e a eficiência fotoquímica do fotossistema II (*FsII*), ou rendimento quântico do fotossistema, pode ser avaliada pela técnica de fluorometria que utiliza o pulso de luz com amplitude modulada (PAM) e por equipamentos de aquisição de imagens da fluorescência (Genty et al. 1989, Bilger et al. 1995, Maxwell e Johnson 2000). Ambas as técnicas são amplamente utilizadas para o estado da fase luminosa da fotossíntese em diversas espécies vegetais. Em resumo, podemos assumir que as clorofilas do centro de reação localizadas no *FsII* têm seu potencial redox alterado

na presença da luz, o que pode ser percebido pela emissão de fluorescência capturada por diferentes métodos explorados pelos diferentes tipos de aparelhos e sensores disponíveis no mercado (figura 6.1).



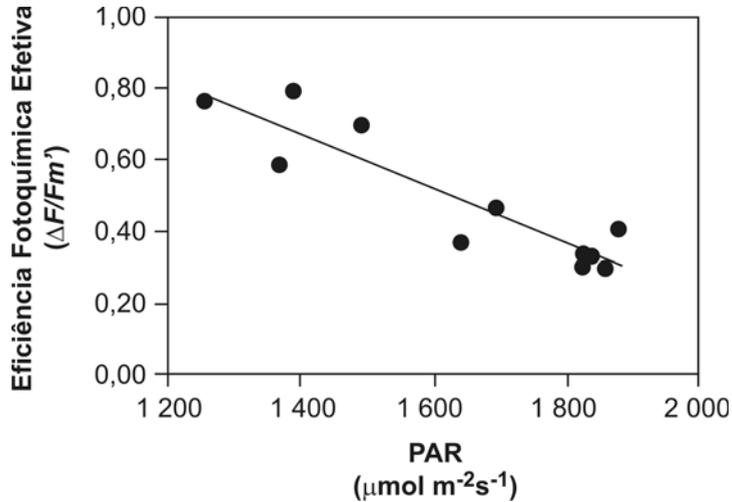
**Figura 6.1** Visão geral dos circuitos de prótons e elétrons durante as reações luminosas da fotossíntese. Adaptado de Avenson et al. (2005). A transferência de energia da luz absorvida (raios amarelos) dos complexos coletores de luz (LHC2) para o fotossistema II (PSII, do inglês *Photosystem II*) e o fotossistema (PSI, do inglês *Photosystem I*) oxida seus centros de reação, conduzindo o fluxo linear de elétrons (LEF, do inglês *Linear Electron Flux*, também conhecido como ETR ou Taxa de Transporte de Elétrons) da  $H_2O$  para o NADPH. Os circuitos do fluxo de elétrons (setas laranjas) e prótons (setas azuis) do LEF (caixa azul) e o fluxo de elétrons cíclico em torno do PSI (CEF1, caixa vermelha) são representados.

A eficiência quântica efetiva do *FsII* pode ser resumida como uma fração de luz absorvida pela *clorofila a*, associada à atividade do *FsII* e utilizada nos processos fotoquímicos ( $\Delta F/Fm'$ , onde *F* representa a fluorescência emitida pelas amostras adaptadas à luz actínica – pré-iluminadas – e *Fm'* representa fluorescência máxima após emissão de pulso de saturação de

luz – Maxwell e Johnson 2000). Já a eficiência quântica potencial do  $FsII$  é uma medida do rendimento do  $FsII$  após a adaptação ao escuro ( $Fv/Fm'$ ; onde  $Fv$  é a fluorescência variável máxima calculada como  $Fm - F_0$ , em que  $F_0$ , a fluorescência basal da amostra, é inicialmente mensurada e seguida pela determinação de  $Fm$ , a fluorescência máxima, obtida após pulso de luz saturante). A taxa de transporte de elétrons (ETR) é calculada como uma aproximação empírica das taxas relativas de transporte de elétrons ( $ETR = \Delta F/Fm' \times PAR \times 0,84 \times 0,5$ ). Assume-se nesse cálculo a distribuição igualitária de energia entre os fotossistemas I e II (0,5) e 84 % (0,84) de absorvância da radiação ativa para a fotossíntese (PAR) incidente pela amostra (Genty et al. 1989, Bilger et al. 1995, Maxwell e Johnson 2000).

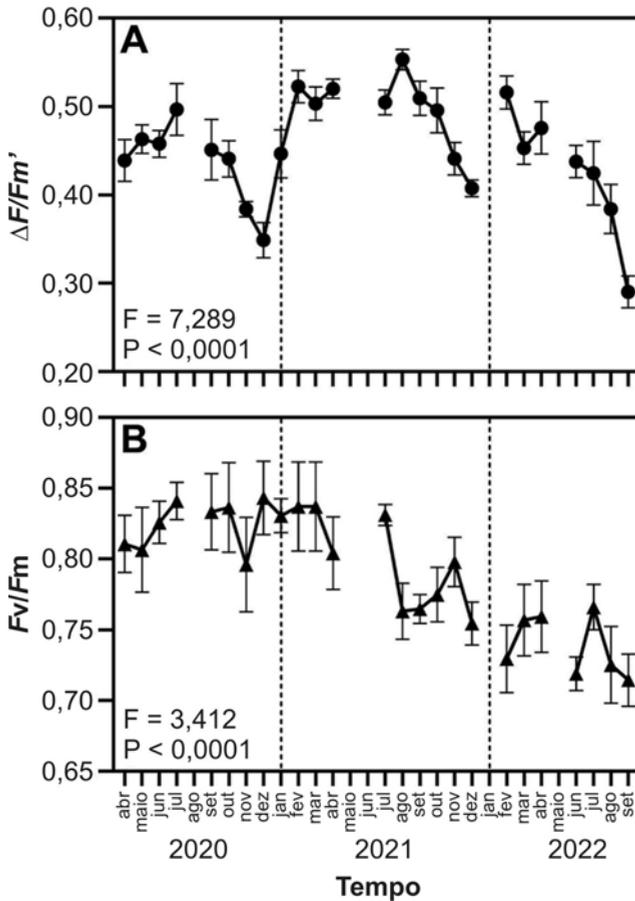
Trabalhos científicos abordando a fase luminosa da fotossíntese em *Isoëtes* são escassos. Hawes e colaboradores (2003) desenvolveram um trabalho fundamental sobre a eficiência do  $FsII$  no gênero *Isoëtes*: eles avaliaram *in situ* plantas submersas (3 e 7 m de profundidade) de *I. alpinus*, residentes no Lago Wanaka, que preenche um vale escavado glacialmente nos Alpes do Sul da Ilha do Sul da Nova Zelândia. As avaliações do  $FsII$  obtidas indicaram que *I. alpinus* apresenta uma resposta típica de redução da eficiência quântica efetiva do  $FsII$  de acordo com o aumento da radiação solar através da coluna d'água, com resultados que ficaram bastante variáveis entre 0,02 e 0,8 ao longo da variação da luz durante o curso de medida entre 8 h até 20 h, com médias em torno de 0,3 a 0,6. As avaliações da eficiência quântica potencial do  $FsII$  ( $Fv/Fm$ ) também foram realizadas pelos autores. Por meio da aclimação das folhas ao escuro é possível verificar o estado de ativação do  $FsII$ , que esteve em média entre 0,50 e 0,60, aproximadamente.

A avaliação da fisiologia das *Isoëtes* realizada em três piscinas de cultivo independentes do viveiro florestal de Carajás por meio da fluorescência da *clorofila a* do fotossistema II, apresenta resultados consistentes com a literatura (figura 6.2). A  $\Delta F/Fm'$  versus a irradiância das folhas de *I. cangae*, em diferentes horários, ao longo do dia, apresentou correlação direta conforme descrito por Durako (2012). As plantas das piscinas apresentaram tamanho adequado e fotossíntese condizentes com as condições encontradas no seu ambiente original.



**Figura 6.2** Avaliação da fluorescência da clorofila de *Isoëtes cangae* nas piscinas do viveiro florestal de Carajás – PA. Eficiência fotoquímica efetiva ( $\Delta F/Fm'$ ) versus irradiância das folhas de *I. cangae* em diferentes horários ao longo do dia.

O estresse abiótico pode afetar o funcionamento dos mecanismos fotossintéticos, tais como a  $\Delta F/Fm'$  (Bilger et al. 1995). De fato, medidas como essa permitem avaliar o desempenho fotossintético da planta e a extensão de sua tolerância ao estresse ambiental. Em cultivo *ex situ*, o monitoramento das características da fluorescência da clorofila pode ser valioso. No caso de *I. cangae*, existe uma variação do rendimento quântico efetivo ( $\Delta F/Fm'$ ) durante o período de cultivo avaliado em resposta a mudanças ambientais sazonais relacionadas à radiação luminosa, e estresses como variação repentina da coluna d'água (figura 6.3). Durante o período de monitoramento de três anos, do inverno (julho) ao verão (dezembro) todos os anos o  $\Delta F/Fm'$  diminuiu de cerca de 0,50 para próximo de 0,35 e recuperou-se acima de 0,50.



**Figura 6.3** Monitoramento da fluorescência da clorofila de folhas de plantas de *Isoëtes cangae* cultivadas *ex situ* em Macaé – RJ. Eficiência fotossintética efetiva (círculos) e eficiência fotossintética potencial de *I. cangae* (triângulos) cultivadas em piscina durante o período de abril de 2020 a setembro de 2022. As linhas tracejadas no interior do gráfico delimitam os anos.

O rendimento quântico potencial ( $Fv/Fm$ ) foi estável no primeiro ano de monitoramento (0,81 a 0,84). Durante o segundo ano de monitoramento, as plantas  $Fv/Fm$  caíram de 0,83 para 0,75. *Isoëtes Fv/Fm* manteve-se estável (em torno de 0,73 a 0,71) no terceiro ano de monitoramento (de janeiro a setembro).

Os valores registrados na condição *ex situ* são semelhantes aos observados por Zandonadi et al. (2021), e estão dentro dos registrados em LA, reforçando que *I. cangae* é um organismo bastante adaptável. No entanto, há uma redução consistente de  $Fv/Fm$  ao longo do tempo em plantas cultivadas *ex*

*situ*, e esse resultado pode estar relacionado ao estresse luminoso durante o cultivo na piscina devido à redução da coluna d'água. Assim, relatamos que a alta irradiância prejudica o crescimento de *I. cangae* (Santos et al. 2022). A razão  $F_v/F_m$  é tipicamente relacionada negativamente com a radiância do fóton; conseqüentemente, uma diminuição nessa característica é antecipada quando a radiância do fóton adaptado do organismo é constantemente excedida (Jiang et al. 2018, Santos et al. 2022). Assim, a fotossíntese é regulada em resposta a condições ambientais dinâmicas que vão desde a exposição artificial de alta irradiância a variações sazonais lentas, especialmente para organismos adaptados a diferentes condições ecológicas, como plantas adaptadas ao escuro, que podem sofrer fotoinibição com o aumento da intensidade da luz (Sello et al. 2019, Liu et al. 2021). Os espectros de luz em hábitat natural sugerem que *I. cangae* é uma espécie tolerante à sombra, e os resultados em luz artificial confirmaram o comprometimento do crescimento e a inibição da fotossíntese sob "alta irradiância" ( $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Santos et al. 2022). Dessa forma, o cultivo *ex situ* de longa duração pode causar uma redução nas características fotossintéticas, pois a coluna d'água é menor, o que, conseqüentemente, afetará a quantidade de luz que as plantas recebem.

Como pode ser observado na figura 6.3, nos últimos meses do cultivo *ex situ*, há um decréscimo da eficiência quântica potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), o que pode estar relacionado ao tempo do cultivo em condições bastante diversas da original (fertilidade do substrato, nutrientes dissolvidos na água, temperatura da água e do ambiente e principalmente fotoperíodo e qualidade da radiação incidente). Além disso, questões intrínsecas ao desenvolvimento da planta (idade, por exemplo). De toda forma, os índices apresentados funcionam adequadamente para o monitoramento da fisiologia das plantas cultivadas *ex situ*.

Os estudos relacionados à fluorescência da clorofila em *I. cangae* têm auxiliado na compreensão de parte dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento de *I. cangae* tanto *in situ* quanto *ex situ*. Uma vez que a fase luminosa da fotossíntese é parte da fisiologia vegetal diretamente relacionada ao funcionamento das plantas, o conhecimento dessa área da Ciência é imprescindível para a compreensão dos requisitos de hábitat de plantas nativas ameaçadas de extinção e de plantas exóticas potencialmente invasoras.

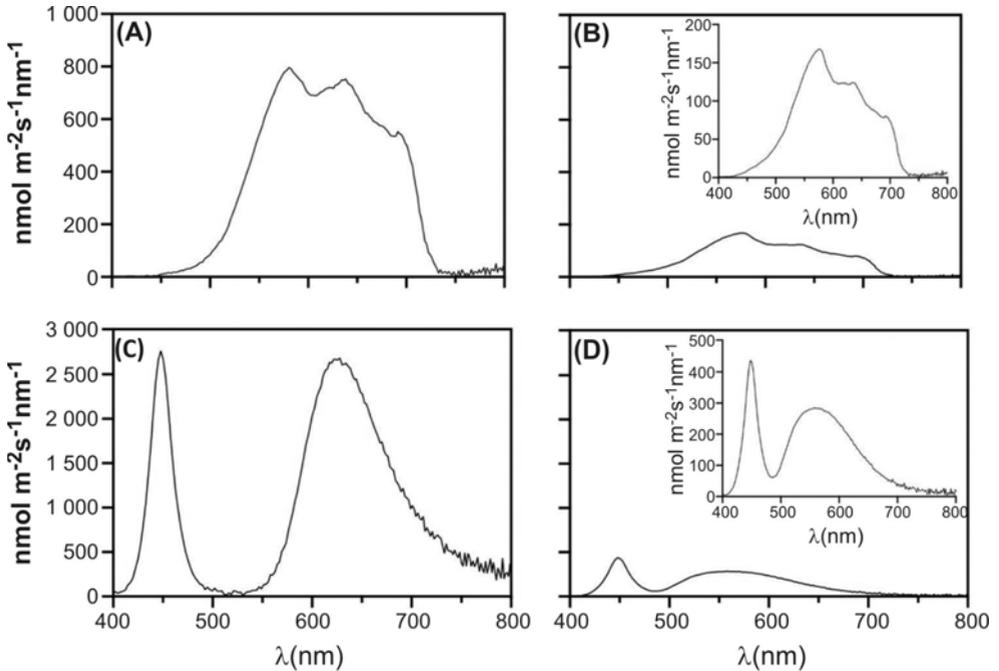
### 6.3 Plasticidade Fotossintética: Efeito da Alta Irradiância sobre Crescimento de *Isoëtes cangae*

O crescimento de organismos fotossintéticos aquáticos é limitado à estreita zona de iluminação da superfície, conhecida como zona eufótica. A luz é absorvida e espalhada por partículas que reduzem a sua intensidade e alteram a sua composição espectral ao longo da coluna de água, sendo crucial para o zoneamento vertical da estrutura da comunidade de plantas aquáticas (Kirk 2011). Embora o aumento no tamanho e no número de pigmentos fotossintéticos seja um mecanismo clássico para otimizar a absorção de luz e a eficiência quântica de plantas tolerantes a sombra, a ecofisiologia da fotossíntese em plantas aquáticas tropicais é menos conhecida quando comparada com suas contrapartes terrestres.

As menores taxas fotossintéticas e a condutância do mesófilo à difusão de CO<sub>2</sub> ocorrem nas briófitas, e os maiores valores são obtidos nas angiospermas, enquanto as licófitas apresentam valores intermediários (Gago et al. 2019). A disparidade dentro da escala filogenética está associada à possível ausência de regulação fina na condutância estomática e mesófila em grupos de plantas basais (Carriquí et al. 2015, Gago et al. 2019). Além disso, a irradiação excessiva de luz prejudica o desempenho fotossintético em plantas submersas por meio da foto-oxidação do fotossistema II (Raven 2011, Liu et al. 2019). Estudos sobre fotoinibição da fotossíntese e proteção do aparato fotossintético são abundantes para plantas terrestres (Müller e Munné-Bosch 2021), mas raros para plantas aquáticas, especialmente do gênero *Isoëtes* (Hawes et al. 2003). O nível da água varia consideravelmente no hábitat de *I. cangae*, resultando em alta irradiância durante a estação seca (Silva et al. 2018).

A caracterização da qualidade e da quantidade de luz no Lago do Amendoim foi determinada, e os espectros de luz natural incidentes no hábitat de ocorrência de *I. cangae*, no fundo do Lago do Amendoim, apresentaram variações importantes entre as estações chuvosa e seca (figura 6.4A-B). Os espectros de luz mostraram um pico de energia agudo em 584 nm, e picos menores entre 640 e 700 nm durante a estação seca, enquanto durante a estação chuvosa o espectro apresentou picos semelhantes, mas com menos energia. Essas mudanças são esperadas devido não apenas à variação da coluna d'água, mas também à entrada de matéria orgânica do escoamento superficial da área de drenagem (Sahoo et al. 2016), o que pode explicar a baixa contribuição de comprimentos de onda menores do que 500 nm durante a estação chuvosa. Existe uma boa correlação entre as medições de luz

realizadas com equipamentos sensíveis a LUX ou PAR ( $y = 0,0081x - 4,7819$ ,  $r^2 = 0,99$ ). Essa correlação foi essencial para avaliar a intensidade da luz durante medições de longo prazo *in situ*.



**Figura 6.4** Espectros de luz natural para *I. cangae* no Lago do Amendoim e espectros de luz LED no cultivo *ex situ* na UFRJ. Espectros de luz natural no fundo do lago durante agosto de 2020 (A), a 2 m de profundidade, e fevereiro de 2021 (B), a 2,5 m. Espectros de luz de LED em cultivo *ex situ* em aquários sob condições de alta irradiância expostos a  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR (C), e sob condições de controle expostos a  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR (D). PAR: radiação fotossinteticamente ativa. As inserções dentro dos espectros B e D correspondem aos respectivos gráficos com ampliação no eixo y.

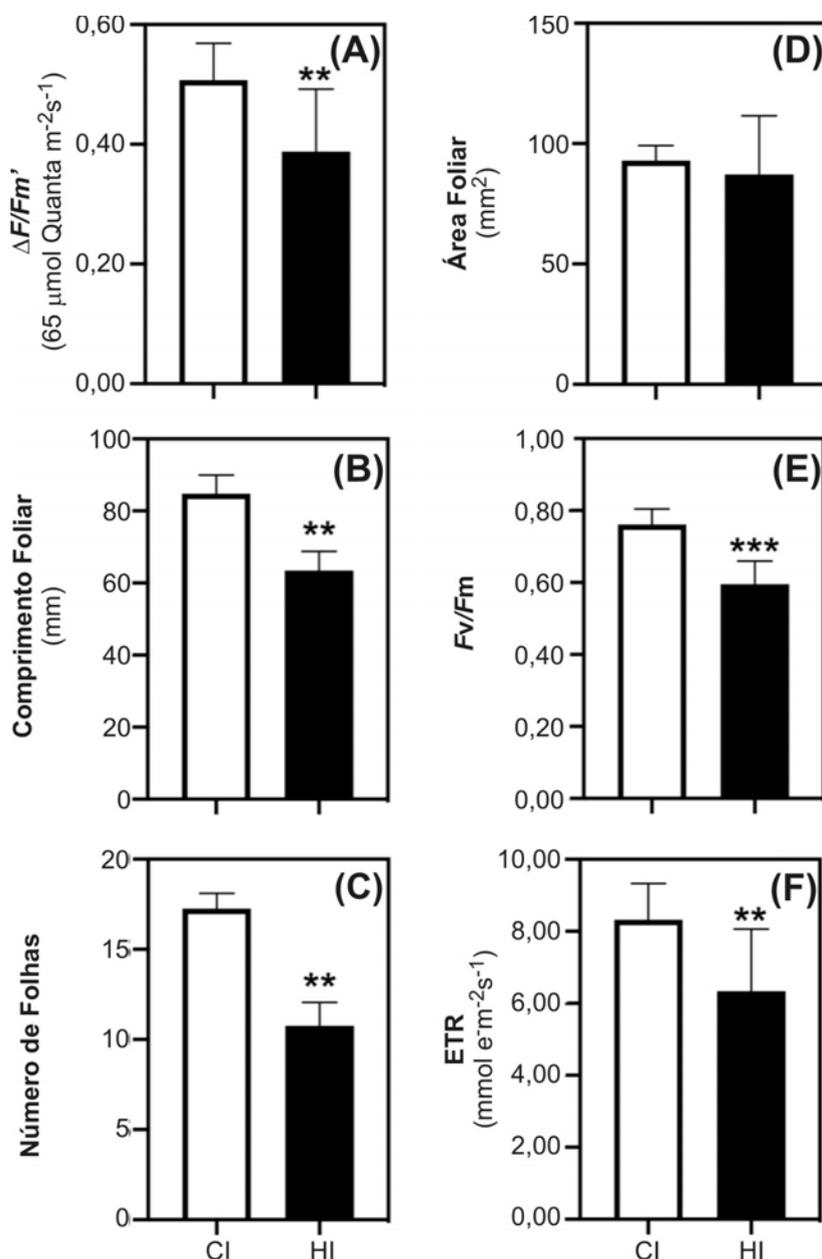
Fonte: Adaptado de Santos et al. (2022).

Devido à sua importância, para a conservação da espécie, é fundamental que sejam avaliados os efeitos do espectro de luz subaquática artificial sobre o crescimento de *I. cangae*, bem como a mimetização de seu ambiente natural. Desse modo, serão preenchidas algumas das lacunas sobre os impactos da alta e da baixa irradiâncias nas características morfofisiológicas dessa espécie.

Os espectros de luz em condições artificiais controle (IC – irradiância controle) e com alta irradiância (AI –  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) foram semelhantes na faixa azul, entretanto, a condição AI apresentou um aumento na luz ver-

melha. Ambas as condições artificiais têm um pico em torno de 430-450 nm, embora a energia seja distribuída de maneira diferente nas outras bandas do espectro. Na condição AI, houve um pico de energia agudo em 450 nm e um pico amplo em 636 nm, seguido de queda subsequente na faixa de 700 nm (figura 6.4C). Em aquários com luz controle houve um pico de energia acentuado em 432 nm e um pico amplo em 570 nm, seguido por uma queda subsequente na faixa de 700 nm (figura 6.4D). Embora os sistemas de luz artificial apresentem radiação diferentes da radiação solar, as plantas “controle” sobreviveram e mantiveram-se saudáveis durante o experimento, características fundamentais para o sucesso do cultivo *ex situ* e a manutenção da espécie.

Avaliações da fase luminosa da fotossíntese indicaram que as plantas, quando expostas por dois dias em AI a  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , apresentam maior valor da taxa de transporte máximo de elétrons (ETR<sub>m</sub>) e irradiância de saturação mínima ( $I_k$ ), indicando que os fotossistemas foram capazes de aclimação de curto prazo. No entanto, no cultivo *ex situ* de AI de maior prazo (120 dias), as análises morfológica e fisiológica das características de *I. cangae* indicaram que o crescimento e o desenvolvimento da espécie foram alterados pela variação da irradiância (figuras 6.5 e 6.6).



**Figura 6.5** Alterações morfológicas e fisiológicas em *Isoëtes cangae* cultivadas sob condições controladas e de alta irradiância. (A) Área foliar; (B) Comprimento foliar; (C) Número de folhas; (D) Rendimento quântico potencial de  $F_{SI}$ ; (E) Rendimento quântico efetivo do  $F_{SI}$ ; e (F) Taxa de transporte de elétrons. Médias  $\pm$  desvio-padrão, teste t, \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 e \*\*\*P < 0,001.

Fonte: Adaptado de Santos et al. (2022).



**Figura 6.6** Imagens representativas de *I. cangae* após quatro meses sob condições de controle (IC) e alta irradiância (AI) no cultivo de aquários. Barra de escala: 2 cm.

Variações na recepção de luz também influenciam o potencial de uma planta para capturar carbono, o que pode limitar o crescimento vegetal e a fotossíntese e, como esperado, a condição AI resultou em mudanças nos processos fotossintéticos, como confirmado pela avaliação da fluorescência da clorofila a (figura 6.5). Particularmente, o parâmetro  $F_v/F_m$  foi reduzido na condição AI (figura 6.5E). A redução da relação  $F_v/F_m$  pode indicar danos causados aos centros de reação do  $FsII$  pelo excesso de irradiância luminosa, provavelmente devido à fotoinibição crônica (Raven 2011). Além disso, a redução no  $\Delta F/F_m'$  (figura 6.5A) e ETR (figura 6.5F) confirma o processo de fotoinibição nessas plantas, como relacionado a algumas outras espécies aquáticas submetidas à alta irradiância (Raven 2011). Conseqüentemente, as plantas de *I. alpinus* localizadas em regiões mais rasas apresentaram menor rendimento máximo de fluorescência e maior saturação de luz do que as plantas profundas. Hawes e colaboradores (2003) também constataram que a irradiância foi o fator determinante para o rendimento quântico do  $FsII$ , independentemente da profundidade ou da posição da planta no lago.

Embora a área foliar não tenha sido alterada (figura 6.5D) pela AI, o comprimento (figura 6.5B) e o número de folhas (figura 6.5C) foram reduzidos em aproximadamente 30 % e 70 %, respectivamente. Plantas cultivadas sob condição de AI produziram ainda folhas cloróticas que foram perdidas e substituídas por novas folhas durante o experimento. A massa das partes aérea, fresca e seca também foi significativamente reduzida (Santos et al. 2022). Plantas naturalmente submersas apresentam menor massa seca foliar por unidade de área combinada com parede celular menor e cutícula mais fina para facilitar as trocas gasosas em um ambiente caracterizado por pouca luz e menor necessidade de investimento em suporte (Poorter et al. 2009). Assim, macrófitas submersas investem em mudanças morfológicas, bioquímicas e fotossintéticas como estratégia para tolerar mudanças significativas na intensidade luminosa (Chappuis et al. 2015, Arthaud et al. 2021). A redução da parte aérea de *I. cangae* exposta a AI parece atuar como uma estratégia de sobrevivência ao estresse causado pelo excesso de luz.

Além das alterações morfofisiológicas, as plantas de *I. cangae*, na condição controle, geraram um total de 23 esporófitos durante o experimento, enquanto na condição de alta radiância, apenas um esporófito foi observado. A variação dos níveis de luz ao longo das estações também alterou as características reprodutivas de algumas macrófitas submersas (Li et al. 2019), mas os efeitos da disponibilidade de luz na reprodução de licófitas submersas ainda são pouco caracterizados. Curiosamente, como a reprodução de *I. cangae* ocorre exclusivamente por germinação de esporos (Caldeira et al. 2019), e a maturação dos esporófitos está associada a estações separadas pelo regime hidrológico do Lago do Amendoim, variações na intensidade e na qualidade da irradiação luminosa causadas por flutuações no nível da água parecem ser um sinal ambiental essencial na modulação do desenvolvimento reprodutivo de *I. cangae*.

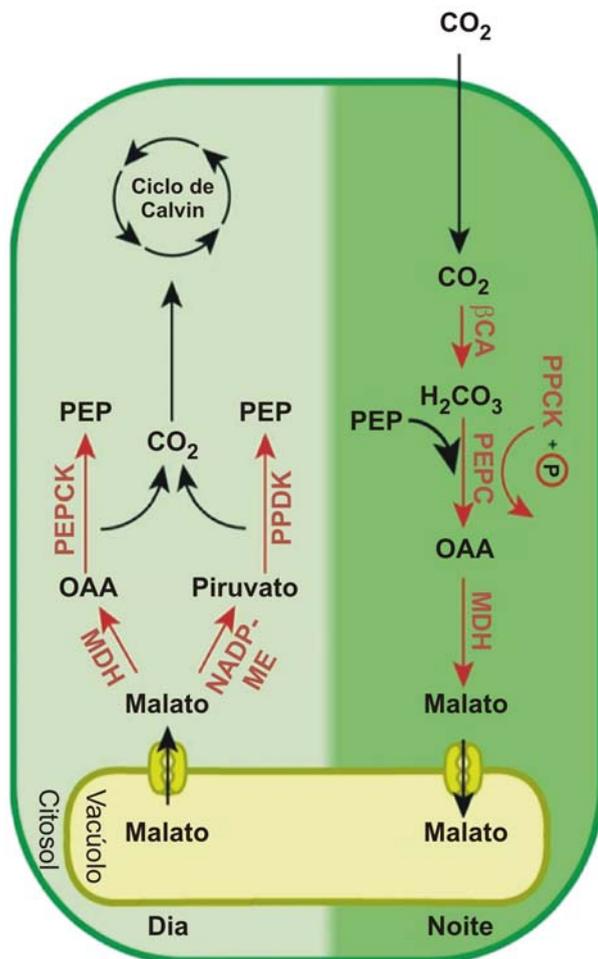
Até onde sabemos, não há estudos sobre a variação da irradiância luminosa e o crescimento de *Isoëtes* em regiões tropicais. Trabalhos de quase 30 anos atrás apresentaram a análise dos efeitos da irradiância em um lago norueguês que indicou que a sobrevivência da espécie submersa *I. lacustris* dependia da incidência de luz, uma vez que a mortalidade foi significativamente maior em plantas submetidas a regimes de irradiância insuficientes em profundidades superiores a 3 m (Rorslett e Johansen 1995). Outro estudo realizado em lagos não tropicais mostrou que *Isoëtes* apresentaram limites de profundidade mais rasos, indicando maior necessidade de luz quando comparados a outros grupos de macrófitas de água doce (Middelboe e Markager 1997). Nosso grupo de pesquisa é pioneiro na avaliação da qua-

lidade da luz sobre a fotossíntese em *I. cangae*, demonstrando que a espécie é afetada por alta irradiância (Santos et al. 2022). Embora existam espécies de *Isoetes* com diferentes necessidades de luz, *I. cangae* parece ser tolerante à sombra devido ao seu hábitat em profundidades de cerca de 1,5 m, onde a irradiância de luz é baixa. Além disso, a análise do espectro de irradiância subaquática do Lago do Amendoim foi útil para o desenvolvimento de técnicas e ferramentas que mimetizam o ambiente natural da espécie e favorecem o cultivo *ex situ* de *I. cangae*, essencial para o manejo e a conservação.

Em termos gerais, podemos concluir que a espécie *I. cangae* apresenta uma grande plasticidade fotossintética, e que tanto a quantidade quanto a qualidade de luz ideais para cultivo da espécie estão em uma faixa menor do que  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

#### 6.4 Metabolismo do Carbono de *Isoetes cangae*

Por tratar-se de uma espécie descoberta recentemente (Pereira et al. 2016), boa parte das inferências sobre *I. cangae* são realizadas com base no conhecimento de outras espécies (Keeley e Busch 1984). No ambiente subaquático, espécies de *Isoetes* têm apresentado a capacidade de conduzir o “metabolismo ácido das crassuláceas” (MAC ou CAM, da sigla em inglês), um mecanismo de concentração de carbono que envolve a separação da absorção e fixação de carbono de acordo com o tempo: à noite o carbono é sequestrado como malato para ser utilizado no ciclo de Calvin durante o dia (figura 6.7).



**Figura 6.7** O metabolismo ácido das crassuláceas (MAC) com reações importantes e suas enzimas apresentadas em vermelho. A parte da esquerda do esquema representa a separação do metabolismo durante o dia com a utilização do malato, e a parte da esquerda indica a separação do metabolismo durante a noite e o acúmulo de malato no vacúolo vegetal. À noite, o CO<sub>2</sub> oriundo da respiração e do ambiente é fixado via enzima anidrase β-carbônica (β-CA) para HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>; com subsequente carboxilação do fosfoenolpiruvato (PEP) catalisado pela PEPC. A enzima malato desidrogenase (MDH) catalisa a redução do ácido orgânico ácido oxalacético (OAA) a malato. O malato é então transportado para o vacúolo durante a noite com auxílio da enzima V-ATPase (ver figura 6.5). Durante o dia, o malato é descarboxilado pela enzima málica dependente de NADP (NADP-ME), gerando NADP, piruvato e CO<sub>2</sub> ou a enzima MDH converte malato a OAA, e subsequentemente é convertido a PEP pelo fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). No cloroplasto, piruvato, CO<sub>2</sub> são utilizados para a síntese de carboidratos.

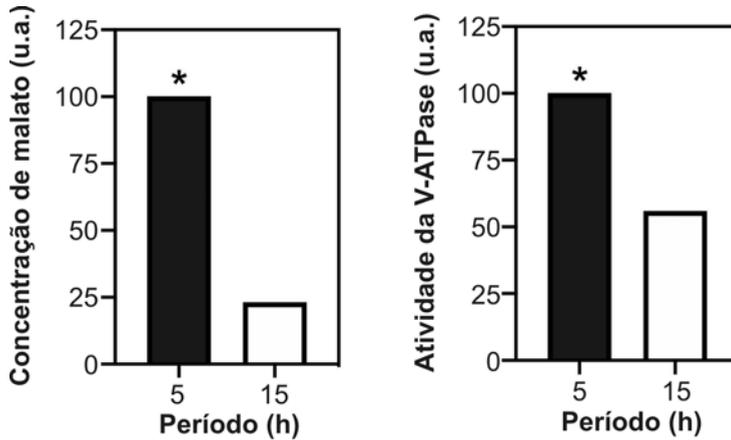
Fonte: Adaptado de Wickell et al. (2021).

O MAC é um tipo de metabolismo de carbono muito comum em plantas de deserto que enfrentam desafios para absorver o  $\text{CO}_2$  atmosférico durante os dias quentes e secos (Lüttge 2003). Plantas aquáticas enfrentam escassez de carbono por outros motivos. Elas também podem enfrentar a escassez de  $\text{CO}_2$  devido ao balanço de  $\text{CO}_2$  livre na água promovido pela fotossíntese e respiração de organismos fotossintetizantes durante o dia (Keeley 1983). O MAC é uma estratégia comum para melhorar a eficiência do uso da água, permitindo que mantenham seus estômatos fechados durante o dia, evitando desidratação. No entanto, sua prevalência em espécies aquáticas de *Isoëtes* e de outras espécies destaca a utilidade do MAC na redução da fotorrespiração quando a disponibilidade de  $\text{CO}_2$  pode ser limitada. Enquanto a limitação de  $\text{CO}_2$  em plantas terrestres é causada pelo aumento da resistência estomática, em plantas aquáticas, a limitação é em grande parte o resultado da resistência à difusão relativamente alta da água combinada com uma flutuação significativa do  $\text{CO}_2$  dissolvido nos lagos oligotróficos ou alagados sazonais.

Em *Isoëtes*, é possível observar formas de metabolismo para fixação de carbono do tipo C3 ou do tipo MAC e, em alguns casos, acontecem variações entre metabolismo C3 e MAC em uma mesma planta, sendo essa mudança de metabolismo do carbono em função das características do ambiente ao qual a espécie está submetida (Yang e Liu 2016). O metabolismo C3 é reconhecido devido à produção do primeiro intermediário estável da fotossíntese de três carbonos (logo C3), o 3-fosfoglicerato. Já o metabolismo MAC, assim conhecido por ter sido descoberto em espécies da família Crassulaceae, apresenta maior eficiência da carboxilação realizada pela enzima Rubisco, tornando o processo de fixação muito mais eficiente em ambientes que apresentam restrições tanto de uso de água (como no caso de muitas Crassuláceas) quanto em ambientes em que há elevada concorrência por  $\text{CO}_2$  (como as condições de ambiente subaquático). Por esse método, com a separação temporal da absorção do  $\text{CO}_2$  da sua fixação, plantas de *Isoëtes* apresentam maior eficiência quando em condições submersas.

A hipótese de que *I. cangae* seja capaz de acumular malato durante a noite, característica relacionada ao tipo de metabolismo MAC está em estudo, e os resultados apontam para a confirmação desse tipo de metabolismo (figura 6.8). A concentração de malato é reduzida cerca de quatro vezes ao longo do dia em folhas de *I. cangae* totalmente submersas. Além disso, o acúmulo de malato observado em *I. cangae* ocorreu em concerto com a atividade de hidrólise de ATP da enzima vacuolar V-ATPase, que reduziu cerca de 80 %. Faz-se mister notar que o funcionamento do MAC tem importantes

implicações no balanço de prótons ( $H^+$ ), principalmente no período noturno (Shameer et al. 2018). O MAC apresenta uma relação causa e efeito entre a ativação do transporte de  $H^+$  e o acúmulo de malato no interior do vacúolo vegetal (Jochem e Lüttge 1987, Bremberger e Lüttge 1992).



**Figura 6.8** Acúmulo de malato (esquerda) e atividade de hidrólise de ATP da enzima V-ATPase (direita). O tecido vegetal de *I. cangae* foi coletado ao amanhecer após cerca de 12 horas de escuridão (barra preta) ou ao entardecer, após nove horas de luz (barra branca). Os dados são a média de dez réplicas biológicas. O asterisco indica diferença significativa estatisticamente pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

O fluxo de solutos através da membrana plasmática depende em grande parte da força motriz de  $H^+$  disponível. O transporte de íons em células vegetais é acionado por gradientes de prótons que mediam o transporte ativo secundário de compostos através da membrana plasmática e da endomembrana. Além disso, a regulação da acidificação endossômica é crítica para as vias endocíticas e secretoras. Para que as plantas reajam aos seus ambientes em constante mudança e, ao mesmo tempo, mantenham condições metabólicas ideais, a expressão atividade e interação das bombas que geram esses gradientes de  $H^+$  deve ser rigorosamente regulada (Crosse e Seidel 2021).

Por exemplo, as  $H^+$ -ATPases de membrana plasmática são importantes agentes moleculares que determinam e controlam a aquisição e o particionamento de nutrientes em todos os tecidos das plantas (Sondergaard 2004). As  $H^+$ -ATPases tipo V (V-ATPase) são bombas de prótons que acidificam tanto o lúmen quanto o microambiente externo de organelas em endomembranas de todas as células eucarióticas. A presença dessa enzima é essencial para a manutenção da homeostase das células; de fato, a enzi-

ma foi considerada como tendo uma função “housekeeping” (Sun-Wada e Wada 2015). A H<sup>+</sup>-PPase está distribuída em vegetais superiores, nas algas e na bactéria fotossintética *Rhodospirillum rubrum* (Rea et al. 1992), e foi descrita em protistas (Scott et al. 1998). Essa enzima tem um papel vital no metabolismo energético, pois o pirofosfato (PPi) é um composto de alta energia, é gerado por vários processos metabólicos, sendo um subproduto de várias reações, incluindo a biossíntese de macromoléculas (Buchanan et al. 2010, Fukuda 2016).

Por meio de um levantamento dos trabalhos científicos publicados com *Isoëtes*, observa-se que estudos sobre a fisiologia e a bioquímica dessa planta são ainda bastante escassos na literatura. Segundo Christiansen et al. (2017), estas espécies pertencem a um grupo de plantas aquáticas que exibem uma fisiologia resultante da adaptação a habitats oligotróficos de água doce. Os dados mais recentes relacionados a aspectos fisiológicos da *I. cangae* sobre ativação da H<sup>+</sup>-ATPase, absorção de nutrientes, modificação da fluorescência da clorofila e crescimento, tanto de espécimes oriundos do seu habitat natural quanto provenientes de sistemas de cultivo *ex situ*, foram produzidos pelo presente grupo de pesquisa (Zandonadi et al. 2020). Este corrobora com outro trabalho publicado por Yang e Liu (2015), com a espécie anfíbia *I. sinensis*, no qual os autores revelaram dados sobre o aparato fotossintético de *I. sinensis* sob condições de crescimento terrestre e submerso, identificando que, quando totalmente submersas, as plantas apresentam o MAC. Esse trabalho apresentou dados inequívocos da modulação tanto da atividade enzimática como da regulação de transcritos dos genes que codificam para as enzimas relacionadas ao MAC, tais como a V-ATPase e a Rubisco. Yang e Liu (2015) argumenta que a V-ATPase desempenha um papel fundamental no acúmulo de ácidos orgânicos nos vacúolos em células vegetais, que são energizados pela translocação de íons H<sup>+</sup> através da membrana vacuolar. Esse mecanismo permite a internalização de malato no vacúolo na ausência de luz e a posterior mobilização deste para o citosol durante o dia. A mesma dinâmica de mobilização de malato foi observada em *I. cangae*. Recentemente, as bases genéticas do MAC foram estudadas em *I. taiwanensis* por Wickell et al. (2021), demonstrando que, apesar de muitos genes do MAC exibirem padrões de expressão semelhantes aos de angiospermas terrestres, a evolução do MAC em *Isoëtes* pode ter seguido um caminho bastante diferente e comum ao grupo. Do ponto de vista prático, os resultados observados devem ser interpretados como fundamentais para o manejo de *Isoëtes* em ambientes diferentes dos originais. É importante garantir ambientes com

água com concentrações baixas de nutrientes minerais e de carbono, uma vez que esses fatores podem favorecer outras plantas menos eficientes na fixação de carbono da água. Por fim, cabe ressaltar a importância de estudos sobre a bioenergética de espécies-alvo para a conservação, pois os resultados podem ser excelentes indicadores de condições de adaptação a novos ambientes e capacidade de sobrevivência para plantas ameaçadas de extinção, como é o caso da *I. cangae*.

## 6.5 Nutrição e Desenvolvimento

O teor e a biodisponibilidade de nutrientes minerais são importantes para evitar restrições ambientais para a produtividade das plantas, e os estudos em *Isoëtes* são bastante raros. *I. cangae* apresenta elevados teores de nutrientes minerais nas folhas, principalmente Fe e Mn, em comparação com as concentrações médias de elementos minerais das plantas terrestres (Marschner 2011). Folhas de *I. lacustres* de diferentes lagos oligotróficos na Europa apresentaram uma variação de 1,8-2,6 % N e 0,02-0,26 % P (Richardson et al. 1984, Garcia e Ballesteros 1994, Christensen et al. 1998). *I. cangae* pode apresentar médias de 2,8 % N e 1,7 % P (tabela 6.1). Tanto os atributos de hábitat quanto as espécies podem explicar as diferenças no conteúdo mineral observadas para *I. cangae* e na literatura.

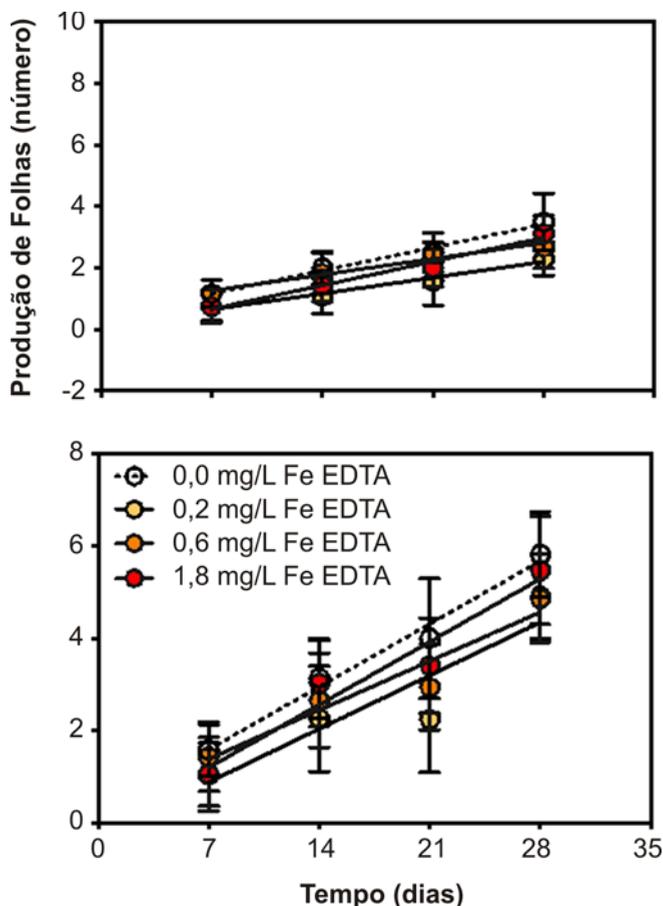
**Tabela 6.1** Concentrações médias de elementos minerais em folhas de *I. cangae* coletadas *in situ*. Os valores são médias  $\pm$  desvio-padrão

Elemento	Concentração na folha (g Kg <sup>-1</sup> )
N	28,1 $\pm$ 4,9
K	15,1 $\pm$ 7,2
P	1,7 $\pm$ 0,4
Mg	1,6 $\pm$ 0,4
Ca	2,6 $\pm$ 0,8
S	2,7 $\pm$ 0,1
Fe	18,8 $\pm$ 9,1
Mn	0,10 $\pm$ 0,03
Zn	0,03 $\pm$ 0,01
Cu	0,01 $\pm$ 0,00

Fonte: Adaptado de Zandonadi et al. (2020).

As características da água e do sedimento são um ponto de partida crítico para a manutenção *ex situ* de espécies endêmicas raras. Plantas de *Isoëtes* podem influenciar tanto o potencial redox quanto a biogeoquímica na rizosfera (Christiansen et al. 1998; Christiansen et al. 2017, Pedersen et al. 2011). O baixo pH do sedimento aumenta a biodisponibilidade de Fe para a maioria das espécies e para *Isoëtes* (Jackson et al. 1993). As concentrações de ferro no tecido foliar de 18,81 g Kg<sup>-1</sup> em *I. cangae*, em contraste com *I. anatolica* de lagoas sazonais da Turquia, que acumula 0,43 g Kg<sup>-1</sup> de Fe (Ozyigit et al. 2013). Dados de teor de ferro em folhas de *Isoëtes* são raros, apesar do progresso na pesquisa de formação de placas de ferro na rizosfera de plantas (Christensen et al. 1998). Outras espécies como plantas aquáticas de lentilha de *Spirodela polyrrhiza* podem acumular 6,84 g Kg<sup>-1</sup> de Fe (Xing et al. 2009). O girassol (*Asteraceae Carthamus oxyacantha*) pode acumular surpreendentes 73,91 g Kg<sup>-1</sup> de Fe em suas folhas (Nematian e Kazemeini 2013).

A exposição ao excesso de ferro (Fe-EDTA) já foi utilizada para determinar a capacidade de fitorremediação do ferro de outras espécies vegetais (Santana et al. 2014). Como *I. cangae* está presente em um substrato rico em ferro, é intuitivo testar concentrações crescentes desse elemento (figura 6.9). Os resultados das pesquisas com *I. cangae* mostraram que o aumento do ferro solúvel no meio de cultivo *Isoëtes* pode aumentar a produção de folhas. Além disso, *I. cangae* pode alcalinizar a rizosfera, sugerindo um controle ativo que poderia afetar a disponibilidade de Fe<sup>2+</sup>.



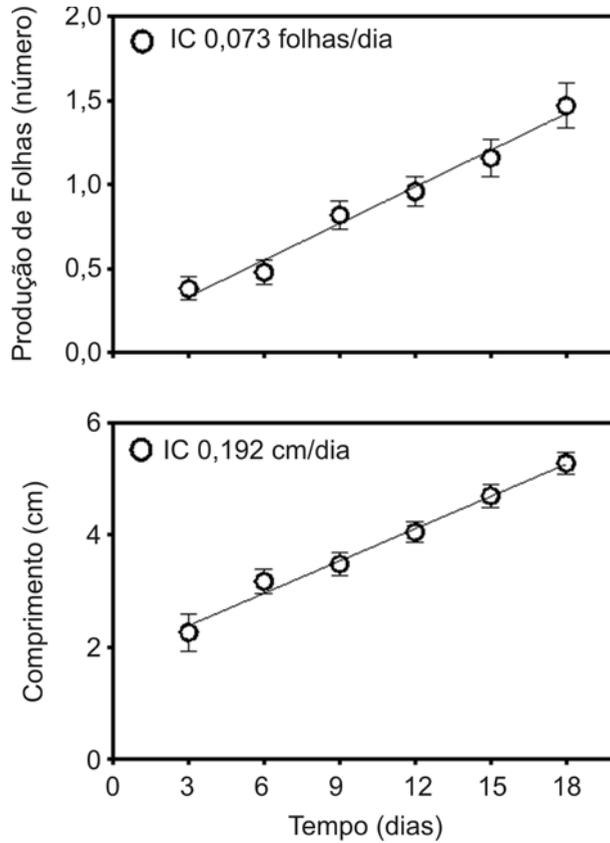
**Figura 6.9** Produção de folhas (acima) e crescimento (abaixo) de *I. cangae* (esquerda) em função do aumento da concentração de ferro (Fe-EDTA 0,2; 0,6 e 1,8 mg L<sup>-1</sup>); quadrados brancos para plantas de controle (Fe-EDTA 0,0 mg L<sup>-1</sup>). Os pontos são as médias, e as barras são intervalos de confiança (n = 12 em cada experimento).

Fonte: Adaptado de Zandonadi et al. (2020).

Com base nas análises de água, podemos observar que o lago em que ela é encontrada possui baixa concentração de nutrientes. Podemos inferir que essa planta é pouco exigente em termos de macro e micronutrientes dissolvidos na água, sendo seu cultivo *ex situ* de fácil manejo nutricional. Por outro lado, a quantidade de alguns elementos, tais como o ferro e o manganês, está em elevada concentração no sedimento. Neste momento, não sabemos com exatidão sobre as necessidades nutricionais dessa planta, nem sobre quanto tempo é necessário para a reposição de nutrientes no meio aquático. No

entanto, observamos que as plantas mantidas por mais de seis meses sem a troca de substrato ou suplementação de nutrientes solúveis, diretamente na água, conseguem tanto sobreviver quanto se reproduzir. Da mesma forma, observamos que plantas mantidas somente em areia sobreviveram por pelo menos seis meses, mesmo não mantendo as características fisiológicas, apresentando menores número e comprimento de folhas e massa reduzida. Portanto, as trocas de substrato e a reposição por meio de solução nutritiva, de forma espaçada, são capazes de manter a planta saudável e com desenvolvimento pleno. Em paralelo, temos trabalhos em andamento sobre a influência de hormônios, bem como a concentração nutricional ótima, que, em conjunto, sejam capazes de otimizar o crescimento e a reprodução de *I. cangae*, facilitando o seu cultivo *ex situ*.

A abordagem direta sobre a fisiologia de *I. cangae* é fundamental para o entendimento dos seus padrões de crescimento e desenvolvimento no seu próprio ambiente e em outros locais com potencial de introdução ou cultivo *ex situ*. Os avanços realizados no conhecimento da capacidade de crescimento, rebrota, tolerância a concentrações elevadas de Fe e fotossíntese foram abordados pelo nosso grupo de pesquisa recentemente (Zandonadi et al. 2020). Desta forma, avanços importantes para o conhecimento do crescimento *ex situ* da espécie têm sido alcançados. O estabelecimento da taxa de crescimento (0,2 cm/dia) e rebrota (0,07 folhas/dia) de *I. cangae ex situ* por exemplo é um dado essencial para o entendimento do desenvolvimento da espécie (figura 6.10).



**Figura 6.10** Produção de folhas (acima) e crescimento (abaixo) ao longo do tempo de *I. cangae* cultivados *ex situ*. Os pontos representam a média de seis amostras independentes, e as barras são os erros-padrão. As taxas significativas de produção e crescimento de folhas, respectivamente, estão presentes na parte superior no interior de cada figura.

Fonte: Adaptado de Zandonadi et al. (2020).

O aumento do comprimento foliar na taxa apresentada é bastante rápido e parece estar relacionado com um mecanismo clássico de ativação enzimática e ação hormonal que resulta na acidificação das paredes das células das folhas em expansão. Esse mecanismo é conhecido como “teoria do crescimento ácido” (Li et al. 2021). A teoria do crescimento ácido sugere que o pH apoplástico regula diretamente o crescimento celular via ativação da enzima  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática, via ação hormonal das auxinas. A acidificação do apoplasto ativa as enzimas expansinas dependentes do pH que afrouxam a parede celular rígida, assim permitindo a expansão celular. Simultaneamente, o transporte de  $H^+$  para o apoplasto gera um maior poten-

cial de membrana que impulsiona o influxo de íons secundários, levando a um aumento na pressão de turgor. As folhas de *I. cangae* em plena expansão apresentam a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase esperada em consonância com a teoria descrita (Zandonadi et al. 2020).

## 6.6 Considerações Finais

Podemos concluir que, com base nos estudos apresentados neste capítulo, *I. cangae* é uma planta com grande plasticidade fisiológica, capaz de resistir às variações ambientais e sobreviver à alta irradiância, por longos períodos, entretanto, demonstra fotoinibição e conseqüente redução do crescimento e produção de novos indivíduos.

As análises do espectro luminoso do ambiente natural mostram diferenças do cultivo *ex situ* principalmente em relação às condições de alta irradiância, o que comprova junto aos resultados biométricos que essa espécie tem preferência por viver em ambientes de baixa irradiância.

Nossas análises mostram que o metabolismo de carbono da espécie é do tipo metabolismo ácido das crassuláceas (MAC), o que é esperado para uma planta subaquática do gênero *Isoëtes*. Esse metabolismo permite a absorção de carbono no período noturno, que é acumulado como ácido málico que, durante o período do dia, é metabolizado. Em ambientes oligotróficos, em que há pouca disponibilidade de carbono, o metabolismo MAC garante uma vantagem adaptativa para a planta.

Os primeiros estudos de campo e *ex situ* mostram que *I. cangae* é uma espécie com baixas necessidades nutricionais, sobrevivendo em condições de pouca ou nenhuma nutrição por meses, possivelmente em função dos estoques de amido presente no cormo. As análises de crescimento *ex situ* mostram grande capacidade de rebrota e produção de novas folhas que foram associadas à grande atividade da enzima H<sup>+</sup>-ATPase de membrana.

Novos estudos sobre crescimento, efeitos de hormônios e condições ótimas de nutrição para manter o crescimento e a reprodução dessa espécie poderão contribuir ainda para o conhecimento e a preservação de *Isoëtes*.

## Referências

Abeli, T. et al. 2018. A gleam of hope for the critically endangered *Isoëtes malinverniana*: Use of small-scale translocations to guide conservation planning. – *Aquat Conserv* 28: 501-505.

- Bremberger, C. e Lüttge, U. 1992. Dynamics of tonoplast proton pumps and other tonoplast proteins of *Mesembryanthemum crystallinum* L. during the induction of Crassulacean acid metabolism. – *Planta* 188: 575-580.
- Caldeira, C. F. et al. 2019. Sporeling regeneration and *ex situ* growth of *Isoëtes cangae* (Isoetaceae): Initial steps towards the conservation of a rare Amazonian quillwort. – *Aquat Bot* 152: 51-58.
- Christiansen, N. H. et al. 2017. Uptake of inorganic phosphorus by the aquatic plant *Isoëtes australis* inhabiting oligotrophic vernal rock pools. – *Aquat Bot* 138: 64-73.
- Cosse, M. e Seidel, T. 2021. Plant proton pumps and cytosolic pH-homeostasis. – *Front Plant Sci* 12: 672873.
- Durako, M. J. 2012. Using PAM fluorometry for landscape-level assessment of *Thalassia testudinum*: Can diurnal variation in photochemical efficiency be used as an ecoindicator of seagrass health? – *Ecol Indic* 18: 243-251.
- Gacia, E. e Ballesteros, E. 1994. Production of *Isoëtes lacustris* in a Pyrenean Lake: seasonality and ecological factors involved in the growing period. – *Aquat Bot* 48: 77-89.
- Genty, B. et al. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. – *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 990: 87-92.
- Hawes, I. et al. 2003. The use of pulse amplitude modulated fluorometry to determine fine-scale temporal and spatial variation of *in situ* photosynthetic activity within an *Isoëtes*-dominated canopy. – *Aquat Bot* 77: 1-15.
- Jackson, L. J. et al. 1993. Sediment pH and redox potential affect the bioavailability of Al, Cu, Fe, Mn, and Zn to rooted aquatic macrophytes. – *Can J Fish Aquat Sci* 50: 143-148.
- Jochem, P. e Lüttge, U. 1987. Proton transporting enzymes at the tonoplast of leaf cells of the CAM plant *Kalanchoë daigremontiana*. I. The ATPase. – *J Plant Physiol* 129: 251-268.
- Keeley, J. E. 1983. Crassulacean acid metabolism in the seasonally submerged aquatic *Isoëtes howellii*. – *Oecologia* 58: 57-62.
- Keeley, J. E. e Busch, G. 1984. Carbon assimilation characteristics of the aquatic CAM plant, *Isoëtes howellii*. – *Plant Physiol* 76: 525-530.

- Li, L. et al. 2022. Bending to auxin: fast acid growth for tropisms. – Trends Plant Sci 27: 440-449.
- Lüttge, U. 2003. Photosynthesis: CAM plants. In: Thomas B, Murphy D, Murphy B, eds. Encyclopedia of applied plant sciences Oxford: Academic Press, 688-705.
- Markwell, J. et al. 1995. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. – Photosynth Res 46: 467-472.
- Maxwell, K. e Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. – J Exp Bot 51: 659-668.
- Müller, M. e Munné-Bosch, S. 2021. Hormonal impact on photosynthesis and photoprotection in plants. – Plant Physiol 185: 1500-1522.
- Nematian, M. A. e Kazemeini, F. 2013. Accumulation of Pb, Zn, Cu and Fe in plants and hyperaccumulator choice in Galali iron mine area, Iran. – Int J Agric Sci 5: 426-432.
- Ozyigit, I. et al. 2013. Mineral element uptake status of endemic *Isoëtes anatolica prada & rolleri* populations from Bolu-Turkey. – Pak J Bot 45: 515-519.
- Pedersen, O. et al. 2011. *In situ* O<sub>2</sub> dynamics in submerged *Isoëtes australis*: varied leaf gas permeability influences underwater photosynthesis and internal O<sub>2</sub>. – J Exp Bot 62: 4691-4700.
- Pereira, J. B. D. S. et al. 2016. Two new species of *Isoëtes* (Isoetaceae) from northern Brazil. – Phytotaxa 272: 141-148.
- Pereira, J. B. S. et al. 2017. Origin and biogeography of the ancient genus *Isoëtes* with focus on the Neotropics. – Bot J Linn Soc 185: 253-271.
- Richardson, K. et al. 1984. Inorganic carbon assimilation in the Isoetids, *Isoëtes lacustris* L. and *Lobelia dortmanna* L. – Oecologia 61: 115-121.
- Santana, B. V. N. et al. 2014. Leaf morphoanatomy of species tolerant to excess iron and evaluation of their phytoextraction potential. – Environ Sci Pollut Res 21: 2550-2562.
- Santos, M. P. et al. 2020. The genetic diversity and population structure of two endemic Amazonian quillwort (*Isoëtes* L.) species. – PeerJ 8: e10274.
- Sun-Wada, G.-H. e Wada, Y. 2015. Role of vacuolar-type proton ATPase in signal transduction. – Biochim Biophys Acta Bioenerg 1847: 1166-1172.

- Shameer, S. et al. 2018. Computational analysis of the productivity potential of CAM. – Nat Plants 4: 165-171.
- van Kleunen, M. 2014. Conservation physiology of plants. – Conserv Physiol 2: cou007.
- Wickell, D. et al. 2021. Underwater CAM photosynthesis elucidated by *Isoëtes* genome. – Nat Commun 12: 6348.
- Wikelski, M. e Cooke, S. J. 2006. Conservation physiology. – Trends Ecol Evol 21: 38-46.
- Woolway, R. I. et al. 2021. Lake heatwaves under climate change. – Nature 589: 402-407.
- Yang, T. e Liu, X. 2015. Comparing photosynthetic characteristics of *Isoëtes sinensis* Palmer under submerged and terrestrial conditions. – Sci Rep 5: 17783.
- Zandonadi, D. B. et al. 2021. Ecophysiology of two endemic Amazon quillworts. – Aquat Bot 170: 103350.
- Zhao, G. et al. 2022. Evaporative water loss of 1.42 million global lakes. – Nat Commun 13: 3686.



## CAPÍTULO 7

---

---

### Cultivo e Aclimação de *Isoëtes cangae*

\* Cecílio Frois Caldeira \* Daniel Basílio Zandonadi  
\* Janielio Gonçalves da Rocha \* Mirella Pupo Santos  
\* Silvio Ramos \* Markus Gastauer

TÍTULO CURTO (*RUNNING TITLE*)

---

---

Cultivo e Aclimação de *Isoëtes cangae*

## Resumo

As espécies do gênero *Isoëtes* são normalmente adaptadas a ambientes oligotróficos, e alterações nestas condições têm levado várias espécies a entrarem na lista de ameaçadas de extinção por fragmentação e deterioração na qualidade de seu hábitat natural. Neste capítulo apresentamos uma série de estudos realizados com *I. cangae* com o objetivo de entender, seu potencial de adaptação e crescimento em diferentes condições ambientais, e eventos que provocam estresses em plantas. Avaliamos o crescimento de plantas jovens de *I. cangae* em diferentes substratos, tanto comerciais quanto oriundos de diferentes lagos da Serra dos Carajás, e observamos que essas plantas foram capazes de crescer nos diversos substratos e com habilidade de completar ciclo de vida (produção de estruturas reprodutivas) em todos. Todavia, vale destacar o melhor desempenho das plantas nos substratos oriundos de lagos de Carajás, como o elevado crescimento e a produção de estruturas reprodutivas das plantas em substrato de um lago temporário. Observamos também que *I. cangae* possui a capacidade de tolerância a metais no substrato, sendo capaz de acumular grandes quantidades de elementos, tais como ferro em concentrações tóxicas para grande parte das plantas. De forma similar, avaliações de tolerância a altas temperaturas e a restrições hídricas também sugerem elevada tolerância a essas condições estressantes. Nelas, foram verificadas diferentes estratégias adaptativas, as quais incluem desde a manutenção da capacidade fotossintética em altas temperaturas, tolerância à redução de lâmina de água sobre as plantas, à recuperação do crescimento após eventos de *deficit* hídrico acentuado. Em geral, estes estudos sugerem que *I. cangae* possui elevada tolerância a diferentes fatores estressantes e, portanto, elevado potencial de adequação e crescimento em outros ambientes, além de seu hábitat de origem, que é o Lago do Amendoim.

**Palavras-chave:** propagação; substratos; temperatura; restrição hídrica.

## 7.1 Introdução

As plantas são frequentemente expostas a restrições ambientais que afetam de forma adversa o crescimento e o desenvolvimento. O estresse ambiental pode ser biótico, imposto por outros organismos, ou abiótico, decorrente de um excesso ou falta de condições ideais no ambiente físico ou químico. As condições ambientais que causam danos às plantas incluem alagamentos, secas, temperaturas altas ou baixas, salinidade excessiva do solo, nutrientes minerais inadequados e luz excessiva ou insuficiente.

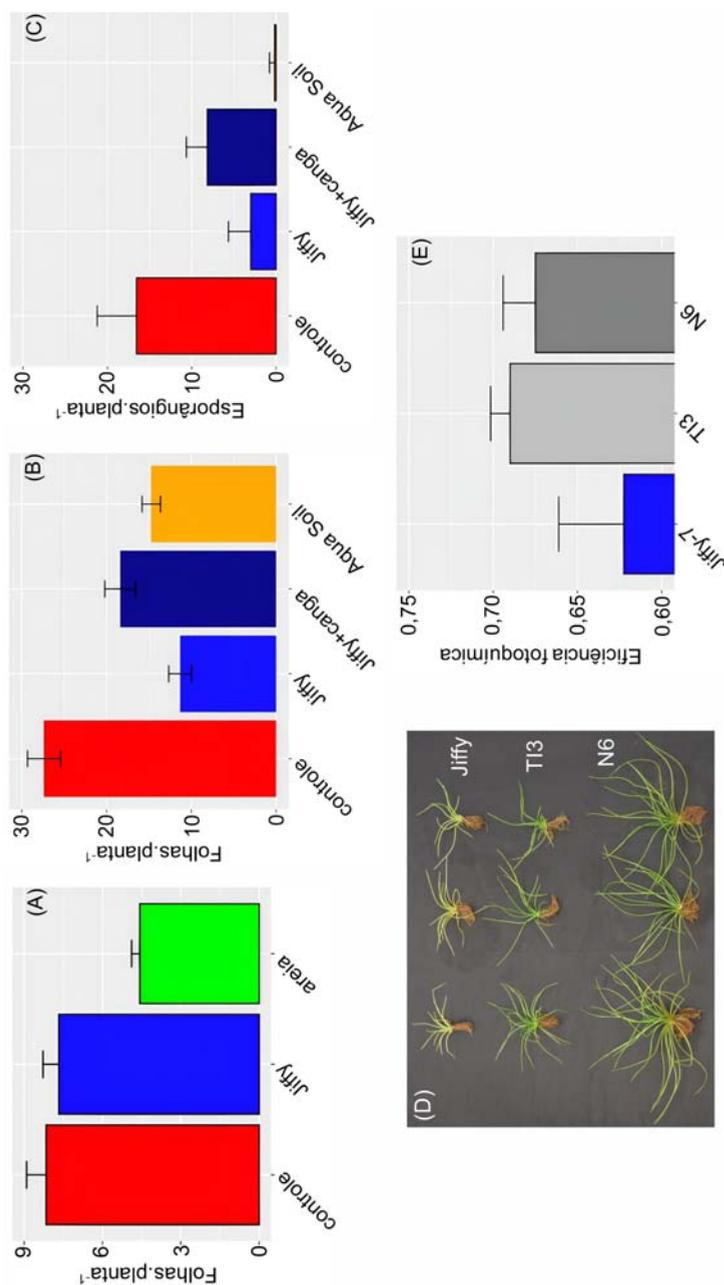
Espécies do gênero *Isoëtes* são normalmente adaptadas a ambientes oligotróficos, ou seja, ambiente com baixa disponibilidade de nutrientes minerais, portanto, alterações na qualidade da água de seus habitats são reconhecidas por representar a maior ameaça para estas espécies. Alterações nas condições ambientais e a consequente perda de qualidade de habitat têm levado muitas das espécies de *Isoëtes* a entrarem na lista de ameaçadas de extinção. A redução em populações naturais das espécies *Isoëtes lacustris* e *Isoëtes echinospora* tem sido observada devido à acidificação de lagos (Arts 1988, Vrba et al. 2003), assim como a redução da área de ocorrência por campos agrícolas e a eutrofização da água para *Isoëtes coreana* (Kim et al. 2008), *Isoëtes hypsophila*, *Isoëtes sinensis*, *Isoëtes yunguiensis* e *Isoëtes taiwanensis* (Liu et al. 2005) e *Isoëtes malinverniana* (Barni et al. 2013). Alterações no ciclo hidrológico e redução de área de ocorrência natural por atividades antrópicas também representam ameaças a espécies, tais como *I. serracarajensis* e *I. cangae* (Pereira et al. 2016).

O cultivo *ex situ* de espécies ameaçadas de extinção é uma das formas de subsídio a programas de conservação, pois, além de manutenção de genótipos que podem assegurar a diversidade genética natural da espécie em ambiente seguro, também pode servir de fonte de plantas para estudos e enriquecimento de populações naturais ou mesmo para a introdução em novos ambientes. Após o sucesso no estabelecimento de formas de propagação e produção de mudas em larga escala para *I. cangae* (Caldeira et al. 2019), o cultivo *ex situ* desta espécie e a avaliação do potencial adaptativo a ambientes diferentes do local de ocorrência natural (Lago do Amendoim) consiste na etapa do manejo visando à conservação da espécie. A avaliação da capacidade de crescimento e desenvolvimento em diferentes condições ambientais, de estudos que incluem ambientes controlados e ambientes naturais fornece subsídios fundamentais para a seleção de locais com maior potencial de sucesso para o estabelecimento da espécie.

## 7.2 O Cultivo em Diferentes Substratos

A determinação de substrato adequado para o cultivo de plantas é fundamental e pode variar segundo a demanda de cada espécie. O local de ocorrência natural de *Isoëtes cangae*, Lago do Amendoim, possui características oligotróficas, podendo chegar a ultraoligotróficas em determinados períodos do ano (Sahoo et al. 2016). Desta forma, espera-se que essa espécie esteja bem adaptada a condições de baixa disponibilidade de nutrientes. Como são raros os corpos de água (lagos, lagoas, represas, etc.) que possuem a capacidade de manutenção de características oligotróficas e que estariam aptos para introdução e conservação de *I. cangae* a longo prazo, estudamos, em uma série de ensaios, o crescimento e o desenvolvimento do espécime em substratos com diferentes características, com o objetivo de entender o potencial de adaptação a outros ambientes além do Lago do Amendoim. Além disso, esses estudos também permitem a otimização do cultivo da espécie em condições controladas, favorecendo a melhoria no processo de propagação, a geração de novos indivíduos e a manutenção de matrizes em cultivo protegido.

Com o objetivo de avaliar o crescimento inicial de *I. cangae* em ambiente controlado, foi realizado um estudo de cultivo com três substratos, sendo os sedimentos do Lago do Amendoim como controle, o substrato orgânico comercial comumente usado para cultivo de plantas (Jiffy-7<sup>®</sup>, pH mais elevado, rico em matéria orgânica e nutrientes, tais como P, Ca, Mg e Zn) e areia quartzosa estéril. Nesse estudo, esporófitos de *I. cangae* recém-germinados foram fixados sobre uma camada desses substratos (~150 mL) e cobertos com água destilada até completar o volume de 500 mL. Após seis meses de cultivo, não foram observadas diferenças significativas de crescimento dos esporófitos em Jiffy-7<sup>®</sup> e nos sedimentos do Lago do Amendoim; no entanto, aqueles mantidos em areia quartzosa tiveram crescimento muito inferior (figura 7.1A). Sendo o crescimento inicial uma das etapas de maior fragilidade, os primeiros resultados apontam para o potencial de cultivo *ex situ* de *I. cangae* e sugerem que a espécie pode crescer e prosperar em ambientes além do Lago do Amendoim. Além disso, a manutenção de esporófitos viáveis em areia e água destilada por seis meses evidencia o preparo da espécie para sobrevivência em condições adversas, mesmo em fase juvenil, possivelmente em função das reservas de amido encontradas no cormo.



**Figura 7.1** Cultivo de *Isoëtes cangae* em diferentes substratos. (A) Número de folhas de plantas cultivadas por seis meses em sedimentos do Lago do Amendoim (controle), substrato orgânico comercial (Jiffy®) e areia quartzosa estéril. (B) Número de folhas. (C) Esporângios de plantas cultivadas por 12 meses em sedimentos do Lago do Amendoim (controle), Jiffy, a mistura de Jiffy com sedimentos de canga, substrato empregado para aquarismo (Aqua Soil®, Amazon). (D) Detalhes de raízes e folhas. (E) Rendimento quântico de plantas cultivadas por 12 meses em Jiffy e em substratos dos lagos de Carajás: T13 – corpo C do complexo de lagos Três Irmãs na Serra Sul, e N6 – lago temporário do corpo de canga N6 na Serra Norte. As barras representam os valores médios seguidos pelo desvio-padrão.

Após o estudo de crescimento inicial, avaliamos o desenvolvimento de *I. cangae* por 12 meses em quatro substratos, incluindo os substratos anteriores (exceto areia), uma mistura de Jiffy-7® e um substrato amplamente empregado em aquarismo (Aqua Soil®, Amazon). Os esporófitos mantidos nos sedimentos do Lago do Amendoim apresentaram o maior crescimento e produziram mais esporângios. No entanto, apesar do menor crescimento, as plantas mantidas nas demais condições também atingiram a fase reprodutiva e produziram esporângios (figura 7.1B-C), reforçando os resultados anteriores que apontaram o elevado potencial de adaptação dessa espécie.

Em outro estudo de cultivo *ex situ*, utilizamos sedimentos de diferentes lagos de Carajás, incluindo o lago permanente TI3, situado no corpo C do complexo de lagos Três Irmãs (S11A) e sedimentos de um lago temporário no corpo de canga N6, na Serra Norte. A escolha desses materiais foi realizada em função de i) as características limnológicas do lago TI3 serem similares às encontradas no Lago do Amendoim; e ii) ser o lago de N6 hábitat natural da espécie *Isoëtes serracarajensis* e onde a espécie é encontrada com crescimento vigoroso. De forma similar, os esporófitos de *I. cangae* também apresentaram crescimento vigoroso no substrato N6 e iniciaram a fase reprodutiva após sete meses de cultivo nesse tratamento, diferente do observado para as demais condições, em que foram observadas após dez meses. Este tratamento também duas vezes o número de esporângios (figura 7.1D). O rendimento quântico (medida indireta da eficiência fotossintética) apresentou valores satisfatórios e sem sinais de estresse para todos os tratamentos, mas com valores superiores para as plantas cultivadas tanto TI3 quanto N6, os quais não apresentaram diferenças entre si (figura 7.1E), atestando para o bom estado de saúde das plantas quando cultivadas nos sedimentos dos lagos de Carajás. Apesar do curto período de avaliação (12 meses) para estimar a capacidade de sobrevivência a longo prazo e de o estudo ser realizado em condições controladas, esses resultados reforçam o elevado potencial adaptativo de *I. cangae* a diferentes ambientes, incluindo as encontradas nos lagos das cangas de Carajás. No entanto, vale a ressalva de *I. cangae* possuir hábitat submerso e a ausência de informações sobre a sua capacidade de adaptação à restrição hídrica.

### 7.3 Nutrientes e Metais

As espécies de *Isoëtes* são encontradas em áreas onde os substratos apresentam características físicas que variam de arenosas, com baixos teores de nutrientes e de matéria orgânica, a áreas com elevada concentração de matéria orgânica e ricas em argila (Sand-Jensen e Søndergaard 1979, Sudová et al. 2011, Yadav et al. 2015, Zandonadi et al. 2021). Portanto, os diferentes locais onde *Isoëtes* habita podem apresentar nutrientes minerais e orgânicos em variadas concentrações de acordo com o material de origem do substrato e as condições tanto climáticas como das áreas contribuintes que circundam os lagos (temporários e permanentes) e as áreas alagadas.

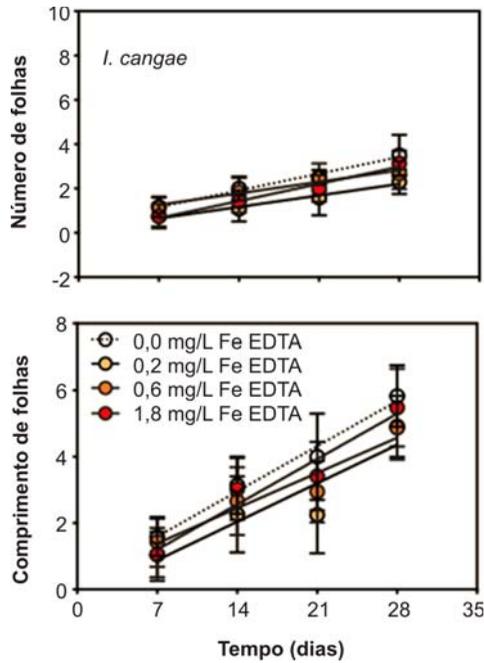
O Lago do Amendoim apresenta concentração elevada de ferro (Fe) no sedimento e na água devido aos depósitos de minério de ferro em que está inserido. Também em função do material de origem, o pH ácido do lago está relacionado com o sedimento da crosta laterítica, rica em ferro. Sedimentos de pH baixo também foram relatados para habitats de outras espécies de *Isoëtes*, como *I. dixitei* na Índia, *I. echinospora* e *I. lacustris* na República Tcheca (Sudová et al. 2011, Yadav et al. 2015).

A concentração de nutrientes minerais e a sua disponibilidade podem ser importantes para evitar restrições ambientais para a produtividade das plantas, e os estudos com *Isoëtes* ainda são restritos. *Isoëtes cangae* apresenta concentrações elevadas de minerais nas folhas, principalmente Fe e Manganês (Mn), em comparação com as concentrações médias de elementos minerais das plantas terrestres (Marschner 2011). De fato, os valores encontrados nas folhas de *I. cangae* são muito elevados (tabela 7.1, Zandonadi et al. 2021), típicos de plantas acumuladoras de metais, ou seja, plantas que possuem adaptações específicas para tolerar e crescer em ambientes restritivos. Para outros nutrientes, como nitrogênio (N) e fósforo (P), que são bastante restritos em ambientes oligotróficos, as plantas de *I. cangae* apresentam médias de 2,8 % de N e 1,7 % de P. Esses valores são mais elevados do que o normalmente observado em folhas de *I. lacustris* de diferentes lagos oligotróficos na Europa, os quais apresentam uma variação de 1,8-2,6 % N e 0,02-0,26 % P (Richardson et al. 1984, Gacia e Ballesteros 1994, Christensen et al. 1998). Tanto os atributos de habitat quanto as particularidades da espécie podem explicar as diferenças no conteúdo mineral observadas em *I. cangae*.

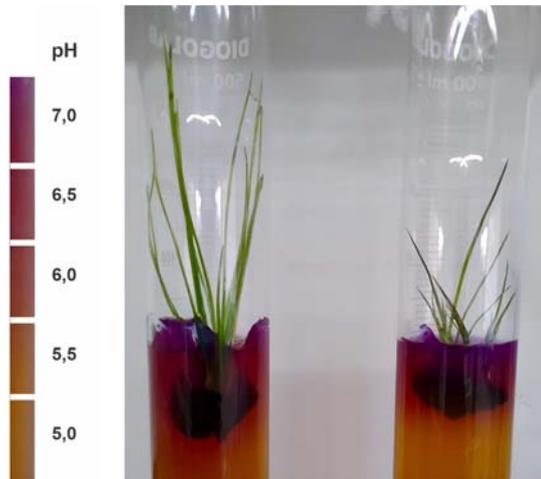
**Tabela 7.1** Composição nutricional de folhas de *Isoëtes cangae* coletadas no Lago do Amendoim, Serra dos Carajás/PA.

Elemento	Concentração na folha (g Kg <sup>-1</sup> )
N	28,1 ± 4,9
K	15,1 ± 7,2
P	1,7 ± 0,4
Mg	1,6 ± 0,4
Ca	2,6 ± 0,8
S	2,7 ± 0,1
Fe	18,8 ± 9,1
Mn	0,10 ± 0,03
Zn	0,03 ± 0,01
Cu	0,01 ± 0,00

As características químicas da água e do sedimento são um ponto de partida crítico para estabelecimento e manutenção *ex situ*, sobretudo, de espécies endêmicas e/ou raras. Espécies do gênero *Isoëtes* são conhecidas por alterarem tanto o potencial redox quanto a biogeoquímica de sua rizosfera (Christensen et al. 1998, Christiansen et al. 2017, Pedersen et al. 2011). Para *I. cangae*, o baixo pH do sedimento aumenta a biodisponibilidade de Fe. Devido à elevada disponibilidade desse nutriente no Lago do Amendoim, as concentrações de ferro no tecido foliar de *I. cangae* (18,8 g Kg<sup>-1</sup>) são geralmente muito mais elevadas do que o encontrado em outras espécies, como *I. anatolica* de lagoas sazonais da Turquia (0,43 g Kg<sup>-1</sup>; Ozyigit et al. 2013). Dados de teor de ferro em folhas de *Isoëtes* são raros, apesar do progresso na pesquisa de formação de placas de ferro na rizosfera de plantas (Christensen et al. 1998). É possível que o nível de absorção de ferro e outros metais em *I. cangae* seja diferente ao longo tanto do seu ciclo de vida quanto ao longo das mudanças sazonais do ambiente. Outras espécies de plantas aquáticas como *Spirodela polyrrhiza* podem acumular cerca de 6,84 g Kg<sup>-1</sup> de Fe (Xing et al. 2009), enquanto a espécie terrestre *Carthamus oxyacantha* pode acumular surpreendentes 73,91 g Kg<sup>-1</sup> de Fe em suas folhas (Nematian e Kazemeini 2013). Todavia, a exposição de *I. cangae* a elevadas concentrações de ferro em experimentos *ex situ* indica que o aumento do ferro solúvel no meio de cultivo *I. cangae* não inibe seu crescimento foliar (figura 7.2). Os estudos sobre os mecanismos pelos quais essa espécie lida com as altas concentrações de metais ainda precisam avançar, mas é interessante notar que *I. cangae* pode alcalinizar a rizosfera, sugerindo um controle ativo que poderia afetar a disponibilidade de Fe (II) em seu entorno (figura 7.3).



**Figura 7.2** Experimentos *ex situ* com plantas de *Isoëtes cangae* expostas a concentrações crescentes de ferro solúvel. O gráfico de cima indica a produção de novas folhas, e o de baixo indica o tamanho das folhas novas em função do ferro (FeEDTA 0,20; 0,60 e 1,80 mg L<sup>-1</sup>). Os círculos representam a média, e o desvio é o intervalo de confiança (n = 12 em cada experimento).



**Figura 7.3** Provetas contendo plantas de *Isoëtes cangae* (plantas do tubo à esquerda) e *Isoëtes serracarajensis* (plantas do tubo à direita) em meio com ágar e o indicador de pH púrpura de boromocresol.

De maneira geral, as plantas de *I. cangae* parecem ser pouco exigentes em nutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio e cálcio dissolvidos na água em seu ambiente natural e em cultivo *ex situ*. Por outro lado, a concentração de metais para o crescimento e desenvolvimento da espécie pode ser bem elevada em comparação a outras plantas, e estudos iniciais *ex situ* mostram que esses metais em grandes concentrações parecem afetar de forma positiva o crescimento e o desenvolvimento da espécie.

## 7.4 Temperatura

A temperatura é reconhecidamente um dos fatores com maior poder de influência em praticamente todos os processos fisiológicos associados ao desenvolvimento das plantas, desde a germinação, a fotossíntese, a respiração, a absorção e a perda de água ao florescimento e demais fenofases. Em *Isoëtes*, temperatura e pH têm sido propostos como as variáveis com maior impacto sobre a propagação e o crescimento (Čtvrtlíková et al. 2016, Oh et al. 2013). Um incremento de 5 % para 60 % na germinação de esporófitos de *I. lacustris* ocorreu quando a temperatura elevou de 12 °C para 17 °C (Čtvrtlíková et al. 2014). Tal influência também foi observada para *I. cangae*, com aumento do crescimento em função da variação positiva de temperatura, durante o cultivo de esporófitos em condições controladas. A elevação da temperatura no termo período (dia: noite) de 20: 20 °C para 28: 22 °C aumentou o ritmo de aparecimento de folhas e, por consequência, o número de folhas produzidas (figura 7.4, Caldeira et al. 2019).

O aumento de temperatura pode também causar danos às plantas. Em casos de temperatura muito elevada, os danos podem ser severos, levando a redução de crescimento, fortes perdas de desempenho ou produtividade. Para lidar com os efeitos adversos da temperatura elevada, determinadas espécies desenvolveram estratégias que amenizam seus efeitos negativos, que incluem a expressão de genes relacionados à resposta ao estresse térmico. Em *Isoëtes* os mecanismos de regulação/proteção estão associados ao funcionamento do sistema fotossintético, conforme apresentado no capítulo 6.

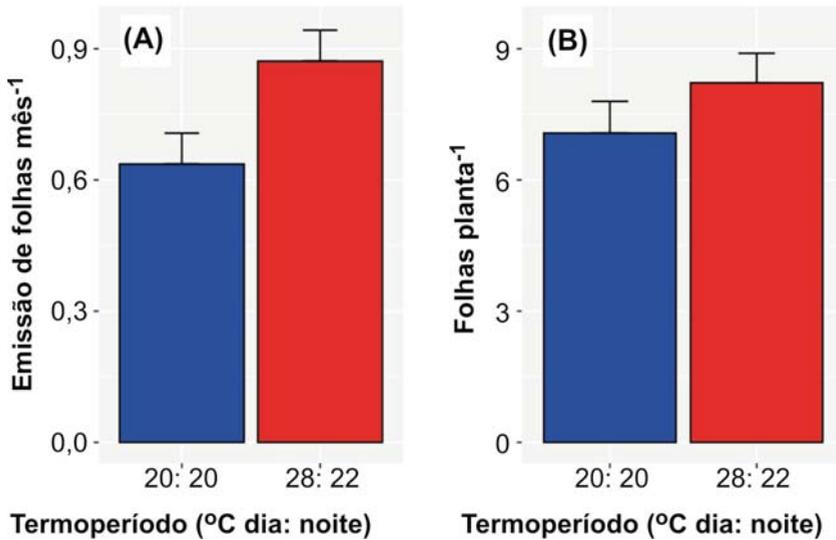


Figura 7.4 Crescimento de esporófitos de *Isoëtes cangae* em dois termoperíodos (regimes de temperatura). (A) Taxa de emissão de folhas. (B) Número total de folhas por planta após seis meses de cultivo em condições controladas. As barras representam os valores médios seguidos pelo desvio-padrão.

## 7.5 Estudos de Tolerância e Temperatura

As plantas aquáticas têm participação importante no processo de fotossíntese nos ecossistemas, e a variação de fatores ambientais, tais como radiação solar e temperatura, podem alterar o funcionamento do aparato fotossintético vegetal. Os estudos relacionados à fotossíntese em licófitas têm apresentado diferentes estratégias de regulação da fase de carboxilação da fotossíntese por esse grupo de plantas.

O entendimento da regulação das reações luminosas da fotossíntese em *Isoëtes* é reduzido e é assunto de outro capítulo deste livro (ver capítulo 5). Ao utilizar a fluorescência da clorofila a para avaliar o possível efeito da variação ambiental, por exemplo, o do aumento da temperatura, sobre a fotossíntese, foi verificado que essa espécie apresenta uma expressiva tolerância à temperatura elevada (figura 7.5). Cabe destacar que, de maneira geral, temperaturas superiores a 40 °C podem inativar o fotossistema II (*FsII*) devido principalmente a danos de espécies reativas de oxigênio produzidos durante o calor excessivo. Em *I. cangae*, estudos de resposta ao aumento de temperatura apontaram que o *FsII* dessa espécie apresenta tolerância à degradação

até em torno de 49 °C. Portanto, com valores assim elevados, as plantas dessa espécie podem ser indicadas como termotolerantes, característica essencial diante de desafios impostos no seu hábitat natural e que podem ser benéficas tanto para manutenção *ex situ* quanto para estabelecimento de outros locais além do Lago do Amendoim. Com base no exposto, destacamos que a importância das análises da fluorescência da clorofila é útil para avaliar efeitos mais intensos das variações do ambiente em relação aos fotossistemas, uma vez que estes são componentes bem estáveis.

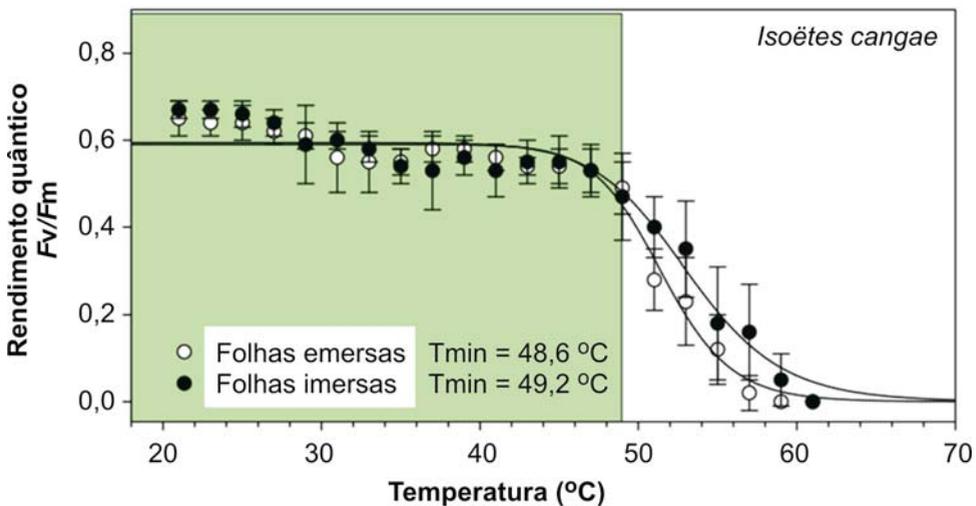


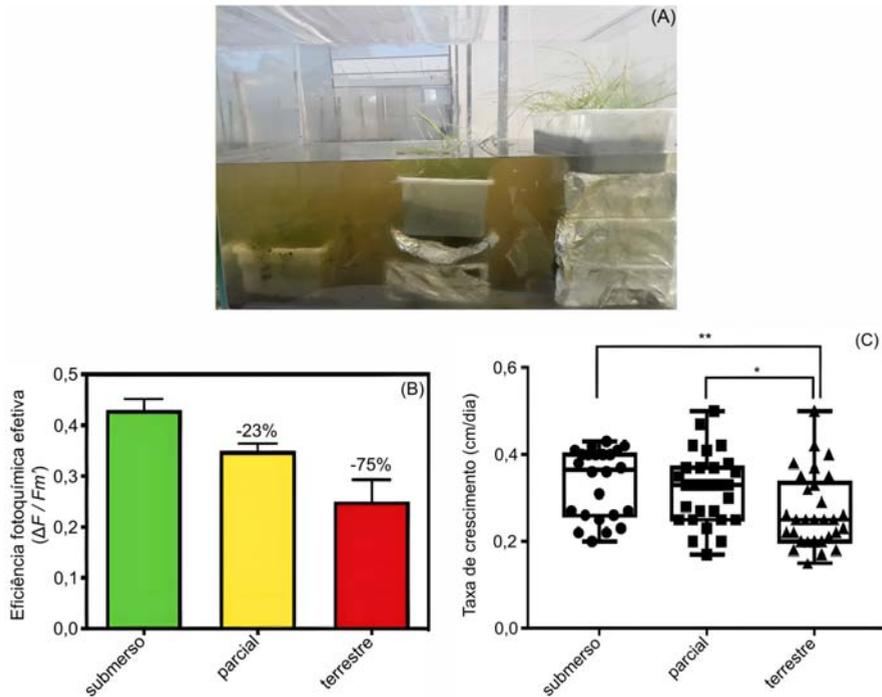
Figura 7.5 Variação da eficiência quântica do fotossistema II de *Isoëtes cangae* em relação à temperatura da água. Os fotossistemas das folhas apresentam tolerância térmica bastante expressiva tanto dentro (círculo preto) como fora da água (círculo branco).

## 7.6 Restrição Hídrica

As plantas do gênero *Isoëtes* existem desde a Era Paleozoica, provavelmente originadas entre o período devoniano e o carbonífero (entre 408 e 362 milhões de anos atrás). Desde então, ao longo do tempo, as plantas têm sido submetidas a mudanças ambientais que contribuiriam para que as espécies tenham variado de espécies aquáticas perenes até terrestres efêmeras e, portanto, apresentam adaptações relativas aos diferentes ambientes. Até o momento, o gênero ocupa uma variedade de nichos, incluindo lagos oligotróficos de água doce, pântanos de maior altitude, alagados sazonais e rios. A espécie *I. cangae* foi originalmente descrita como uma planta aquática

totalmente submersa (Pereira et al. 2016), e que possui um conjunto de adaptações que facilitam a absorção de carbono inorgânico, uma vez que a aquisição de carbono para a fotossíntese em baixo d'água é fortemente impedida pela lenta difusão de gases na água em comparação com o ar. Os bolsões de ar (aerênquimas) que estão em todo o corpo da planta permitem que as trocas gasosas ocorram de forma eficiente e que essas trocas possivelmente aconteçam somente na região radicular.

Para compreender como mudanças ambientais, como as estiagens, que alteram a coluna de água poderiam afetar a fisiologia de *I. cangae*, uma série de estudos foi realizada, avaliando níveis variados de estresse por meio de redução de lâmina d'água sobre as plantas (figura 7.6A). Nos ensaios de variação do nível da água e da exposição rápida de folhas, plantas de *I. cangae* apresentaram pouca variação da eficiência fotoquímica efetiva ( $F/F_m'$ ) em relação à condição totalmente submersa (figura 7.6B). Valores entre 0,2 e 0,8 já foram observados em *Isoëtes alpinus* em profundidades que variam de 3 a 7 metros (Hawes et al. 2003), de forma que os valores observados em *I. cangae* estão dentro da variação já observada para congêneres. No entanto, a redução da lâmina de água e exposição parcial das folhas levou a uma redução do rendimento quântico efetivo do fotossistema II ( $\Delta F/F_m'$ ) em 23 %. Queda ainda mais acentuada desse rendimento foi observada quando as folhas foram totalmente expostas, havendo perda de aproximadamente 75 % do valor de referência (0,43), ou seja, expostas a condições "terrestres", levaram a um forte estresse ao aparato fotossintético de *I. cangae* (figura 7.6B). Entretanto, estudos em andamento mostram que durante a exposição gradual das folhas ao ambiente terrestre e por longo tempo (seis meses a um ano) as características da fluorescência da clorofila não diferem das plantas mantidas submersas, mostrando grande plasticidade fotossintética da espécie ao novo ambiente.



**Figura 7.6** Ensaio de dessecação de plantas de *Isoëtes cangae* com diferentes lâminas de água sobre as plantas (variação do nível da água por 72 h). (A) Detalhes das plantas em um dos dois ensaios independentes em que o crescimento das plantas e variáveis fisiológicas foram monitorados durante o dessecação e a reidratação. (B) Eficiência fotoquímica  $F/F_m$  (Eficiência do Fotossistema 2 – PSII) de plantas de *Isoëtes cangae* antes e após a redução do nível da lâmina d’água por 72 h. As condições testadas foram totalmente submersas, parcialmente submersas e totalmente emersas (condição “terrestre”). A barra de erro representa o intervalo de confiança a 95 %. (C) Taxa de crescimento em centímetros por dia nas condições totalmente submerso, parcialmente submerso e terrestre. As plantas foram monitoradas por 60 dias. As barras (*whiskers*) apresentam os valores mínimos e máximos. As caixas (*box*) estendem-se do percentil 25 ao 75. A mediana é o traço no interior da caixa. O asterisco indica diferença significativa entre os valores médios após teste de t de Student ( $P > 95\%$ ).

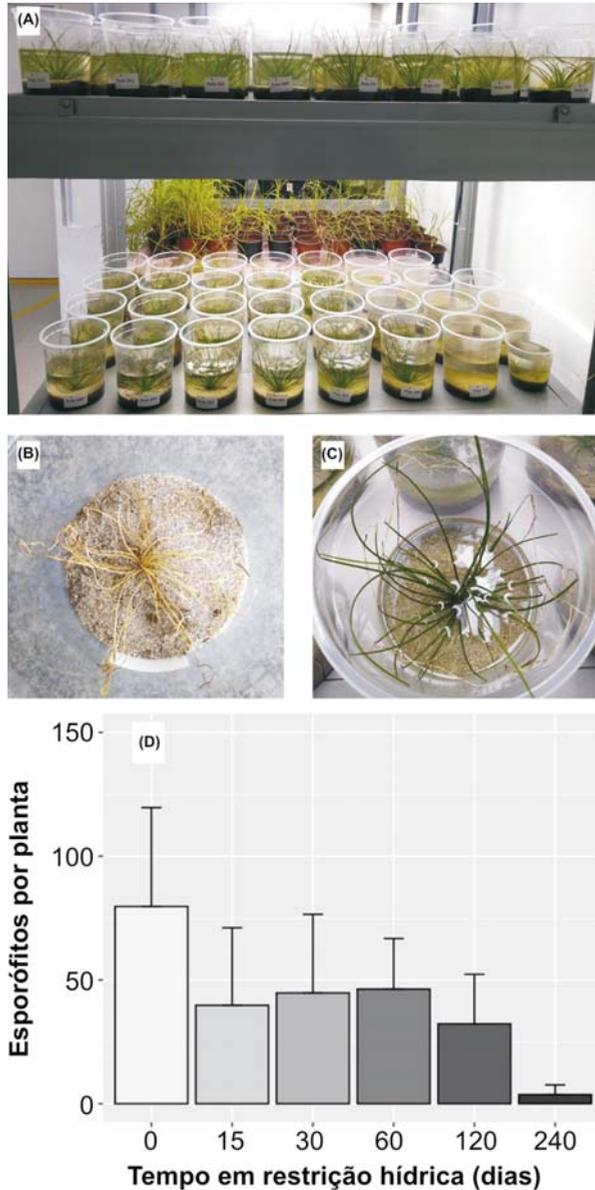
Após o período de estresse por exposição das folhas aos diferentes níveis de água por 72 h, todas as plantas foram podadas e submersas completamente. A recuperação das plantas foi monitorada por cerca de 60 dias, e as plantas alcançaram o dobro do número de folhas que havia anteriormente, mesmo nos grupos que passaram por estresses pela redução total da lâmina d’água. Isto demonstra que, apesar do estresse (falta de água por três dias), as plantas mantiveram a capacidade de crescimento. O número de folhas das plantas após o estresse por redução da lâmina d’água não foi diferente nos

variados tratamentos. No entanto, as plantas que passaram por redução total da lâmina de água tiveram folhas menores, sendo aproximadamente 20 % mais baixas quando comparadas a plantas totalmente imersas.

As plantas de *I. cangae* apresentaram uma elevada taxa de crescimento, mesmo após o estresse (figura 7.6C). As plantas que não foram expostas à dessecação apresentaram uma taxa de cerca de 0,33 cm por dia, valor que não difere significativamente de 0,32 cm por dia das plantas na condição de estresse intermediário. Por outro lado, a taxa de crescimento foi reduzida em cerca de 22 % pela exposição das folhas à condição terrestre. Todos os grupos de plantas foram capazes de rebrotar normalmente, mesmo após a segunda exposição aos estresses aplicados e continuam vivas 20 meses após os tratamentos de redução de lâmina de água.

## 7.7 Ensaios de Seca a Longo Prazo

Com o objetivo de avaliar o efeito de uma seca prolongada sobre plantas adultas de *I. cangae*, cultivamos a espécie em condições submersas por 12 meses em potes individuais (2 L) até atingir a fase reprodutiva (figura 7.7A). Após esse período, foram submetidos à dessecação gradual com a evaporação da água dos potes. Um lote de plantas foi deixado submerso como controle; outro lote, com água cobrindo somente o corno e folhas recém-lançadas (as folhas mais velhas permanecem expostas ao ar livre, como em ambiente parcialmente alagado); o substrato das demais plantas secou completamente (figura 7.7B). Neste último, foram realizadas reidratações periódicas aos 15, 30, 60, 120 e 240 dias. Tanto as plantas que permaneceram imersas quanto com água sobre o corno tiveram 100 % de sobrevivência. A redução do nível de água e exposição das folhas levou à dessecação das folhas mais velhas e das pontas das folhas mais jovens (figura 7.7C). As plantas que tiveram o substrato completamente seco apresentaram 38 % (três, de oito plantas) de sobrevivência quando reidratadas após 15 dias de seca. Períodos de seca superiores aos 15 dias levaram a 100 % de mortalidade. Por outro lado, a reidratação levou à emergência de novos esporófitos em todos os tratamentos, evidenciando a viabilidade dos esporos mesmo quando mantidos em ambientes secos por longos períodos (figura 7.7D). No entanto, o número de novos esporófitos gerados por essas plantas foi inferior ao observado para plantas mantidas isoladas em ambiente desprovido de nutrientes minerais (Caldeira et al. 2019). Vale destacar que não foram observados novos esporófitos nas plantas que permaneceram submersas, assim como descrito por Caldeira et al. (2019) para plantas cultivadas em sedimentos do Lago do Amendoim.



**Figura 7.7** Avaliação de tolerância à seca por plantas de *Isoëtes cangae*. (A) Plantas adultas de *I. cangae* com 12 meses de crescimento em condições controladas. Período de redução do nível de água por evapotranspiração até (B) completa seca do substrato e de plantas. (C) Plantas mantidas em ambiente parcialmente coberto com água. (D) Número de esporófitos que emergiram em cada planta após reidratação. Ressalta-se que o maior período de seca a que as plantas foram submetidas também resulta em menor período de avaliação da emergência de esporófitos. As barras representam os valores médios seguidos pelo desvio-padrão.

Novos ensaios em andamento, com plantas expostas ao ambiente terrestre por três, seis e 12 meses mostram a grande capacidade de resiliência dessas plantas aquáticas. As plantas mantidas apenas em substrato úmido continuam seu crescimento, mesmo que com tamanho de folhas menor se comparado ao controle, e possuem 100 % de sobrevivência. As plantas mantidas na situação terrestre produzem gametófitos e esporos, e são capazes de se reproduzir quando a coluna de água é aumentada, simulando variações em ambientes que possuem estações marcantes como períodos de seca e cheia.

## 7.8 Conclusões

Os estudos para determinação do potencial de adaptação de *I. cangae* a diferentes condições ambientais sugerem que a espécie possui elevada tolerância a diferentes fatores estressantes e, portanto, elevada capacidade de aclimação a outros ambientes para além do Lago do Amendoim. Avaliações de crescimento em diferentes substratos, tanto comerciais quanto substratos oriundos de diferentes lagos da Serra dos Carajás, sugerem que plantas de *I. cangae* são capazes de crescer nos diversos substratos avaliados e com capacidade de completar ciclo de desenvolvimento em todos. Todavia, vale destacar o melhor desempenho das plantas nos substratos oriundos de lagos de Carajás, como o elevado crescimento e a produção de estruturas reprodutivas das plantas em substrato do lago temporário de N6. De forma similar, avaliações de tolerância a altas temperaturas e restrições hídricas também sugerem elevada tolerância a esses eventos com condições estressantes. Em *I. cangae*, foram verificadas diferentes estratégias adaptativas, as quais incluem desde a manutenção da capacidade fotossintética em altas temperaturas, tolerância à redução de lâmina de água sobre as plantas e a recuperação do crescimento após eventos de *deficit* hídrico acentuado. Estes resultados sugerem que *I. cangae* dispõe de um aparato sofisticado para tolerância a estresses que lhe permitem se aclimatar a diferentes condições ambientais.

## Referências

Arts, G. H. P. 1988. Historical Development and Extent of Acidification of Shallow Soft Waters in the Netherlands (P Mathy, Ed.). – Air Pollution and Ecosystems: 928-933.

- Barni, E. et al. 2013. Estimating influence of environmental quality and management of channels on survival of a threatened endemic quillwort. – *Aquat Bot* 107: 39-46.
- Caldeira, C. F. et al. 2019. Sporeling regeneration and *ex situ* growth of *Isoëtes cangae* (Isoetaceae): Initial steps towards the conservation of a rare Amazonian quillwort. – *Aquat Bot* 152: 51-58.
- Čtvrtlíková, M. et al. 2014. The effect of temperature on the phenology of germination of *Isoëtes lacustris*. – *Preslia* 86: 279-292.
- Čtvrtlíková, M. et al. 2016. Lake water acidification and temperature have a lagged effect on the population dynamics of *Isoëtes echinospora* via offspring recruitment. – *Ecol Indic* 70: 420-430.
- Hawes, I. et al. 2003. The use of pulse amplitude modulated fluorometry to determine fine-scale temporal and spatial variation of *in situ* photosynthetic activity within an *Isoëtes*-dominated canopy. – *Aquat Bot* 77: 1-15.
- Kim, C. et al. 2008. Genetic diversity and population structure of endangered *Isoëtes coreana* in South Korea based on RAPD analysis. – *Aquat Bot* 89: 43-49.
- Liu, X. et al. 2005. Current status and conservation strategies for *Isoëtes* in China: a case study for the conservation of threatened aquatic plants. – *Oryx* 39: 335-338.
- Oh, M. J. et al. 2013. High Frequency Sporophytes Regeneration from the Spore Culture of the Endangered Aquatic Fern *Isoëtes coreana*. – *Am J Plant Sci* 4: 14-20.
- Pereira, J. B. D. S. et al. 2016. Two New Species of *Isoëtes* (Isoetaceae) from northern Brazil. – *Phytotaxa* 272: 141-148.
- Sahoo, P. K. et al. 2016. Influence of seasonal variation on the hydro-biogeochemical characteristics of two upland lakes in the Southeastern Amazon, Brazil. – *An Acad Bras Ciênc* 88: 2211-2227.
- Sand-Jensen, K. e Søndergaard, M. 1979. Distribution and quantitative development of aquatic macrophytes in relation to sediment characteristics in oligotrophic Lake Kalgaard, Denmark. – *Fresh Biol* 9: 1-11.
- Sudová, R. et al. 2011. The incidence of arbuscular mycorrhiza in two submerged *Isoëtes* species. – *Aquat Bot* 94: 183-187.

Vrba, J. et al. 2003. Long-term studies (1871-2000) on acidification and recovery of lakes in the Bohemian Forest (central Europe). – *Sci Total Environ* 310: 73-85.

Yadav, B. et al. 2015. Hydrochemical Characterization of Some Stands of *Isoëtes dixitei* in India. – *Taiwania* 60: 63-70.

Zandonadi, D. B. et al. 2021. Ecophysiology of two endemic Amazon quillworts. – *Aquat Bot* 170: 103350.



**Adequabilidade de Hábitat para  
Colonização Assistida de *Isoëtes  
cangae* em Lagos da Serra dos Carajás**

\* Anderson da Rocha Gripp \* Jorge Gabriel Fernandes Genovez  
\* Theo Arueira \* Marcos Paulo Figueiredo-Barros \* Mariana H. Marques  
\* Analy Machado de Oliveira Leite \* Paula Veronesi Marinho Pontes  
\* Renan Monte de Oliveira \* Thainá dos Santos Silva Araujo  
\* Lupis Ribeiro Gomes Neto \* Hugo Emiliano de Jesus  
\* Henrique Fragoso dos Santos \* José Augusto Pires Bitencourt  
\* Cecilio Frois Caldeira \* Francisco de Assis Esteves

TÍTULO CURTO (*RUNNING TITLE*)

---

---

**Condições Ambientais para  
Colonização de *Isoëtes cangae***

## Resumo

A licófita amazônica *Isoëtes cangae* é uma planta submersa encontrada exclusivamente no Lago do Amendoim, na Serra dos Carajás. Devido à sua ocorrência restrita, à introdução de peixes herbívoros exóticos e às atividades de mineração em sítios próximos, e aos efeitos da crise climática iminente, essa espécie encontra-se criticamente ameaçada. Portanto, esforços de conservação são necessários para evitar um declínio populacional, ou mesmo a sua extinção. Uma das estratégias propostas contempla a translocação por colonização assistida para outros ambientes aquáticos da região. No entanto, são escassos na literatura relatos desses procedimentos, mesmo para outros organismos aquáticos, o que impõe cautela na seleção de novos habitats. A partir da compreensão das exigências ambientais da espécie, buscaram-se ecossistemas passíveis de receber novas populações, sendo proposto o Lago Três Irmãs – corpo 3 (TI.3), localizado no corpo de canga S11A. Assim, foi implementado um programa de monitoramento intensivo das condições e do funcionamento desse ambiente, bem como do Lago do Amendoim, de modo a avaliar o grau de similaridade entre eles como um indicador da aptidão de TI.3 para receber os espécimes de *I. cangae*. Foi possível constatar que as condições limnológicas são bem semelhantes entre os ecossistemas. Eles tendem a ser mais semelhantes no período chuvoso. De modo geral, o Lago do Amendoim tende a sofrer menores variações nas condições limnológicas ao longo do tempo e apresentar menores taxas de produção primária e respiração do que TI.3. No Lago do Amendoim, foi constatado que *I. cangae* apresenta uma rica comunidade microbiológica associada, o que possivelmente auxilia a espécie no desempenho de suas funções metabólicas. Também, *I. cangae* compartilha uma parte dos táxons com o sedimento do Lago do Amendoim, compartimento que se mostrou bastante semelhante em composição com o lago TI.3, o que sugere que, ao ser translocada, *I. cangae* pode encontrar uma microbiota à qual está habituada. Esses resultados reforçam que, do ponto de vista da qualidade ambiental, TI.3 apresenta características de um habitat adequado a receber populações de *I. cangae* para fins de conservação da espécie.

**Palavras-chave:** translocação, monitoramento limnológico, condições ambientais, microbiota associada.

## 8.1 Introdução

Nos capítulos anteriores, muito já foi descrito sobre *Isoëtes* e as condições que levaram as espécies do grupo a se manterem como ocupantes de refúgios, sendo, basicamente, encontrada em zonas litorâneas com elevada transparência, áreas com pequenas bacias de captação que perfazem lagos oligotróficos, rios perenes, charcos, ocos de árvores, lagos (perenes ou temporários), poças rasas e afloramentos rochosos inundados (Brunton e Troia 2018, Free et al. 2009). Acredita-se que o grupo tenha sobrevivido a, pelo menos, três extinções em massa por mudanças ambientais (Santos et al. 2020) e, atualmente, é considerado cosmopolita, porém, devido à sua ocorrência geralmente restrita, em ambientes temporários e/ou comumente ameaçados, *Isoëtes* são consideravelmente vulneráveis a perda ou degradação de seus habitats naturais (Free et al. 2009, Liu et al. 2005). A espécie *Isoëtes cangae*, endêmica de um único ecossistema na Serra dos Carajás, ilustra bem essa situação de restrição e vulnerabilidade.

O Lago do Amendoim é um ambiente lacustre oligotrófico, situado em uma crosta laterítica, rodeada por vegetação típica dos ecossistemas de canga. Esse lago está inserido na bacia hidrográfica do Rio Itacaiúnas, uma região sob forte pressão antrópica pela conversão da floresta em pastagens para o gado e monoculturas agrícolas (Souza-Filho et al. 2016). Apesar de estar situado em uma unidade de conservação, a ocorrência da espécie em um único lago também a torna vulnerável ao risco de mudanças nas condições ambientais e ocorrência de eventos estocásticos. Dentre estes, destacam-se a exclusão competitiva por outras espécies de macrófitas, a herbivoria por espécies de peixes invasores, as atividades de exploração mineral em sítios próximos ao seu local de ocorrência e os efeitos das mudanças climáticas iminentes que ameaçam os ambientes aquáticos de todo o globo (Woolway et al. 2021, Zhao et al. 2022). O quadro supracitado suscitou a inclusão da espécie como “Criticamente em Perigo” em indexadores internacionais, como na Lista Vermelha da IUCN (Lansdown 2019).

Como estratégias de conservação da espécie, estão a possibilidade de manejo e ampliação de sua área de vida, a recolonização em locais que demonstrem declínios populacionais e o estabelecimento de populações geneticamente diversas. Ao passo que a dinâmica temporal da população de *Isoëtes cangae* vem sendo estudada *in situ* de modo a identificar padrões populacionais, bem como condições e períodos propícios a intervenções para fins de preservação (ver capítulo 9), a expansão da distribuição de *I. cangae*

para ambientes artificiais (como piscinas, aquários, açudes, etc.; Caldeira et al. 2019) e, principalmente, por colonização assistida para outros ecossistemas aquáticos, têm sido propostas como estratégias para conservação *ex situ* dessa espécie (para mais detalhes das estratégias de colonização propostas, ver capítulo 9). Dada a considerável quantidade e a diversidade de ambientes aquáticos na Serra dos Carajás (*vide* capítulo 2), a colonização assistida se mostra-se potencialmente interessante.

No entanto, a conceituação, a aplicação de técnicas, bem como a elaboração de protocolos-padrão e estudos relatando tentativas e sucesso em translocações por colonização assistida são escassos, principalmente para alguns grupos de organismos, como plantas aquáticas, o que impõe muita cautela na seleção de possíveis destinos para as populações de *I. cangae*. A busca por novos ambientes para translocação da espécie passa pela compreensão das suas exigências ambientais, o que é fundamental para dimensionar a extensão de seu nicho, e torna-se premente para a compreensão das respostas das plantas às variações ambientais nos novos locais.

Nesse sentido, programas de monitoramento são ferramentas essenciais na avaliação da qualidade ambiental, seja para fins de conservação de espécies (como avaliações da eficiência da colonização assistida) ou quaisquer outras intervenções humanas que visem dimensionar ou minimizar impactos ambientais em diferentes comunidades e ecossistemas (Thomaz et al. 2003). Os programas de monitoramento fornecem uma linha de base que informa a variação tolerável de um ou múltiplos atributos de interesse, ou seja, o espectro de alterações que não interfere nos usos múltiplos dos ambientes. Em conjunto com análises de risco, a avaliação contínua por meio do monitoramento pode ajudar a dimensionar possíveis impactos derivados do próprio manejo das espécies-alvo de conservação, o sucesso e a eficiência da ação de manejo realizada. Deste modo, somente pelo monitoramento, com a comparação dos dados antes e após o início do manejo, utilizando análises de séries temporais, é possível validar ou não a eficiência de intervenções. Logo, protocolos de colonização assistida devem contemplar não apenas a avaliação de risco da atividade, com o devido acompanhamento da resposta da espécie alvo de conservação em seu novo ambiente, mas também a resposta do próprio ambiente colonizado, incluindo suas espécies nativas e os diferentes processos ecossistêmicos (Brodie et al. 2021a). Desenvolver tais protocolos bem como aplicar técnicas de colonização assistida são atividades particularmente desafiadoras para organismos raros, principalmente, em áreas remotas e selvagens, como é a Região Amazônica.

Com base no exposto, este capítulo descreve as abordagens utilizadas para avaliação das condições de sítios considerados como alternativas viáveis para o estabelecimento de populações de *Isoëtes cangae*, visando à sobrevivência da espécie diante do quadro de ameaças à sua conservação. O capítulo está dividido em três seções: a primeira parte descreve alguns aspectos da biologia da espécie de interesse para fins de translocação, a segunda descreve as condições de ambientes que se apresentam como opção para a colonização assistida de *I. cangae*, e na última seção é realizada uma caracterização microbiológica dos compartimentos do ambiente fonte de *Isoëtes cangae* (Lago do Amendoim), além da descrição das relações que a espécie estabelece com microrganismos essenciais à sua existência.

## 8.2 Sobrevivência e Desenvolvimento em Condições Controladas

Os dados obtidos desde o início dos trabalhos sugeriam que *I. cangae* fosse uma espécie resiliente e potencialmente capaz de crescer e colonizar ambientes além do Lago do Amendoim, com uma gama ampla de substratos, e tolerar diferentes regimes de temperatura. Portanto, a colonização assistida para áreas protegidas ou cultivos em laboratório foi sempre colocada como alternativa para garantir a manutenção da diversidade genética e a viabilidade em longo prazo de *I. cangae*.

Na tentativa de operacionalizar um protocolo de desenvolvimento de *I. cangae*, foram avaliados os efeitos de variações de temperaturas, qualidade e disponibilidade de água, bem como diferentes substratos de cultivo. As respostas obtidas consideraram:

- i) a morfologia dos esporos e o número de estruturas de propagação por esporângios (micrósporos e megásporos);
- ii) a regeneração de esporos de uma cultura *in vitro* ou alterando as condições ambientais ao redor das plantas adultas;
- iii) o tempo de emergência e os cursos diários de alongamento foliar diante de condições ambientais (substrato e temperatura) que possibilitam o crescimento bem-sucedido dessas plantas e baixas taxas de mortalidade.

Quanto ao item (i), micrósporos e megásporos de *I. cangae* apresentaram diâmetros inferiores à maioria das espécies da família Isoetaceae (< 28  $\mu\text{m}$  e < 400  $\mu\text{m}$ , respectivamente; para mais detalhes, ver capítulo 5). Isso pode

estar relacionado à diploidia da espécie, pois a poliploidia tende a produzir aumento de estruturas gerais, dado o aumento na dose de proteínas produzidas pelo genoma. Ao comparar o genoma de *I. cangae* com o de *I. serracarajensis*, foi notado que este último apresenta quase metade do volume de material cromossômico. *Isoëtes serracarajensis* é poliploide, o que também está relacionado à maior robustez dos organismos e, portanto, a melhorias no desenvolvimento e na colonização da planta, especialmente em ambientes estressantes (Caldeira et al. 2019).

Quanto ao item (ii), apesar da aparente baixa taxa de reprodução em ambiente natural, *I. cangae* possui a capacidade de produzir alta frequência de esporos em laboratório (mais de 1 200 megásporos após um ano de cultivo em condições controladas). Os esporos de *I. cangae* são capazes de germinar rapidamente em meios como água destilada (63 % dos megásporos desenvolvidos com sucesso em esporos antes de 30 dias), apresentando, além da viabilidade das estruturas reprodutivas, considerável autocompatibilidade e sincronismo de desenvolvimento e maturação para liberação de micrósporos e megásporos. Ainda que remota, não se descarta a possibilidade de apogamia, como descrito para outras espécies do mesmo gênero, viabilizando uma maior taxa de produção de esporófitos (Caldeira et al. 2019).

Para o crescimento dos indivíduos de *I. cangae*, outro importante ponto a ser observado trata-se do pH da água e da taxa de oxigenação do substrato. Com a redução do pH na água, pode haver um consequente aumento na disponibilidade de alumínio e outros metais (Sahoo et al. 2017a) que podem inibir a atividade de enzimas celulares, sendo esse aspecto um dos principais estressores responsáveis pelo declínio das populações de *I. lacustris* na Europa Central (Taylor et al. 1986). Porém, a oxigenação do substrato promove o desenvolvimento saudável de microrganismos simbiotes e pode garantir a imobilização do ferro presente em grandes concentrações na água dos lagos da Serra dos Carajás, e a disponibilização de nutrientes limitantes, como N e P (Caldeira et al. 2019).

Quanto ao potencial de adaptação e crescimento de *I. cangae* em substratos provenientes de lagos e alagados da Serra dos Carajás (item iii), os estudos revelaram resultados muito promissores. Após nove meses de cultivo, plantas de *I. cangae* foram capazes de desenvolver-se em todos os substratos testados e atingir a fase reprodutiva, sendo os substratos dos lagos temporários os que mostraram os melhores resultados, com área foliar duas vezes maiores do que as plantas mantidas no tratamento controle (substrato orgânico comercial; Caldeira et al. 2019). Ainda nesse estudo, segundo análises de fluorescência

da clorofila a, todas as plantas apresentaram boa eficiência na assimilação de C, sem sinais de estresse e/ou redução da capacidade de fixação de carbono.

Ainda em condições controladas, observou-se também que os esporos de *I. cangae* apresentam um crescimento bem-sucedido em cultivos oligotróficos e em substrato rico em nutrientes, sugerindo alta adaptabilidade a ambientes com características distintas, desde baixa a elevada trofia. Todavia, vale destacar que esses estudos tratam de condições controladas sem a presença de outros organismos competidores. De forma similar, observou-se que aumentos na temperatura favorecem a germinação (de 20 °C contínuo para 28:20 °C, dia:noite), o crescimento e o desenvolvimento da plântula, sendo um outro indicativo que ela pode se desenvolver em uma ampla faixa de condições ambientais (Caldeira et al. 2019).

Apesar de os resultados positivos em diferentes estudos laboratoriais corroborarem as primeiras impressões sobre alta adaptabilidade e capacidade de desenvolvimento de *Isoëtes cangae*, as etapas de teste em ambientes naturais, onde a planta não ocorre naturalmente, demandaram estudos sobre a dinâmica ambiental e o complexo de interações ecológicas passíveis de afetar seu estabelecimento, crescimento e reprodução nos referidos ecossistemas. Esses resultados serão discutidos nas seções que se seguem.

### **8.3 Avaliação da Qualidade dos Ambientes Preferenciais para Translocação para Fins de Colonização Assistida de Populações de *I. cangae***

Alguns ecossistemas da Floresta Nacional (Flona) de Carajás, mencionados no segundo capítulo da presente obra, foram avaliados como bons candidatos iniciais para a colonização por *I. cangae*, destacando o complexo de três lagos lateríticos denominados Lagos Três Irmãs (TI.1, TI.2 e TI.3), localizados a 9 km do Lago do Amendoim.

O lago de cota mais baixa do complexo Três Irmãs (TI.3) é o maior corpo hídrico, com águas claras e oligomesotróficas (Sahoo et al. 2017a), assim como o Lago do Amendoim, e formado pelo acúmulo de chuvas em solos lateríticos (Silva et al. 2018). Para essa indicação também foram consideradas caracterizações bastante precisas e intensivas das propriedades do sedimento, tanto do Lago do Amendoim quanto de TI.3, realizadas em estudos prévios (Sahoo et al. 2016b, 2017b, Silva et al. 2018, Guimarães et al. 2023). Esses estudos constataram grande diversidade de sedimentos nos lagos e pontos de considerável similaridade.

Apesar de os lagos comparados apresentarem um conjunto de condições similares e estarem sob as mesmas condições climáticas, diferentes aspectos, como os limites e as características de suas bacias de captação e a composição das comunidades biológicas poderiam apresentar diferenças e levar a distintos padrões de funcionamento ecossistêmico, e, conseqüentemente, repercutir em diferenças em seus ciclos diários e sazonais, afetando a dinâmica de colonização das populações translocadas de *I. cangae*. Dessa forma, para determinar se *I. cangae* poderia prosperar no Lago Três Irmãos – 3 (TI.3), foram avaliadas características limnológicas e respostas ecofisiológicas à introdução desta licófito em TI.3 em contraste com populações translocadas também para o ambiente natural, o Lago do Amendoim.

A seguir são apresentados e discutidos os resultados das variações ambientais desses ecossistemas, ao passo que os resultados das respostas ecofisiológicas foram descritos nos capítulos 6 e 9 do presente livro.

### 8.3.1 Tendências espaciais nas condições limnológicas

A partir de 2019, a dinâmica de uma série de variáveis abióticas dos lagos foram avaliadas de modo intensivo, a cada duas horas, por meio de sondas multiparamétricas autônomas (AquaTroll 600, In-Situ®), posicionadas a 50 cm do substrato desses lagos, próximo ao sítio de estabelecimento de *Isoëtes cangae*. Esta seção sintetiza os resultados do período de agosto de 2019 a julho de 2021, para as variáveis temperatura, condutividade elétrica, turbidez, pH, potencial de oxirredução (ORP), concentração do oxigênio dissolvido (OD), concentração dos sólidos totais dissolvidos e em suspensão.

Ao longo do monitoramento, foram tomados aproximadamente 13 700 registros para cada variável, sendo 5 640 para o Lago do Amendoim e 8 100 registros para o lago TI.3. Em linhas gerais, os ecossistemas apresentam características limnológicas muito similares e homogêneas entre si. As temperaturas médias anuais ( $\pm$  desvio-padrão) são similares entre o Lago do Amendoim ( $26,92\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,47\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e TI.3 ( $26,42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; tabela 8.1). As águas dos lagos são levemente ácidas, com pH em torno de  $4,9 \pm 0,05$  para o Lago do Amendoim, e  $5,11 \pm 0,18$  para TI.3 (tabela 8.1). Baixos valores de pH parecem ser condições às quais *Isoëtes cangae* está habituada e adaptada no Lago do Amendoim, conforme constatado anteriormente neste livro (ver capítulo 6).

**Tabela 8.1** Valores médios ± desvio-padrão das variáveis limnológicas monitoradas intensivamente nos Lagos do Amendoim e Três Irmãs – corpo 3 de agosto de 2019 a julho de 2021

Variáveis	Lago do Amendoim			Lago Três irmãs – 3		
	Anual	Seco	Chuvoso	Anual	Seco	Chuvoso
Temperatura	26,92 ± 0,47	27,29 ± 0,4 <sup>ab</sup>	26,62 ± 0,38	26,42 ± 0,4	26,47 ± 0,35 <sup>a</sup>	26,39 ± 0,43 <sup>b</sup>
Condutividade Real	2,94 ± 0,29	3,14 ± 0,15 <sup>ab</sup>	2,85 ± 0,26 <sup>ab</sup>	3,38 ± 0,89	3,83 ± 0,62 <sup>ab</sup>	3,13 ± 1 <sup>ab</sup>
Turbidez	1,03 ± 0,78 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,55 <sup>ab</sup>	1,15 ± 0,8 <sup>ab</sup>	3,87 ± 2,39 <sup>a</sup>	4,27 ± 3,6 <sup>ab</sup>	3,59 ± 1,52 <sup>ab</sup>
pH	–	4,9 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,86 ± 0,07 <sup>a</sup>	5,11 ± 0,89	5,15 ± 0,16 <sup>ab</sup>	5,08 ± 0,19 <sup>ab</sup>
Potencial Redox	467,2 ± 26,0 <sup>a</sup>	453,6 ± 21,1 <sup>ab</sup>	478,1 ± 20,6 <sup>ab</sup>	3,38 ± 0,18 <sup>a</sup>	414,8 ± 50,5 <sup>ab</sup>	347,8 ± 124,4 <sup>ab</sup>
Oxigênio Dissolvido	6,65 ± 0,38 <sup>a</sup>	6,84 ± 0,14 <sup>ab</sup>	6,5 ± 0,59 <sup>ab</sup>	371,6 ± 102,2 <sup>a</sup>	7,05 ± 0,29 <sup>ab</sup>	7,06 ± 0,2 <sup>ab</sup>
Saturação de Oxigênio	82,4 ± 5,2 <sup>a</sup>	86,0 ± 2,7 <sup>b</sup>	79,5 ± 7,4 <sup>b</sup>	7,05 ± 0,23 <sup>a</sup>	88,5 ± 6,3 <sup>b</sup>	86,1 ± 4,0 <sup>b</sup>
Sólidos Dissolvidos	2,32 ± 0,63	2,54 ± 0,57 <sup>ab</sup>	2,14 ± 0,59 <sup>ab</sup>	2,14 ± 0,55	2,42 ± 0,39 <sup>ab</sup>	1,98 ± 0,62 <sup>ab</sup>
Sólidos em Suspensão	3,14 ± 2,4 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,86 <sup>b</sup>	3,59 ± 2,328 <sup>b</sup>	53,82 ± 81,43 <sup>a</sup>	14,6 ± 12,3 <sup>b</sup>	77,9 ± 126,16 <sup>b</sup>

**Nota:** Valores significativamente distintos para os diferentes ecossistemas (p < 0,05) foram indicados pela letra “a”. Valores significativamente distintos para os diferentes períodos (p < 0,05) foram indicados pela letra “b”.

Por sua vez, os valores médios anuais de condutividade elétrica e turbidez são muito baixos, sempre menores do que  $4 \mu\text{S cm}^{-1}$  e 4 NTU, respectivamente (tabela 8.1). Isso pode ser esperado para esses ecossistemas, cujas bacias são pequenas, o que limita a entrada de montantes expressivos de materiais alóctones (isto é, de origem externa ao ecossistema; Sahoo et al. 2016a, 2017a), e apresentam substrato consolidado (rochoso) ou solos relativamente rasos. Nessas condições, e pelo fato de os ambientes serem lânticos, favorecendo processos deposicionais, também são limitadas as concentrações de partículas em suspensão e íons nas águas, mantendo baixos os valores de sólidos totais e dissolvidos, não superando  $20 \text{ mg L}^{-1}$  ao longo do período monitorado nos dois ecossistemas (tabela 8.1). Esses resultados podem explicar as águas cristalinas observadas nesses lagos.

A concentração média anual de oxigênio dissolvido (OD) foi de  $6,65 \pm 0,38 \text{ mg L}^{-1}$  para o Lago do Amendoim, próxima aos valores médios de  $7,05 \pm 0,23 \text{ mg L}^{-1}$  registrados em TI.3 (tabela 8.1). Mesmo padrão é observado para a saturação do oxigênio (que indica a proporção de oxigênio que se encontra dissolvido na água se comparada à atmosfera) e teve média de  $82,37 \pm 5,16 \%$ , no Lago do Amendoim, e  $86,94 \pm 5,24 \%$  em TI.3 (tabela 8.1). Por outro lado, o potencial redox (ORP), observado no Lago do Amendoim, mostrou-se levemente mais elevado do que o observado em TI.3, apresentando médias de  $467,18 \pm 25,95 \text{ mV}$  e  $371,64 \pm 102,2 \text{ mV}$ , respectivamente (tabela 8.1). Os valores de todas as variáveis estão dentro dos intervalos que foram registrados para esses lagos em estudos pretéritos (Sahoo et al. 2017a), com exceção do ORP, que não havia sido avaliado anteriormente.

### 8.3.2 Tendências sazonais nas condições limnológicas

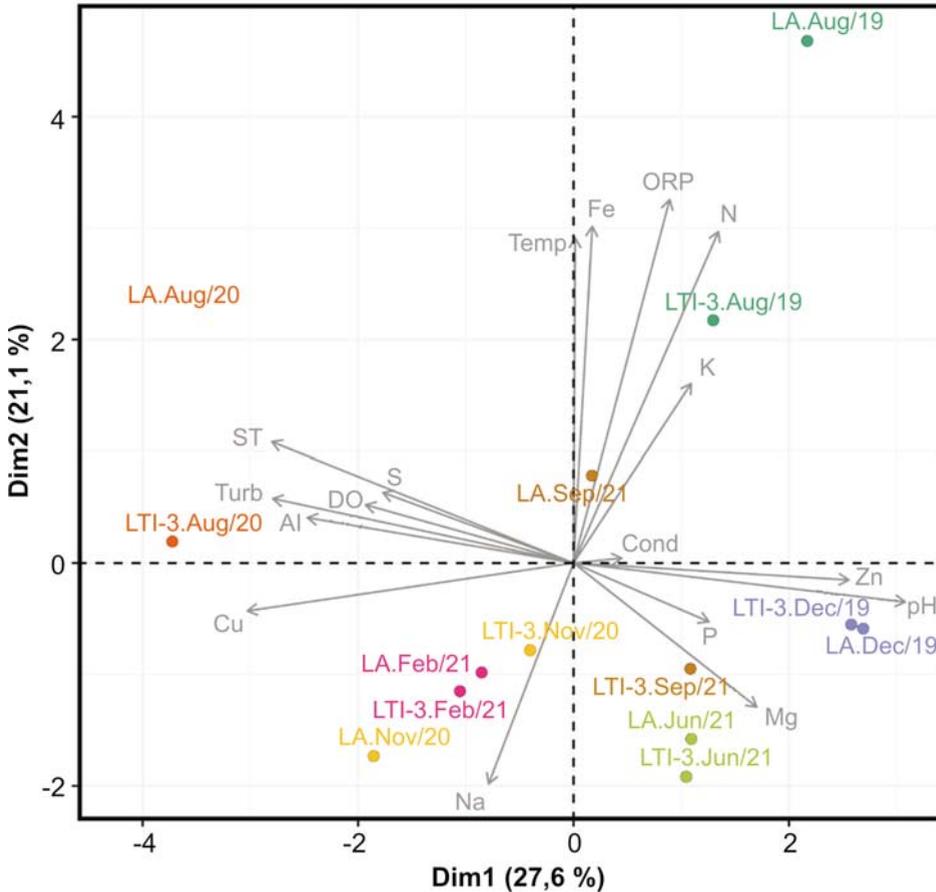
Ambientes aquáticos amazônicos são regidos pelas variações cíclicas no regime climático, com estações secas, chuvosas e intermediárias (vazante e enchente) geralmente bem marcadas (Junk et al. 1999, Esteves 2011). Apesar da aparente homogeneidade e da similaridade anuais observadas entre os ecossistemas, diferenças significativas nas características limnológicas dos lagos são registradas entre os períodos chuvosos e de estiagem. Foi possível constatar que a temperatura tende a ser maior no período seco do que no chuvoso no Lago Amendoim, diferentemente do lago TI.3 que não apresenta diferenças significativas entre os períodos avaliados (tabela 8.1). Temperaturas mais alta da água são esperadas no período chuvoso, uma vez que é o período mais quente na região (Sahoo et al. 2016a, 2017). Eventualmente,

temperaturas mais altas no período seco no Lago do Amendoim foram reportadas por Sahoo et al. (2017a) e podem estar associadas ao fato de o lago apresentar uma coluna d'água menor no período de estiagem (capítulo 2).

A condutividade elétrica e a concentração de sólidos dissolvidos em ambos os lagos, a concentração e a saturação do oxigênio dissolvido (no Lago do Amendoim) e o pH (em TI.3) também tendem a apresentar valores significativamente maiores no período seco do que no chuvoso, ao passo que a turbidez (no Lago do Amendoim) apresentou tendências opostas e os demais parâmetros não diferiram entre os períodos (tabela 8.1). De modo geral, apesar de serem observadas diferenças estatisticamente significativas entre os períodos, as diferenças entre os valores observados para todas as variáveis são muito baixas, bem como a sua faixa de variação (cerca de 23,2 % e 34,1 %, no Lago do Amendoim e em TI.3, respectivamente), revelando-os como ambientes relativamente homogêneos, embora TI.3 seja relativamente mais dinâmico e heterogêneo do que o Lago do Amendoim. Essas tendências, bem como o intervalo dos valores observados para essas variáveis, também foram anteriormente reportados (Sahoo et al. 2017a).

Também buscamos avaliar a variação nas condições limnológicas dos ecossistemas entre os períodos hidrológicos por meio de uma análise de componentes principais (PCA). Assim, avaliamos as distinções na dinâmica das variáveis limnológicas entre os lagos ao longo das campanhas trimestrais, realizadas no período de estudo. Os dois primeiros eixos somaram 48,7 % da variação total (figura 8.1), sendo que o eixo 1 esteve associado a maiores valores de pH e concentrações de Zn, em dezembro de 2019, e maior turbidez e concentrações de Al, Cu e sólidos totais, em agosto de 2020, em ambos os locais (figura 8.1). O eixo 2 está relacionado a mais alta temperatura, ORP e concentrações de Fe e N, em agosto de 2019, e maiores concentrações de Na, em novembro de 2020, fevereiro de 2021 e junho de 2021, em ambos os lagos (figura 8.1). A ordenação na PCA revelou que a qualidade da água dos lagos varia consideravelmente ao longo dos períodos hidrológicos e dos anos avaliados, mas ambos os lagos tendem a possuir características semelhantes em cada amostragem. Isso reforça que as condições limnológicas de ambos os ecossistemas comportam-se de modo semelhante ao longo do tempo, refletindo mais as variações climáticas próprias de cada momento do que qualquer predefinição em termos de períodos hidrológicos (capítulo 2). É importante observar, entretanto, que a similaridade entre os lagos tende a diminuir nos períodos secos (agosto de 2019, agosto de 2020, setembro de 2021), indicando que maiores peculiaridades dos ambientes tendem a ser

notadas à medida que secam, ao passo que o poder diluidor das águas das chuvas aumenta a similaridade entre os ambientes.

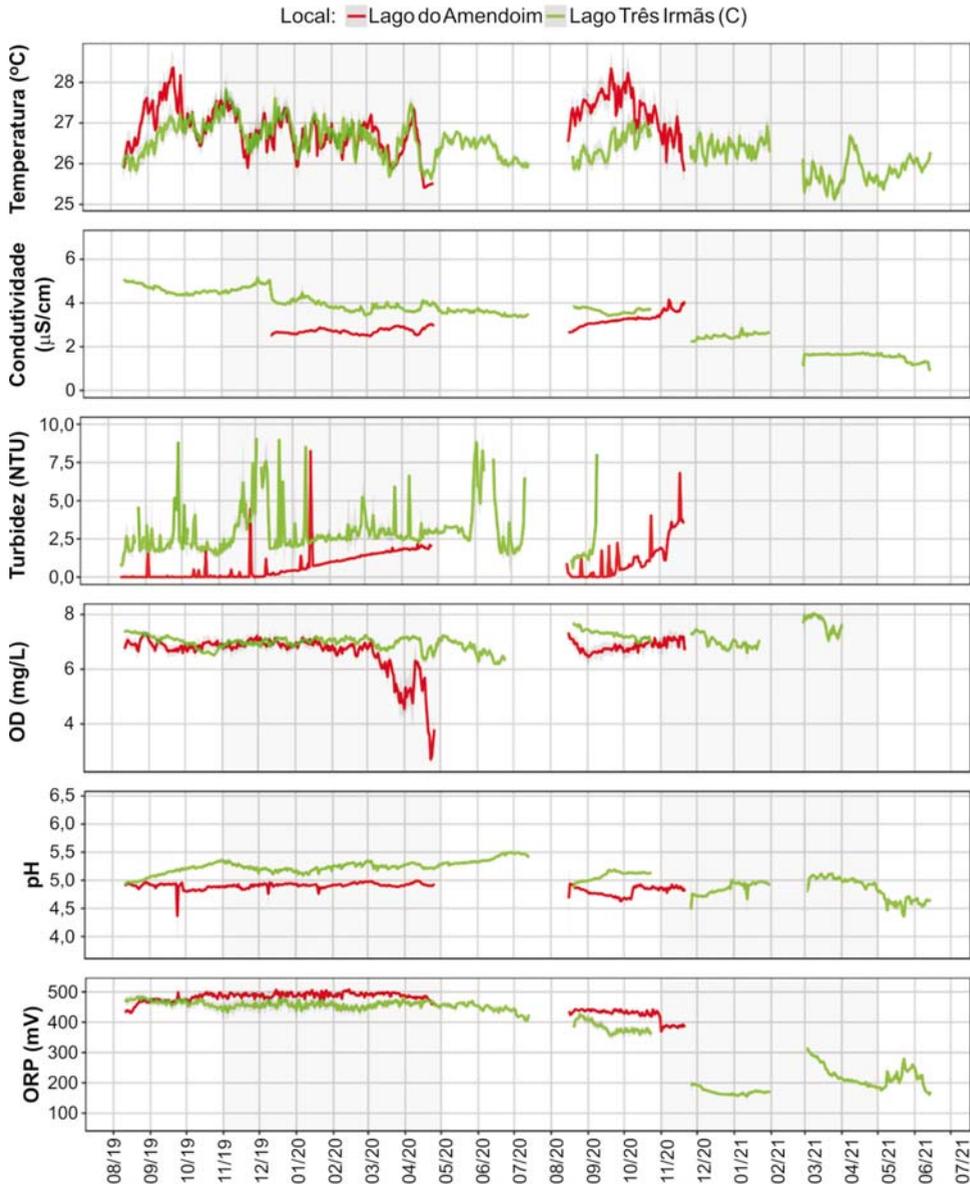


**Figura 8.1** Análise de componentes principais (PCA) das condições limnológicas do Lago do Amendoim (LA) e do Lago Três Irmãs - 3 (LTI-3) entre agosto de 2019 e setembro de 2021. Temp = temperatura, Cond = condutividade elétrica, ORP = potencial de oxidação-redução, Turb = turbidez, ST = sólidos totais, DO = concentração de oxigênio dissolvido, P = fósforo, K = potássio, Mg = magnésio, Na = sódio, Cu = cobre, Fe = ferro, Zn = zinco, S = enxofre, Al = alumínio, e N = nitrogênio.

### 8.3.3 Variações nictemerais nas condições limnológicas

Também foi avaliada a variação diária das condições limnológicas entre os Lagos do Amendoim e TI.3 (figura 8.2). A sobreposição entre linhas e som-

bras das linhas (que indicam os intervalos de confiança de 95 % dos valores diários) revela a ausência de diferenças significativas entre os lagos em determinado dia para cada variável (figura 8.2). É possível notar que a temperatura, o oxigênio dissolvido e o ORP apresentam comportamentos diários similares para os dois ambientes no decorrer do ano, apenas com leves diferenças em determinados períodos. A sobreposição nos valores de temperatura e ORP tendem a reduzir-se entre os lagos, indicando que os valores afastam-se nos meses que antecedem o período chuvoso, enquanto OD tende a afastar-se no período seco e no final do período chuvoso. Já os valores de pH apontam um padrão distinto em que os ciclos diários assemelham-se apenas em determinada parte do ano, na estação seca. A condutividade elétrica e a turbidez, não apresentam um padrão bem estabelecido, o que indica a possibilidade de não haver um ciclo anual bem definido para variações nictemerais dessas variáveis. Porém, quanto à turbidez, observam-se valores constantemente maiores em TI.3 do que no Lago do Amendoim e uma grande influência da sazonalidade apenas neste último ambiente, em geral, com incrementos nos valores à medida que o período chuvoso avança (figura 8.2).



**Figura 8.2** Dinâmica temporal de temperatura (°C), condutividade (μS cm<sup>-1</sup>), turbidez (NTU), OD (oxigênio dissolvido – mg L<sup>-1</sup>), pH e ORP (potencial redox) do Lago do Amendoim (vermelho) e do Lago Três Irmãs – corpo 3 (verde), de agosto de 2019 a julho de 2021. Em torno das linhas indicativas da dinâmica dos ambientes avaliados estão representadas sombras cinza, que indicam o intervalo de confiança de 95 % ao longo de um dia; quando sobrepostos, representam a ausência de diferenças significativas entre os conjuntos de dados. Períodos chuvosos e secos são representados pelo fundo cinza ou branco, respectivamente.

### 8.3.4 Tendências ao longo do perfil da coluna d'água

Medidas limnológicas tomadas ao longo de perfis verticais da coluna d'água em sítios próximos a bancos naturais de *Isoëtes cangae* no Lago do Amendoim e no local escolhido para translocação da espécie no Lago TI.3 reforçam que a temperatura tende a ser mais elevada no período seco do que no chuvoso, principalmente no Lago do Amendoim (figura 8.3). Também apontam haver uma certa homogeneidade térmica ao longo da coluna d'água (figura 8.3). Apenas em alguns períodos, em que os ambientes encontravam-se com maior coluna d'água, foi registrada uma leve tendência de redução da temperatura com a profundidade, em geral menor do que 1 °C. Isso corrobora os estudos pretéritos realizados na área que apontam que esses lagos tendem a apresentar um padrão polimítico, ou seja, apresentam variações diurnas de temperatura entre a superfície e o fundo, com formação de várias termoclinas durante o ano (Sahoo et al. 2017a, Guimarães et al. 2023).

Os perfis também apontam uma considerável homogeneidade química ao longo da coluna d'água (figura 8.3), com algumas poucas exceções. Dentre elas, pode-se destacar uma redução nos valores de pH e um aumento nos valores de ORP em direção ao fundo dos Lagos do Amendoim e TI.3, em setembro de 2019, e reduções nas concentrações de OD no fundo do Lago do Amendoim, em agosto de 2020. Isso se deve, provavelmente, à intensa atividade de respiração nas proximidades do sedimento desses ambientes no período seco, quando se nota um aumento na concentração dos solutos na água. Um aumento na atividade respiratória da biota nesses períodos libera gás carbônico na água que, ao reagir com a água, forma o ácido carbônico, acidificando-a (Carmouze 1994).

Vale destacar que, na maioria dos períodos (dezembro de 2019, fevereiro, junho e setembro de 2021), foram registrados aumentos no pH e nas concentrações de oxigênio e clorofila a no fundo do Lago do Amendoim, mas não em TI.3 (figura 8.2). Tais eventos provavelmente estão relacionados a atividades de produção primária nas proximidades do sedimento, dominado por macrófitas aquáticas no Lago do Amendoim. Nota-se ainda um aumento na turbidez e condutividade em direção ao fundo em alguns períodos, principalmente no Lago do Amendoim, que provavelmente se deve à ressuspensão do sedimento. O entorno do sítio escolhido para a translocação experimental das plantas no Lago do Amendoim difere-se de TI.3 no que se refere ao tipo de substrato, principalmente orgânico no primeiro, e rochoso no segundo.

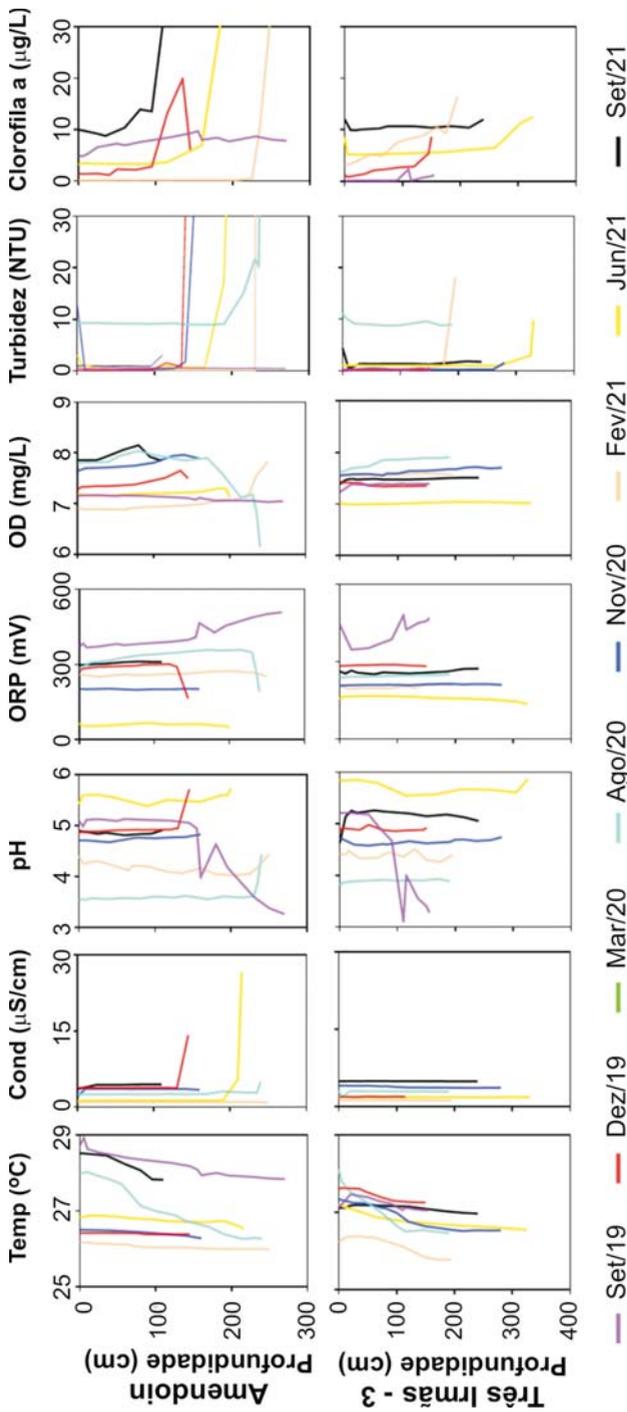
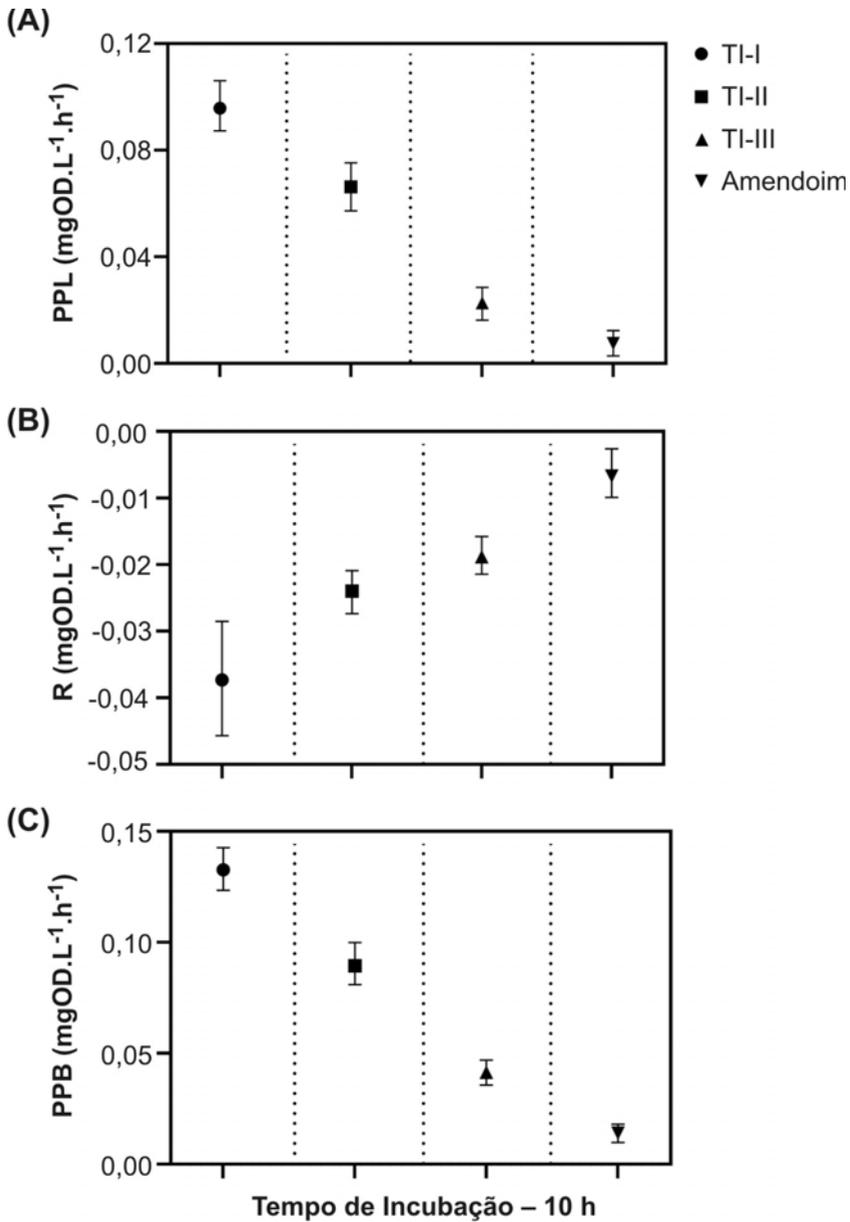


Figura 8.3 Perfis verticais das variáveis limnológicas na coluna d'água dos Lagos do Amendoim e Três Irmãs – corpo 3, nas campanhas realizadas de setembro de 2019 a setembro de 2021.

### 8.3.5 Metabolismo aquático

Apesar das semelhanças nas variações ambientais, nas condições limnológicas e do sedimento entre o Lago do Amendoim e o TI.3, os sistemas são consideravelmente distintos quanto às composições bióticas (Sahoo et al. 2016b, 2017a, 2017b, Guimarães et al. 2023, capítulo 2). Tendo em vista que as comunidades respondem, mas também afetam, a dinâmica limnológica dos ecossistemas, é importante entender como o funcionamento ecossistêmico varia entre os ambientes. Quando se avalia o metabolismo aquático na superfície da coluna d'água, ele mostra-se muito mais acelerado no sistema Três Irmãs se comparado ao Lago do Amendoim. A figura 8.4 apresenta os resultados da avaliação do metabolismo pelágico, por meio da estimativa das taxas de respiração, produção primária líquida e bruta em quatro lagos (do Amendoim, TI1, TI.2 e TI.3) no final do período seco (setembro de 2019). Essas estimativas foram feitas pelo método das diferenças na concentração de oxigênio em frascos transparentes, após um tempo de incubação de 10 h em câmara escura ou iluminada ( $PAR \cong 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; Wetzel e Likens 1991).

Os resultados apontam que, tanto as taxas de respiração quanto as de produção primária líquida e bruta seguem uma tendência de redução ao longo do gradiente de posição dos lagos da bacia das Três Irmãs (TI.1 > TI.2 > TI.3), sendo ainda menores no Lago do Amendoim (figura 8.4). As tendências nas taxas de produção primária bruta e de respiração (mas não da produção primária líquida) estavam associadas às concentrações iniciais de clorofila a nesses sistemas (figura 8.5). O Lago TI.1 apresenta as maiores concentrações de clorofila a, o que vai se reduzindo ao longo do gradiente de Lagos das Três Irmãs e é ainda menor no Lago do Amendoim, em função das características dessas bacias e das variações sazonais de nível d'água, que acabam por concentrar os nutrientes e a matéria orgânica no período de estiagem (Sahoo et al. 2017a). Logo, o metabolismo reflete o grau de trofia desses ecossistemas. Importante também entender como a composição e a diversidade biológica e a sua funcionalidade estão associadas a *I. cangae*.



**Figura 8.4** Metabolismo aquático, estimado a partir das relações de consumo/produção de oxigênio dissolvido na água dos ecossistemas do complexo Três Irmãs (TI-I, TI-II e TI-III) e do Lago do Amendoim. (A) Produção Primária Líquida – PPL; (B) Respiração – R; e (C) Produção Primária Bruta – PPB. Símbolos e barras indicam, respectivamente, valores médios e intervalo de confiança de 95 % em torno da média das taxas metabólicas de cada ecossistema.

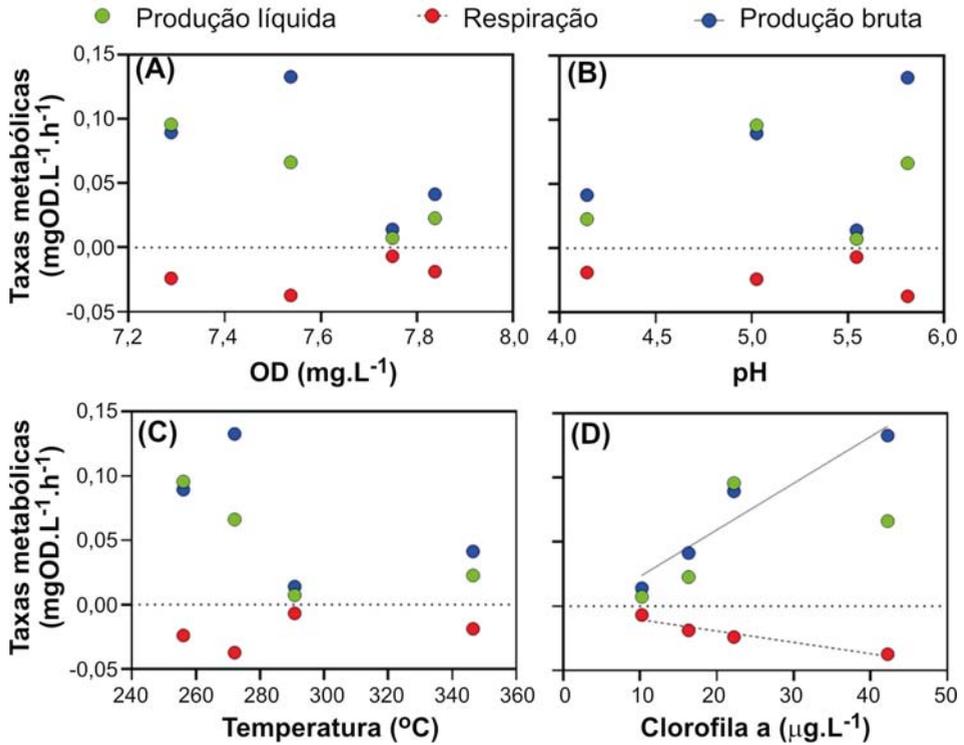


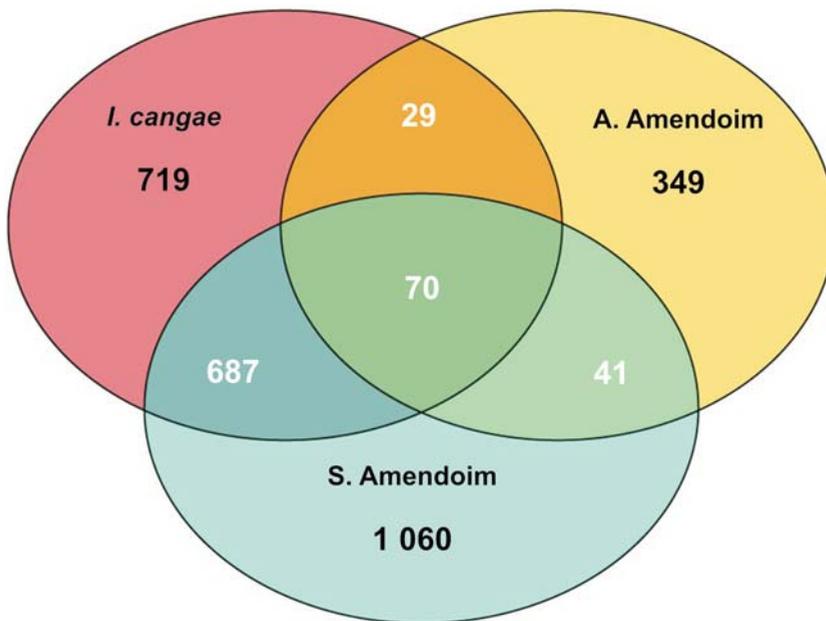
Figura 8.5 Relação entre as taxas metabólicas de produção primária líquida, respiração e produção primária bruta com: (A) concentração de oxigênio dissolvido, (B) potencial hidrogeniônico; (C) temperatura; e (D) concentração de clorofila a.

#### 8.4 Diversidade Microbiológica Associada a *Isoëtes cangae* e aos Diferentes Compartimentos do Lago do Amendoim

O conhecimento da estrutura, da diversidade e do papel das comunidades bacterianas encontradas nos ambientes naturais é fundamental para compreender diversas relações ecológicas, especialmente sobre a base da cadeia trófica e sua especificidade. Nesses ambientes, diferentes comunidades microbianas estão associadas às diversas espécies de plantas e podem exercer um papel benéfico para o seu crescimento, por meio de relações simbióticas. Neste sentido, com o objetivo de conhecer a estrutura e a diversidade da comunidade bacteriana associada a *I. cangae* no Lago do Amendoim, foi desenvolvido um estudo molecular, envolvendo sequenciamento do DNA das comunidades bacterianas presentes na planta (raiz + rizosfera) e os compar-

timentos de seu hábitat original (sedimento e água do Lago do Amendoim), durante o período chuvoso (janeiro de 2019).

Os resultados revelam um baixo compartilhamento dos grupos taxonômicos entre todas as amostras, com apenas 70 unidades taxonômicas operacionais (OTU) comuns entre si, de um total de 2 955 OTU (figura 8.6). A maior quantidade de grupos taxonômicos compartilhados (687 OTU) foi observada entre o sedimento e *I. cangae* (raiz + rizosfera). Isso indica que cada compartimento possui uma comunidade bacteriana própria e certo grau de exclusividade (sedimento com 1 060 OTU e planta com 719 OTU exclusivos). Portanto, a comunidade bacteriana associada a *I. cangae* tende a ser exclusiva da planta e apenas parcialmente compartilhada com o sedimento do Lago do Amendoim.



**Figura 8.6** Diagrama de Venn das OTU da comunidade bacteriana compartilhadas entre as amostras de *I. cangae*, do sedimento (S. Amendoim) e água (A. Amendoim) do Lago do Amendoim.

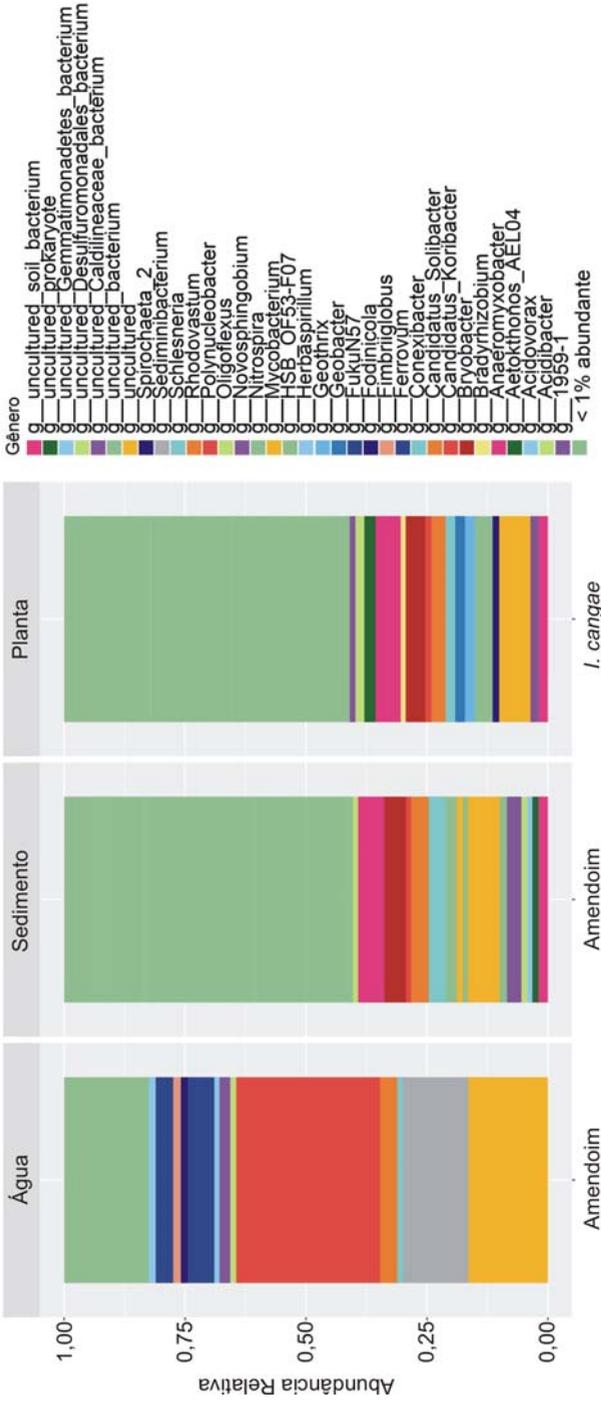
Por meio de uma análise da abundância relativa dos distintos grupos taxonômicos encontrados na planta em nível de filo e família, foi possível observar que os grupos mais abundantes eram também comuns aos táxons presentes no sedimento do Lago do Amendoim. Dentre eles, destacam-se os

filos Proteobacteria, Acidobacteria e Chloroflexi, e, em nível de família, destacam-se: Solibacteraceae, Ktedonobacteraceae e Archangiaceae. Já em nível de gênero (figura 8.7), observa-se maior diferença para as amostras de água do Lago do Amendoim com relação aos demais compartimentos, tanto em relação à abundância como à composição.

Os gêneros bacterianos encontrados de forma mais abundante e comuns ao sedimento como associado a *I. cangae* foram *Anaeromyxobacter* e *Bryobacter* (figura 8.7). Ambos os gêneros são conhecidos por terem bactérias redutoras de ferro (Chao et al. 2010, Kulichevskaya et al. 2010), o que pode estar auxiliando a planta a viver em um solo com altas concentrações de metais, como o Lago do Amendoim. Ademais, os gêneros *Geobacter*, *Geothrix* e *Acidibacter*, encontrados associados a *I. cangae*, apesar de menos abundantes, também possuem importante relação com a metabolização de metais (Islam et al. 2018). Eles utilizam ferro e outros metais em seu metabolismo, sendo capazes de gerar potencial elétrico na planta e “depurar” ambientes contaminados por metais.

Outro aspecto relevante está relacionado aos gêneros *Bradyrhizobium* e *Nitrospira*, os quais estão envolvidos diretamente no ciclo do nitrogênio. O gênero *Bradyrhizobium* possivelmente mantém relação de simbiose com *I. cangae*, fornecendo nitrogênio fixado em forma de amônia para a planta (Bedmar et al. 2005). Já o gênero *Nitrospira* realiza a nitrificação completa de amônia a nitrato (Daims et al. 2015), também podendo representar uma associação simbiótica importante para sobrevivência de *I. cangae* na região.

Portanto, a caracterização da estrutura e diversidade bacteriana associada a *I. cangae* sugere a ocorrência de relações simbióticas determinantes para a manutenção das condições desse organismo no ecossistema, uma relação frágil, se considerado o fato de *I. cangae* ser uma espécie endêmica do Lago do Amendoim. Ressalta-se, no entanto, a grande similaridade na composição microbiológica entre o sedimento do Lago do Amendoim e de TI.3 (capítulo 2). Isso sugere que, ao ser translocada para TI.3, *I. cangae* pode encontrar uma microbiota a qual está habituada, e, eventualmente, ter seu estabelecimento facilitado.



**Figura 8.7** Abundância relativa dos gêneros da comunidade bacteriana de amostras de água e sedimento do Lago do Amendoim e da comunidade associada a *Isoëtes cangae*.

## 8.5 Considerações Finais

Estudos sobre potenciais locais para o crescimento de *Isoëtes cangae* em campo são o primeiro passo para a elaboração de planos de ações de manejo e translocação da espécie visando à sua conservação. Nossos resultados sugerem que o Lago TI.3 apresenta um comportamento limnológico relativamente semelhante ao Lago do Amendoim, apesar de apresentar um metabolismo mais acelerado e um grau de trofia mais elevado do que esse último. O lago TI.3 também apresenta uma microbiota no sedimento consideravelmente semelhante à do Lago do Amendoim, compartimento que mostrou compartilhar uma grande similaridade com a comunidade microbológica associada a *I. cangae*. Juntamente com os testes de desenvolvimento de *I. cangae* em condições controladas, esses resultados reforçam a aptidão de TI.3 ao estabelecimento e à manutenção de populações futuras de *I. cangae*.

O conhecimento da dinâmica dos ambientes candidatos para sustentar populações de *Isoëtes cangae* também é fundamental para delinear os próximos passos da translocação. Para esse procedimento ser bem-sucedido, faz-se necessário também conhecimento das relações ecológicas que a planta estabelece com as variações nas condições do meio e com os demais organismos nele presentes, o que será abordado nas próximas seções deste livro.

## Referências

- Abeli, T. et al. 2018. A gleam of hope for the critically endangered *Isoëtes malinverniana*: Use of small-scale translocations to guide conservation planning. – *Aquat Conserv* 28: 501-505.
- Bedmar, E. J. et al. 2005. The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. – *Biochem Soc Trans* 33: 141-144.
- Brodie, J. F. et al. 2021. Global policy for assisted colonization of species. – *Science* 372: 456-458.
- Brunton, D. F. e Troia, A. 2018. Global review of recent taxonomic research into *Isoëtes* (Isoetaceae), with implications for biogeography and conservation. – *Fern Gaz* 20: 309-333.

- Caldeira, C. F. et al. 2019. Sporeling regeneration and *ex situ* growth of *Isoëtes cangae* (Isoetaceae): Initial steps towards the conservation of a rare Amazonian quillwort. – *Aquat Bot* 152: 51-58.
- Carmouze, J.-P. 1994. O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. São Paulo. Editora Edgard Blücher Ltda. 255p.
- Chao, T.-C. et al. 2010. Comprehensive proteome profiling of the Fe(III)-reducing myxobacterium *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C during growth with fumarate and ferric citrate. – *Proteomics* 10: 1673-1684.
- Chen, W.-C. et al. 2021. Metabolic potential and community structure of bacteria in an organic tea plantation. – *Appl Soil Ecol* 157: 103762.
- Daims, H. et al. 2015. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. – *Nature* 528: 504-509.
- Esteves, F. de A. 2011. Fundamentos de Limnologia. 3ª edição. Interciência, Rio de Janeiro: 826p.
- Free, G. et al. 2009. The identification, characterization and conservation value of isoetid lakes in Ireland. – *Aquat Conserv* 19: 264-273.
- Guimarães, J. T. F. et al. 2023. Landscape and Climate Changes in Southeastern Amazonia from Quaternary Records of Upland Lakes. – *Atmosphere* 14: 621.
- Islam, F. S. et al. 2005. Potential role of the Fe(III)-reducing bacteria *Geobacter* and *Geothrix* in controlling arsenic solubility in Bengal delta sediments. – *Mineral Mag* 69: 865-875.
- Junk, W. J. 1999. The flood pulse concept of large rivers: learning from the tropics. – *Large Rivers*: 261-280.
- Kulichevskaya, I. S. et al. 2010. *Bryobacter aggregatus* gen. nov., sp. nov., a peat-inhabiting, aerobic chemo-organotroph from subdivision 3 of the Acidobacteria. – *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 301-306.
- Lansdown, R. V. 2019 *Isoëtes cangae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019:e.T136249847A1362500118235.
- Liu, X. et al. 2005. Current status and conservation strategies for *Isoëtes* in China: a case study for the conservation of threatened aquatic plants. – *Oryx* 39: 335-338.

- Nunes, G. L. et al. 2018. Quillworts from the Amazon: A multidisciplinary populational study on *Isoëtes serracarajensis* and *Isoëtes cangae*. – PLoS ONE 13: e0201417.
- Pereira, J. B. D. S. et al. 2016. Two New Species of *Isoëtes* (Isoetaceae) from northern Brazil. – Phytotaxa 272: 141-148.
- Pereira, J. B. S. et al. 2017. Origin and biogeography of the ancient genus *Isoëtes* with focus on the Neotropics. – Bot J Linn Soc 185: 253-271.
- Pigg, K. B. 2001. Isoetalean Lycopsid Evolution: from the Devonian to the Present. – Am Fern J 91: 99-114.
- Sahoo, P. K. et al. 2016a. Influence of seasonal variation on the hydro-biogeochemical characteristics of two upland lakes in the Southeastern Amazon, Brazil. – An Acad Bras Cienc 88: 2211-2227.
- Sahoo, P. K. et al. 2016b. Geochemistry of upland lacustrine sediments from Serra dos Carajás, Southeastern Amazon, Brazil: Implications for catchment weathering, provenance, and sedimentary processes. – J South Am Earth Sci 72: 178-190.
- Sahoo, P. K. et al. 2017a. Limnological characteristics and planktonic diversity of five tropical upland lakes from Brazilian Amazon. – Ann. Limnol. – Int. J. Lim. 53: 467-483.
- Sahoo, P. K. et al. 2017b. Geochemical characterization of the largest upland lake of the Brazilian Amazonia: Impact of provenance and processes. – J South Am Earth Sci 80: 541-558.
- Santos, M. P. et al. 2020. The genetic diversity and population structure of two endemic Amazonian quillwort (*Isoëtes* L.) species. – PeerJ 8: e10274.
- Silva, M. S. D. et al. 2018. Morphology and morphometry of upland lakes over lateritic crust, Serra dos Carajás, southeastern Amazon region. – An Acad Bras Cienc 90: 1309-1325.
- Souza-Filho, P. W. M. et al. 2016. Four decades of land-cover, land-use and hydroclimatology changes in the Itacaiúnas River watershed, southeastern Amazon. – J Environ Manage 167: 175-184.
- Taylor, W. C. e Luebke, N. T. 1986. Germinating Spores and Growing Sporelings of Aquatic *Isoëtes*. – Am Fern J 76: 21-24.

Thomaz, S. M. et al. 2003. Macrófitas aquáticas em Itaipu: ecologia e perspectivas para o manejo. – In: Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas. Editora da Universidade Estadual de Maringá, pp. 319-341.

Wetzel, R. G. e Likens, G. E. 1991. Inorganic Nutrients: Nitrogen, Phosphorus, and Other Nutrients. – In: Wetzel, R. G. and Likens, G. E. (eds), Limnological Analyses. Springer, pp. 81-105.

Wood, D. et al. 2020. Phylogenomics indicates the “living fossil” *Isoëtes* diversified in the Cenozoic. – PLoS ONE 15: e0227525.

Woolway, R. I. et al. 2021. Lake heatwaves under climate change. – Nature 589: 402-407.

Zhao, G. et al. 2022. Evaporative water loss of 1.42 million global lakes. – Nat Commun 13: 3686.

## CAPÍTULO 9

---

---

# Colonização Assistida como Estratégia de Conservação de Macrófitas Endêmicas: *Isoëtes cangae* como Estudo de Caso na Floresta Nacional de Carajás

\* Emiliano Nicolas Calderon \* Anderson da Rocha Gripp \* Cecilio Caldeira  
\* Daniel Basílio Zandonadi \* Luis Alfredo Santos Prado  
\* Fernando Marino Gomes dos Santos \* Mariana Huguet  
\* Markus Gastauer \* Silvio Ramos \* Rodrigo Lemes Martins

TÍTULO CURTO (*RUNNING TITLE*)

---

---

Colonização Assistida para Conservação de  
Macrófitas Endêmicas

## Resumo

Rápidas e profundas mudanças têm alterado os ecossistemas ao redor do globo, impondo a diversas espécies algum risco de extinção. Para evitar mais perdas, a comunidade científica tem avançado no desenvolvimento de protocolos de colonização assistida, considerando a biologia e os aspectos ecológicos dos ambientes nativos e receptores. Um exemplo é o caso da espécie endêmica *Isoetes cangae*, restrita a um único lago. Em cinco anos de estudos, foi gerado vasto conjunto de técnicas de manejo de *I. cangae*, visando à sua conservação por colonização assistida. Foram estudados aspectos sobre a biologia da espécie e a ecologia dos ambientes visando manter uma segurança ambiental em todo o processo, tanto para a espécie-alvo quanto para os possíveis ambientes receptores. Foram avaliadas características físicas, químicas e biológicas dos ambientes e como essas podem afetar o desenvolvimento de *I. cangae*, e vice-versa, buscando prever possíveis impactos de uma eventual ação de manejo, assim como o seu sucesso. Os resultados obtidos nos estudos de colonização, considerando ambientes com características opostas, proporcionaram melhor entendimento dos limites fisiológicos da espécie, além de servirem como parâmetro de comparação para futuros estudos de introdução assistida. Espera-se que estes estudos representem uma referência para a conservação de macrófitas aquáticas endêmicas no território brasileiro e em outras partes do mundo.

**Palavras-chave:** ecologia aplicada; herbivoria; manejo; mesocosmo; microendemismo.

## 9.1 Introdução

O mundo está em constante transformação, vivenciada de forma particularmente rápida e profunda a partir da segunda metade do século XVIII, com o início da Revolução Industrial (Albritton Jonsson 2012). As rápidas e profundas mudanças vivenciadas têm alterado os ecossistemas ao redor do globo, impondo a diversas espécies algum risco de extinção. No entanto, para muitas espécies, pode ser difícil ou mesmo inviável se aclimatizar ou adaptar a essas novas condições por conta própria, principalmente considerando a velocidade das mudanças. Para reduzir o risco de perda de espécies e preservar a biodiversidade é necessária, por vezes, a intervenção humana, traduzida por ações efetivas e direcionadas de conservação. Dentre elas, as ações que utilizam abordagens de translocação conservacionista são particularmente promissoras por permitir a migração controlada para novo hábitat e/ou resgate de hábitats anteriores.

A translocação é um termo abrangente que pode ser definido como sendo o movimento deliberado de um organismo de um local para outro, com as condições necessárias para a sua persistência, pela ação humana (IUCN 2013). Aplicada em um contexto conservacionista, a translocação busca obter resultados positivos de conservação em escala populacional ou ecossistêmica, e não apenas para o organismo translocado.

A translocação pode ser empregada em área compreendida dentro do limite da distribuição nativa da espécie como ferramenta para restauração populacional por reintrodução ou mesmo aumento do número de espécimes da população nativa ainda existente (IUCN 2013). Resultados dessas iniciativas, se positivas, podem ser entendidos como uma melhoria no *status* de conservação da espécie-alvo, em escala local ou global, e/ou a restauração dos processos e a funcionalidade natural do ecossistema para onde a espécie é translocada (Consorte-McCrea et al. 2014). Entretanto, a translocação também pode ser realizada em área fora do limite original de sua ocorrência natural com o objetivo de evitar a extinção de uma população ou espécie (IUCN 2013). Neste último, o processo de translocação é definido como colonização assistida (Brodie et al. 2021a), também referenciada como migração assistida ou relocação gerenciada.

Apesar de a colonização assistida ser uma abordagem promissora e inovadora para salvar populações e espécies em risco de extinção, alterações dos limites naturais das espécies podem afetar a manutenção da biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas (Essl et al. 2019), uma vez que invasões ou introduções de espécies exóticas podem ser importantes causas de

perda da biodiversidade (Ricciardi e Simberloff 2009a, b, WWF 2020). Neste contexto é extremamente importante que a colonização assistida seja conduzida de forma experimental e controlada para minimizar qualquer tipo de risco não mapeado, embora a maioria das espécies raras e endêmicas sejam ameaçadas por fatores intrínsecos de sua natureza ecológica, que as caracteriza como pouco susceptíveis a se tornarem invasoras (Brodie et al. 2021a).

Embora a prática da translocação de plantas remonte aos anos 1950 em algumas partes do mundo (Willis 1951), inicialmente poucos documentos científicos ou registros estavam disponíveis, e os primeiros esforços para reintroduzir espécies vegetais na natureza fracassaram (Stuwe 1980). Mais recentemente os profissionais refinaram a prática da reintrodução e compartilharam suas experiências em prol da melhoria das práticas futuras, em publicações isoladas (Morgan 1999, Drayton e Primack 2012, Reiter et al. 2016) ou revisões bibliográficas e livros que tratam especificamente do tema (Noss et al. 1996, Pavlik 1996, Seddon 2010, Godefroid et al. 2011, Brodie et al. 2021a, b, Ricciardi e Simberloff 2021). Atualmente, a translocação de plantas vem se tornando uma abordagem padrão de mitigação, na qual grandes projetos desenvolvimentistas têm seus impactos sobre populações de espécies raras e ameaçadas associados a práticas de translocações conservacionistas como parte de uma hierarquia de mitigação de impactos (Arlidge et al. 2018).

Por tratar-se de uma prática inerentemente complexa, especialmente para espécies ameaçadas, raras e endêmicas, sua regulação por legislações específicas é algo relativamente recente, como o Endangered Species Act dos Estados Unidos (1973, revisado em 1988) e o EPBC Act (1999) do governo australiano (McDonald 1996, Nally et al. 2018). Para esses países, existem protocolos e guias, que já fornecem a base para a definição de procedimentos seguros para essa prática, dentre os quais podemos citar os guias produzidos na Austrália (Commander et al. 2018) e nos Estados Unidos (Maschinski e Albrecht 2017). Nesses países já existem até mesmo centros e redes especializadas em estudar e produzir protocolos de reintrodução de espécies ameaçadas.

No contexto brasileiro, não existe legislação específica que trate da reintrodução de espécies nativas, raras e ameaçadas e que permita nortear todo o processo dentro de uma norma governamental. Mesmo não havendo normas, o Brasil é signatário de protocolos internacionais como a CDB (Convenção sobre Diversidade Biológica) e a GSPC (da sigla em inglês que significa Estratégia Global para Conservação de Plantas), bem como compromissos assumidos pela Vale de não admitir perdas líquidas de biodiversidade que suportam esse tipo de pesquisa. Cabe destacar ainda que, com base no pre-

ceito constitucional que veda as práticas que possam causar extinção de espécies (inciso VII do § 1º do art. 225), associado ao regramento do Plano de Manejo atual da Flona de Carajás, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) tem adotado a premissa de que o avanço de atividades minerárias não poderá causar extinção local na unidade.

Há, portanto, uma necessidade imperativa de planejar, regulamentar e implementar projetos e protocolos de colonização assistida, desenvolvidos, avaliados e monitorados com a participação de instituições de pesquisa, organizações intergovernamentais, órgãos estatutários e dos tratados internacionais dos quais o Brasil é signatário.

Os protocolos de colonização assistida devem contemplar a avaliação de risco da atividade e os programas de monitoramento para avaliação de sua eficiência. Em conjunto e com análises de risco, a avaliação contínua por monitoramento pode ajudar a dimensionar os possíveis impactos derivados do próprio manejo das espécies alvo de conservação, o sucesso e a eficiência da ação de manejo realizada. O exemplo de *Isoëtes cangae* abrange as questões abordadas sobre colonizações assistidas, pois se trata de uma espécie endêmica, ameaçada e restrita a um único lago alvo de futura exploração mineral dentro da Flona de Carajás (Pereira et al. 2016, Lansdown 2019), sendo a área atualmente bloqueada para a exploração mineral justamente devido à presença da espécie *I. cangae*. Por ser uma Unidade de Conservação (UC) de Uso Sustentável, em seu interior são permitidas atividades minerárias, desde que não comprometam a conservação das espécies presentes. Contudo, como esse caso confere um nítido conflito dos objetivos da UC, faz-se necessário o uso de estratégias de manejo idealizadas e em desenvolvimento (dentre elas a colonização assistida) para a conservação dessa espécie. É premente desenvolver, testar e discutir a eficácia dos procedimentos iniciais viabilizados para essa finalidade ao longo dos últimos anos, temas abordados a seguir, no presente capítulo.

## 9.2 Técnicas de Colonização Assistida e Modelos Experimentais: O Caso de *Isoëtes cangae*

Para desenvolver as técnicas, planejar e implementar uma medida de colonização assistida de determinada espécie é fundamental ter profundo conhecimento sobre sua ecologia e biologia. Também é necessário conhecer aspectos ecológicos do ambiente nativo e do ambiente receptor, como sua estruturação e dinâmica. Esse conhecimento é fundamental não só para o sucesso inicial da colonização, mas também para contribuir na previsão dos

desdobramentos oriundos do processo de colonização assistida tanto para a população translocada quanto para o ambiente receptor. Neste contexto, dado todo o conjunto de conhecimentos apresentados sobre os possíveis ambientes receptores, esses têm sido intensamente avaliados e monitorados (capítulo 2), juntamente com a biologia da espécie-alvo e seus aspectos genéticos (capítulo 4), fisiológicos (capítulo 5), reprodutivos (capítulo 7), além das condições de cultivo (capítulo 6). Assim, o presente capítulo irá focar nos experimentos manipulativos e no teste de técnicas de colonização assistida, realizados em campo e no laboratório.

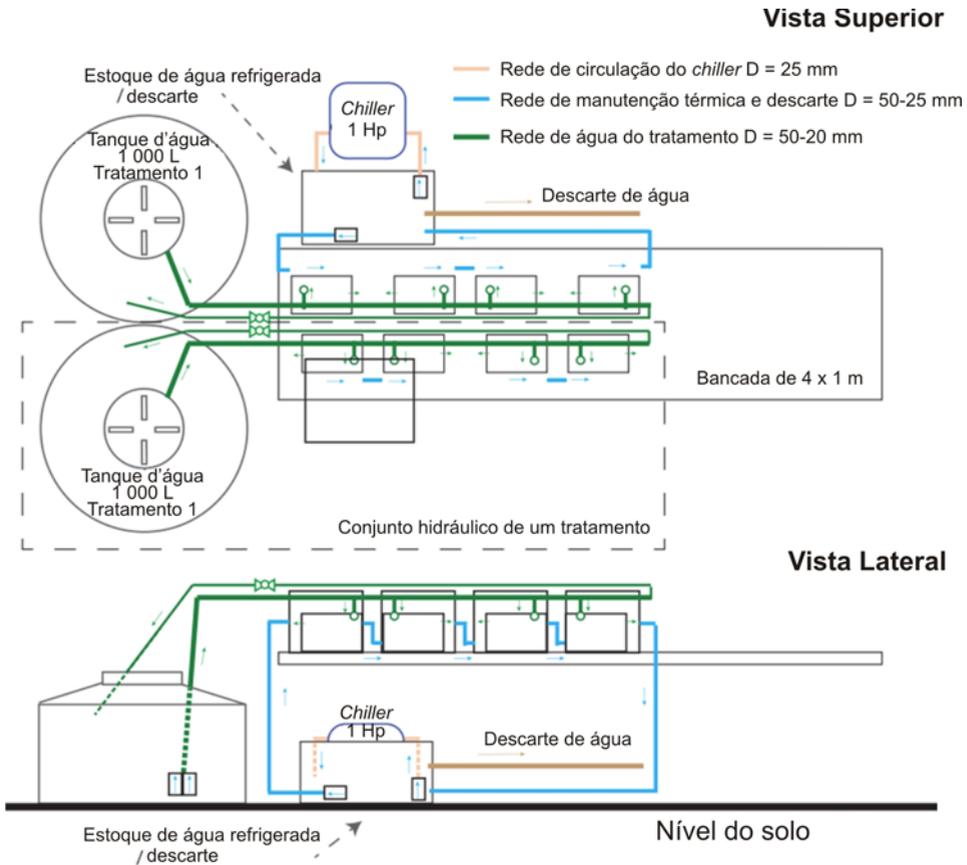
### 9.3 Experimentos em Mesocosmo *Ex Situ* e *In Situ*

Sobre a biologia da espécie, inicialmente foi testada qual seria a resposta de atributos ecológicos e fisiológicos básicos de *I. cangae* em face das condições ambientais oferecidas pelos ambientes presentes na Flona de Carajás. Visando realizar os testes da forma mais fidedigna, garantindo a segurança ambiental, foram utilizados sistemas de mesocosmo *in situ* e *ex situ*, além de outros experimentos de interação com o ambiente. Sistemas de mesocosmo têm sido amplamente utilizados para o estudo de organismos aquáticos, inclusive de macrófitas aquáticas como isoetáceas (Rhazi et al. 2009). Mesocosmos (o termo deriva de meso = “meio” e cosmo = “mundo”) constituem sistemas artificiais que simulam, em algum grau, as características do ambiente de interesse, seja ele alguma condição abiótica e/ou a ocorrência de algum(ns) organismo(s). Esses sistemas podem ser utilizados fora ou dentro do sistema de interesse, sendo assim chamados mesocosmos *ex situ* ou *in situ*, respectivamente. Têm como vantagens a possibilidade de simular de forma fidedigna as condições ambientais a serem avaliadas, mantendo-se ainda certo controle de variáveis específicas, de acordo com o experimento que está sendo realizado e características do sistema de mesocosmo.

Os experimentos de mesocosmo *ex situ* e *in situ* foram realizados nos anos de 2018 e 2019, buscando compreender como *I. cangae* responde às condições ambientais de ecossistemas aquáticos típicos da Serra dos Carajás (*in situ*). Adicionalmente foi realizado um experimento utilizando mesocosmos *ex situ* montado na área do Viveiro Florestal da Vale, em Serra Norte. Foram utilizados quatro conjuntos hidráulicos independentes, ou tratamentos simulando as condições:

- (1) do Lago do Amendoim, o ambiente de ocorrência natural de *I. cangae*, funcionando como tratamento controle;
- (2) do corpo 3 do Lago das Três Irmãs, ambiente natural que apresenta características semelhantes às do Lago do Amendoim, entretanto, sem registro de ocorrência de *I. cangae*;
- (3) da Barragem do Gelado, ambiente seminatural, formado pelo barramento das águas do Rio Gelado com sedimento composto em sua maioria por material inerte, oriundo da mineração de ferro, com características bem diferentes se comparado ao ambiente de origem da planta;
- (4) condição artificial, produzida com água bombeada diretamente do lençol freático que abastece o Viveiro Florestal e com sedimento composto por uma mistura do substrato comercial Jiffy® (turfa de *Sphagnum*) e fragmentos de canga (proporção de 3:1).

Cada conjunto hidráulico possuía uma distribuição de água independente para cada um dos quatro aquários de ensaio de 25 L e rede mista de climatização e descarte de água para manter a temperatura dos ensaios condizente com a do ambiente natural. Os aquários de ensaio constituíram blocos independentes, já que a água proveniente do reservatório era descartada logo após passar pelos aquários, com taxa de renovação de água de 1x dia o seu volume (25 L cada), requerendo que o sistema fosse abastecido semanalmente com cerca de 700 L de água de cada um dos corpos d'água/condição testada (figura 9.1). Em cada tratamento, foram plantados 24 espécimes em recipientes individuais, contendo o substrato de cada um dos ambientes/condições testadas, e distribuídos nos aquários de ensaio (seis espécimes por aquário; figura 9.2). Os tratamentos experimentais foram mantidos por 38 dias, sendo monitorados aspectos morfofisiológicos, como o surgimento de novas folhas, o seu crescimento linear e a sobrevivência dos espécimes. O tamanho das raízes foi avaliado no início e no final do experimento. Também foram monitorados parâmetros físicos e químicos da água dos tratamentos aplicados: pH, condutividade elétrica, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura e incidência luminosa.



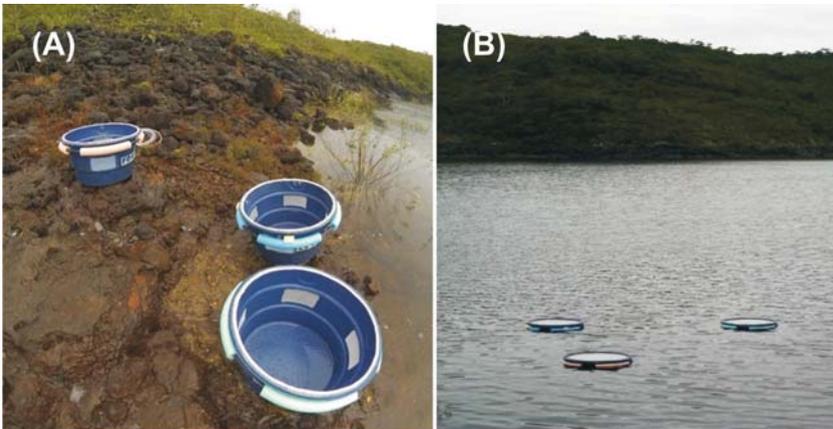
**Figura 9.1** Planta esquemática, em escala, do sistema de mesocosmo *ex situ* montado no Viveiro Florestal da Vale, em Serra Norte, Carajás. São apresentadas a vista superior e a lateral de apenas um par de conjuntos hidráulicos (tratamentos) com o sistema de controle térmico e descarte da água. No total, foram montados dois pares de conjuntos hidráulicos. Setas coloridas indicam a direção de movimento da água.



Figura 9.2 Espécimes de *I. cangae* utilizados na montagem do experimento *ex situ* de tratamentos simultâneos realizado no sistema montado no Viveiro Florestal, Serra Norte, Carajás.

Em sequência ao estudo de mesocosmo *ex situ*, foram preparados os mesocosmos para montagem do experimento *in situ*, visando avaliar o resultado de interações entre *I. cangae*, as condições e os organismos presentes nos ambientes testados. Esses mesocosmos consistiam em caixas d'água

plásticas (PVC) de 100 L com quatro aberturas laterais revestidas por tela de plâncton de 300  $\mu\text{m}$ . A abertura superior das caixas também foi revestida com tela de 300  $\mu\text{m}$ , fixada por um aro de PVC removível (figura 9.3A). Isto permitiu a entrada de luz e a circulação de água e ar entre o interior e o exterior do mesocosmo, impedindo, entretanto, a liberação de gametas femininos de *I. cangae* no ambiente testado. Os mesocosmos foram mantidos rente à superfície da água por meio de flutuadores de poliuretano expandido, mantendo as plantas em seu interior sempre na mesma profundidade em todos os locais testados (figura 9.3B). Em cada mesocosmo foram cultivados dez espécimes de *I. cangae* no sedimento do próprio corpo hídrico que o recebeu, coletado e depositado no fundo das caixas no momento da montagem, formando uma camada de aproximadamente 6 cm. A biomassa equivalente de macrófitas encontradas nos ambientes testados também foi cultivada no mesocosmo, mimetizando as possíveis interações competitivas, exceto para o Lago Três Irmãs – corpo 3, onde não foram encontradas macrófitas. Os mesocosmos foram mantidos nos ambientes testados (lagos do Amendoim, Três Irmãs – corpo 3 e Barragem do Gelado) por aproximadamente 70 dias. Os espécimes de *I. cangae* foram avaliados no início e no final do experimento, e os parâmetros físicos e físico-químicos foram avaliados semanalmente, sendo esses os mesmos mensurados no experimento de mesocosmo *ex situ*.

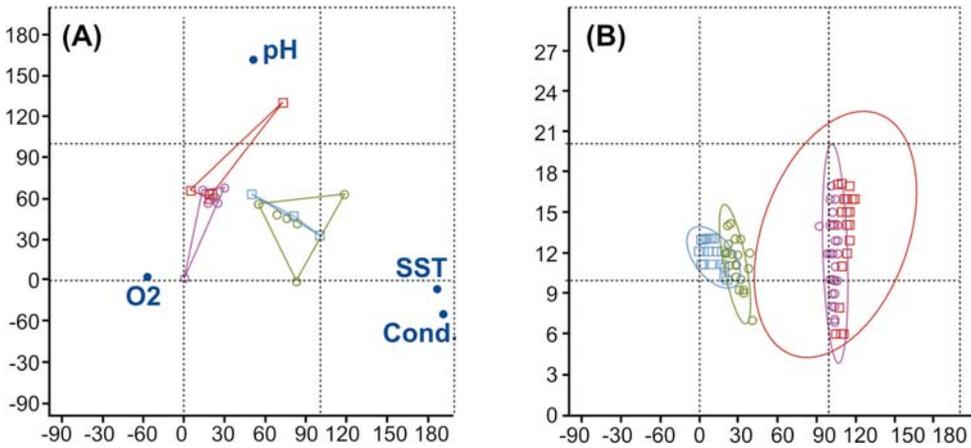


**Figura 9.3** Sistemas de mesocosmo utilizados no experimento *in situ*: (A) antes de serem instalados no Lago do Amendoim; (B) já posicionados na lâmina d'água do Lago do Amendoim, Serra Sul, Carajás, PA.

Análises uni e multifatoriais foram utilizadas para evidenciar padrões de característica ambiental, resposta dos organismos e significância das diferenças nos parâmetros avaliados. Os parâmetros ambientais mensurados nos sistemas de mesocosmo foram comparados com os mensurados nos ambientes naturais, não sendo observadas diferenças relevantes. Essas comparações validaram a reprodutibilidade do ambiente natural dos lagos e barragem dentro dos mesocosmos *in situ* e *ex situ*. A seguir são apresentados os principais resultados desses experimentos.

#### 9.4 Resultado do Mesocosmo *In Situ* e *Ex Situ*

O conjunto dos dados das características físico-químicas da água separou os ambientes/condições em dois grupos distintos. Um constituído pelos lagos do Amendoim e Três Irmãs – corpo 3, caracterizado por menor condutividade, sólidos solúveis totais e pH; e outro formado pela Barragem do Gelado e tratamento artificial, com maiores valores dessas variáveis. Esse padrão foi observado tanto no ambiente natural quanto nos tanques de ensaio do mesocosmo *ex situ* (figura 9.4AB). Quanto à temperatura, os tratamentos foram ajustados usando como referência os dados obtidos nos ambientes naturais nos meses que antecederam a realização do estudo. Os espécimes do tratamento da Barragem do Gelado experimentaram uma temperatura significativamente maior do que os demais. Para a luminosidade, as variações temporais observadas são atribuídas a irradiação solar incidente na região e a transparência da água dos ambientes/tratamentos, sendo as variações observadas naturais e esperadas. Devido às características de transparência da água, as plantas do tratamento artificial vivenciaram aproximadamente o dobro de intensidade luminosa que as plantas dos tratamentos do Amendoim e do Três Irmãs, enquanto as plantas do tratamento do Gelado vivenciaram luminosidade intermediária. Esse gradiente de irradiância seguiu o padrão de concentração de partículas da água, maior na Barragem do Gelado, e menor na água do tratamento artificial. Para os mesocosmos *in situ*, as características ambientais foram exatamente as mesmas vivenciadas no ambiente natural, visto que os sistemas encontravam-se imersos nesses ambientes.



**Figura 9.4** Resultado das análises discriminantes, evidenciando os dois grupos de ambientes bem distintos. Vermelho – Três Irmãs – corpo 3; Rosa – Amendoim; Verde – Gelado; Azul – artificial, para: (A) ambientes naturais, autovalores: eixo 1 = 0,156; eixo 2 = 0,041; (B) ambiente experimental em mesocosmo, autovalores: eixo 1 = 0,193; eixo 2 = 0,001. Elipses delimitam 95 % de confiança.

A avaliação da resposta fisiológica de *I. cangae*, analisada pelos vários aspectos do desenvolvimento dos espécimes, mostrou diferenças significativas entre tratamentos. As diferenças observadas nos tratamentos aplicados no mesocosmo *ex situ* foram relacionadas com a similaridade das condições testadas, enquanto no experimento *in situ*, o resultado foi explicado pela similaridade das condições ambientais somadas às interações competitivas testadas. A seguir são apresentados os resultados dos diferentes aspectos morfofisiológicos analisados nos espécimes de *I. cangae*.

Para a taxa de crescimento e comprimento foliar, a partir de 24 dias no mesocosmo *ex situ*, a taxa de crescimento das folhas novas foi significativamente maior nos tratamentos lagos do Amendoim e Três Irmãs – corpo 3. No experimento de mesocosmo *in situ*, o comprimento alcançado pelas folhas dos espécimes de *I. cangae* também apresentou diferenças significativas considerando os diferentes tratamentos. As plantas do Lago Três Irmãs alcançaram o maior comprimento, seguido do tratamento do Lago do Amendoim, e com o tratamento da Barragem do Gelado alcançando os menores comprimentos de folha (figura 9.5). Ao longo do experimento de mesocosmo *ex situ*, foi observada uma taxa de surgimento de folhas novas significativamente maior nos espécimes do tratamento do Amendoim em comparação aos demais tratamentos. O surgimento de folhas foi assumido como uma resposta direta às condições do ambiente. Diferentemente, o experimento *in situ* evidenciou que

apenas o tratamento do Lago Três Irmãs apresentou uma taxa de surgimento de folhas novas significativamente maior do que o dos demais, considerando apenas a última semana de experimento (figura 9.6).

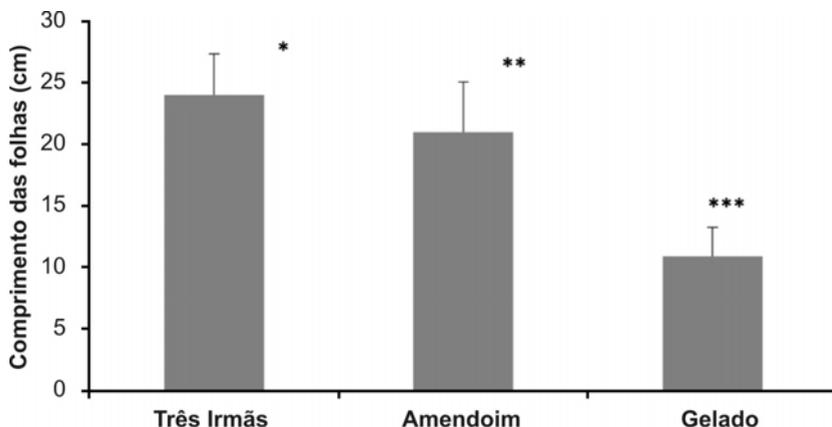


Figura 9.5 Média do tamanho das folhas nos espécimes de *I. cangae* mantidos nos mesocosmos do experimento *in situ*, nos três ambientes testados – lagos Três Irmãs, Amendoim e Barragem do Gelado, Carajás, PA. Barras de erro indicam desvio-padrão. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes.

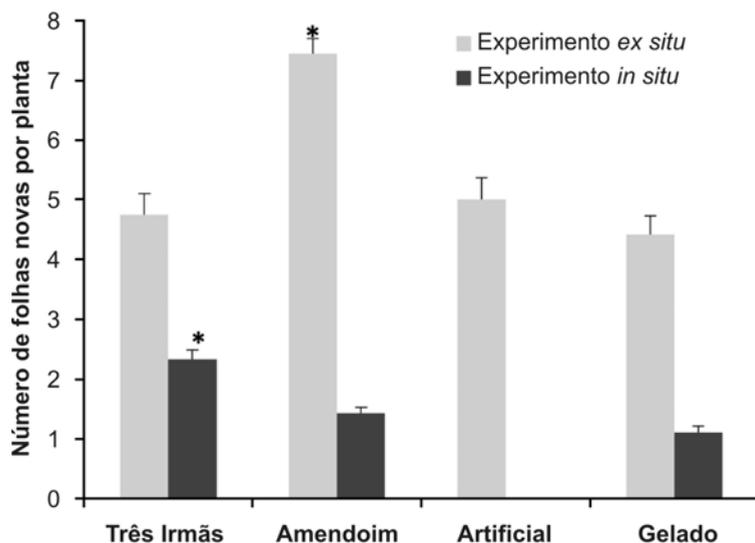


Figura 9.6 Média do número de folhas novas nos espécimes de *I. cangae* dos experimentos de mesocosmos *ex situ* e *in situ*, nos diferentes tratamentos aplicados: Lagos Três Irmãs e do Amendoim, Barragem do Gelado, e condição artificial. Barras de erro indicam desvio-padrão. Asterisco indica diferença estatisticamente significativa entre tratamentos de uma mesma rodada de mesocosmo.

Nos espécimes de *I. cangae* do experimento *in situ*, o número total de folhas apresentou, no mesmo tempo, o mesmo comprimento das folhas entre os diferentes tratamentos. No Lago Três Irmãs, os espécimes apresentaram o maior número de folhas, seguido do Lago do Amendoim. Os espécimes da Barragem do Gelado apresentaram o menor número de folhas entre todos os tratamentos (figura 9.7).

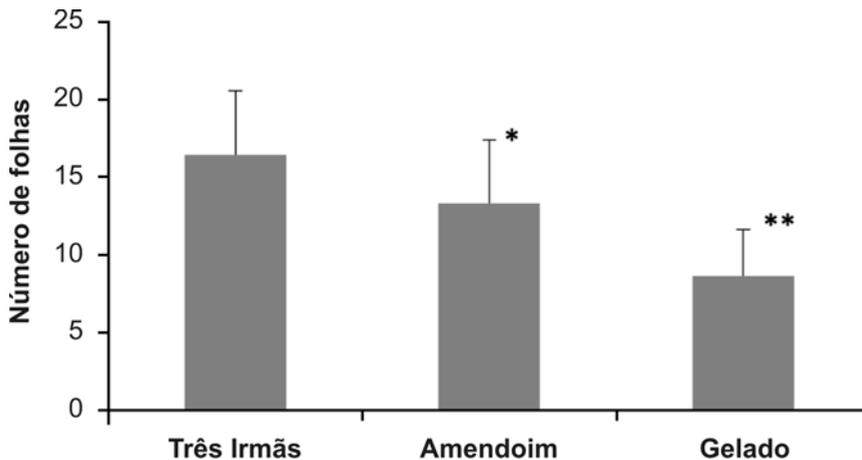


Figura 9.7 Média do número de folhas dos espécimes de *I. cangae* mantidos nos mesocosmos do experimento *in situ*, nos três ambientes testados – lagos Três Irmãs, do Amendoim, Barragem do Gelado; realizado de janeiro a março de 2019, em Carajás, PA. Barras de erro indicam desvio-padrão. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes.

## 9.5 Aclimação de *I. cangae* em Piscinas no Viveiro de Mudanças da Vale em Carajás

A obtenção de plantas propagadas *ex situ* permite a realização de ensaios tanto em condições controladas quanto em ambiente natural, sem a necessidade de coletas no Lago do Amendoim. Essa ação reduziu a possibilidade de perdas de materiais genéticos da população nativa e conferiu conhecimento prático de manipulação e produção de espécimes. Uma vez estabelecido o protocolo de propagação *ex situ* e ampliada a capacidade de geração de novas plantas de *I. cangae* em nossos laboratórios, foram gerados milhares de novos indivíduos propagados em condições controladas.

Além da alta produção de propágulos, foi elaborado um sistema de aclimação dessas novas plantas de *I. cangae* obtidas em laboratório com o objetivo de aumentar as chances de sucesso de crescimento e sobrevivência nos

estudos de colonização assistida. Para tal, piscinas de PVC com capacidade de aproximadamente 2 400 L foram instaladas no viveiro de mudas da Vale na Serra Norte, em Carajás. Neste protocolo, após crescimento inicial em laboratório, as plantas são transferidas para Carajás com um número entre 12 e 18 folhas, tamanho que permite fácil manipulação e armazenamento em grandes quantidades em espaço reduzido para transporte. Nas piscinas, com o objetivo de avaliar o crescimento e estabelecer o contato com a biota do ambiente de ocorrência natural, o substrato para cultivo das plantas é preparado, usando-se uma fina camada de substrato orgânico comercial (Bioflora) ao fundo da piscina, posteriormente recoberto com sedimentos coletados no fundo do Lago do Amendoim, e cheias de água (a mesma fonte de água usada para manutenção de demais plantas no viveiro). Por fim, as mudas de *I. cangae* produzidas são fixadas gentilmente no fundo da piscina, mantendo um espaçamento de 10 cm entre plantas na mesma linha e entre as linhas (figura 9.8). As piscinas são, então, recobertas por uma tela de proteção para evitar a queda de materiais oriundos dos arredores e para limitar o acesso de animais.



**Figura 9.8** Piscina de aclimação de *Isoetes cangae* no viveiro de mudas da Vale em Serra Norte, Carajás. (A) Piscina com plantas jovens de *I. cangae*. (B) Detalhe do plantio no fundo da piscina. (C) Planta adulta de *I. cangae* após três meses de aclimação na piscina.

O período de aclimação normalmente dura cerca de três meses. A taxa de sobrevivência das plantas nessas condições tem sido de quase 100 %, e mais de 2 mil novas plantas já foram transferidas dos laboratórios para Carajás. Esses resultados reforçam a capacidade adaptativa da *I. cangae* e fornecem as plantas que são a base para os estudos de colonização assistida nos diferentes ambientes.

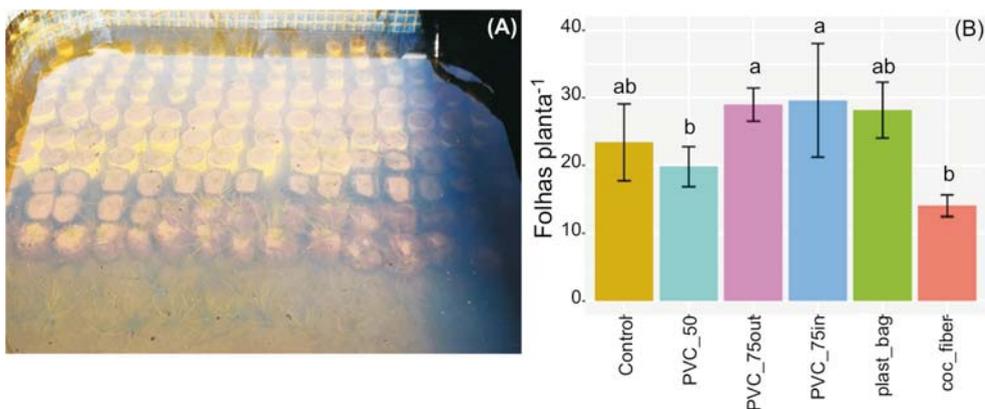
## 9.6 Ensaio com Diferentes Recipientes de Cultivo durante Aclimação

O processo de retirada das plantas das piscinas, o preparo dos recipientes com as plantas, o transporte até o local de plantio e o plantio em si podem causar injúrias nessas plantas e/ou trazer algum nível de estresse que poderá reduzir a *performance* delas ao serem introduzidas em novo ambiente. Com o intuito de reduzir esse estresse às plantas e facilitar o plantio nos lagos, foi avaliada uma série de recipientes de crescimento durante a aclimação nas piscinas, período que antecede a transferência para o campo. Nesse estudo, além do tratamento controle com plantio diretamente na piscina, foram avaliados cinco recipientes, sendo:

- R1 – tubo de PVC com diâmetro 50 mm e 10 cm de altura, com base envolvida em fibra de coco;
- R2 – tubo de PVC com diâmetro 75 mm e 10 cm de altura, com base envolvida em fibra de coco;
- R3 – tubo de PVC com diâmetro 75 mm e 10 cm de altura, forrado internamente em fibra de coco;
- R4 – saco plástico (a ser substituído por biodegradável), usado na produção de mudas;
- R5 – saco de fibra de coco (preparado manualmente) com dimensões similares ao saco plástico.

O substrato empregado em todos os recipientes foi composto de uma mistura de Bioflora (comercial), lago temporário N3, sedimentos do Lago do Amendoim e canga granular na proporção 2:4:2:1. Todos os tratamentos foram compostos por 50 plantas de cada recipiente (25 unidades em cada piscina), exceto o tratamento em sacos de fibra de coco, para o qual foram preparados 25 exemplares (figura 9.9A). As plantas foram previamente selecionadas para plantio com dez a doze folhas. Após seis meses de cultivo,

as plantas nos maiores recipientes apresentaram crescimento superior às demais (figura 9.9B), não diferindo das plantas que foram fixadas diretamente no leito da piscina. Possivelmente, a restrição imposta pelos menores recipientes ao sistema radicular das plantas reduziu a capacidade de crescimento e a emissão de novas folhas. Novas etapas desse estudo permitirão avaliar o efeito do recipientes durante o transporte e plantio em ambiente natural, em que será verificada a possibilidade de redução de estresse às plantas e a facilidade de plantio devido à manutenção da integridade do sistema radicular após remoção dos tubos de PVC.



**Figura 9.9** (A) Plantas de *Isoetes cangae* durante o período de aclimação em piscina no viveiro de mudas de Carajás. (B) Detalhes dos diferentes recipientes empregados para cultivo das plantas. Número de folhas após seis meses de cultivo. As barras representam os valores médios seguidos pelo desvio-padrão, enquanto as mesmas letras representam valores médios sem diferenças significativas entre si após teste *post hoc* de Tukey a 95 % de probabilidade.

## 9.7 Experimento de Herbivoria *In Situ*

Outro aspecto relevante da colonização assistida em um novo ambiente está relacionado às interações ecológicas que irão se estabelecer entre a espécie manipulada e as já residentes no novo ambiente. Esta possibilidade, além de representar uma ameaça para o sucesso da colonização assistida, pode gerar um desequilíbrio na comunidade nativa. Com o objetivo de avaliar esses aspectos, foram realizados experimentos para detectar e caracterizar possíveis pressões sobre as populações de *I. cangae*. Assim, buscou-se detectar a ocorrência de herbivoria e outras interações sobre *I. cangae* nos ambientes estudados. Os experimentos realizados avaliaram o consumo de um

plântio padronizado de *I. cangae* e sua avaliação por filmagem subaquática estacionária em diferentes pontos do Lago Três Irmãs – corpos 1, 2 e 3; na Barragem do Gelado; e no Lago do Amendoim como área de controle (figura 9.10). Técnicas de filmagem subaquática para estudo da fauna aquática têm sido amplamente empregadas nos últimos anos com grande sucesso, principalmente no ambiente marinho (Mallett e Pelletier 2014).



**Figura 9.10** Espécimes de *I. cangae* montados em estrutura de PVC 100 mm, antes de seu posicionamento sobre o substrato, em um dos pontos localizados próximo à margem do Lago Três Irmãs – corpo 1, como parte do experimento de herbivoria *in situ*.

A ação de herbívoros foi detectada pelo corte das pontas das folhas e/ou redução em seu comprimento devido a mordidas. Os espécimes instalados foram avaliados periodicamente, em intervalos variando de seis horas a três dias, dependendo da viabilidade logística para realização dessa avaliação. Posteriormente, com 40 dias, foi realizada nova avaliação dos espécimes remanescentes.

A avaliação da ação de herbívoros nos três corpos do Lago Três Irmãs mostrou variações espaciais e temporais, em diferentes escalas. Nos corpos 1 e 2 do lago, não foi observada ocorrência de herbivoria durante os três primeiros dias de avaliação, entretanto, na avaliação de 40 dias, foi observado o consumo total dos espécimes de *I. cangae* ofertados. Já no corpo 3, foi observado o consumo parcial ou total das folhas dos espécimes ofertados, em parte dos pontos de avaliação, até o terceiro dia de acompanhamento. Com 40 dias, todos os espécimes em todos os pontos de avaliação no corpo 3 tinham sido consumidos pelos herbívoros. Na Barragem do Gelado, foi observada herbivoria parcial e pontual, com o consumo da ponta de uma ou outra folha dos espécimes ofertados durante todo o período de avaliação. Para o ambiente nativo de *I. cangae*, Lago do Amendoim, não foi observada a ação de herbívoros durante todo o estudo. De fato, no Lago do Amendoim, há grande cobertura de macrófitas; assim, os eventuais herbívoros presentes têm uma ampla oferta de alimento. Adicionalmente, não foi observada a presença de ictiofauna nesse ambiente durante a realização dos estudos, e os registros pretéritos indicam a presença de apenas uma espécie desse grupo no ambiente, o peixe onívoro, conhecido como muçum (*Synbranchus marmoratus*). Em suma, esse conjunto de informações permite concluir que a pressão de herbivoria sobre *I. cangae* no Lago do Amendoim é inexistente ou extremamente baixa.

Na Barragem do Gelado, o forrageio parcial ou pontual das folhas dos espécimes de *I. cangae* cultivados não parece comprometer a viabilidade no desenvolvimento da planta, mesmo considerando período mais longo de observação (40 dias). É observada a presença de macrófitas nas margens rasas da barragem, e algumas espécies de peixes também são observadas. Assim, o ambiente apresenta uma oferta considerável de alimento para organismos herbívoros, sem ter a presença notável de herbívoros durante a realização dos estudos. De fato, o consumo parcial e/ou esporádico de algumas das folhas dos espécimes de *I. cangae* ofertados pode ser ocasionada por ingestão acidental ou ocasional causada por organismos onívoros ou invertívoros. Assim, *I. cangae* não mostrou ser item alimentar preferencial para os organismos presentes na barragem, não sendo a pressão de forrageio fator limitante para o seu desenvolvimento neste ambiente.

No Lago Três Irmãs, foi observada forte pressão de herbivoria, mostrando uma variação espaço-temporal entre os três corpos (1, 2 e 3), e dentro do corpo 3, caracterizando diferentes escalas espaciais. Os resultados encontrados no estudo indicaram que não seria viável realizar a introdução de *I. cangae* no Lago Três Irmãs diante da pressão de herbivoria identificada. A manutenção de espécies de *I. cangae* nesse ambiente só seria possível com a utilização de uma proteção física para impedir o forrageio dos herbívoros. O padrão espaço-temporal do forrageio no corpo 3 do Três Irmãs mostrou que:

- i) a distribuição dos herbívoros é heterogênea;
- ii) é localmente condicionada pela oferta pretérita de alimento.

A avaliação realizada nos três primeiros dias de estudo nos corpos 1, 2 e 3 apresentou um quadro de variação espacial da herbivoria no Lago Três Irmãs, o que, provavelmente, poderia estar relacionado:

- i) à distribuição heterogênea dos herbívoros;
- ii) ao condicionamento local diferenciado dos herbívoros, e/ou
- iii) à baixa visibilidade da água nos corpos 1 e 2, que dificultaria a localização das plantas de *I. cangae* pelos herbívoros.

No Lago Três Irmãs – corpo 3, área de maior forrageio, a identificação do herbívoro, a avaliação de seu comportamento de forrageio, e a magnitude potencial de sua pressão como consumidor de *I. cangae* indicaram que *Coptodon rendalli*, conhecida como tilápia-do-peito-vermelho, tilápia-vermelha ou tilápia-do-congo, é o organismo responsável pelo forrageio de *I. cangae*. Foram observadas agregações de até 20 espécimes de *C. rendalli* em um raio de aproximadamente 0,5 m dos espécimes de *I. cangae*, tendo suas folhas totalmente consumidas em poucos minutos. O comportamento apresentado por *C. rendalli* sugeriu um condicionamento progressivo, com os espécimes de *C. rendalli* se aproximando mais rapidamente e em maior número a cada introdução de *I. cangae*.

A espécie *C. rendalli* é um ciclídeo (Cichlidae, Teleostei, Actinopterygii) nativo da porção sul do continente africano, sendo naturalmente encontrada a partir do meio da bacia do Rio Congo até a parte superior das áreas de Lualaba e Bangweulu. Pode chegar a medir 45 cm e pesar 2,5 kg, e alcançar sete anos de idade (<https://www.fishbase.se/summary/1397>), formando cardumes com atividade diurna, preferencialmente em áreas marginais de rios e lagos com alta cobertura de macrófitas, sendo tolerantes à grande variação de tempera-

tura e salinidade (Philippart e Ruwet 1982, Genner et al. 2018). Os juvenis tendem a se alimentar de plâncton, enquanto os adultos alimentam-se de folhas de caules de plantas aquáticas, algas, detritos vegetais, insetos e crustáceos (Lamboj 2004). A espécie foi introduzida no Brasil em 1952 para piscicultura e transformou-se em praga presente em vários ambientes aquáticos do Brasil (Natakimazi e Hanssens 2005), sendo uma ameaça para a conservação da diversidade em águas continentais (Baptiste e Múnera 2010), com grande potencial de invasão no continente americano (Casemiro et al. 2018).

### 9.8 *I. cangae* como Modelo Experimental e Seu Potencial para Colonização Assistida

Os experimentos em ambiente de mesocosmo mostraram que *I. cangae* apresentava potencial para seu estabelecimento nos ambientes e condições testadas, sem, entretanto, apresentar em princípio uma superioridade competitiva que pudesse ameaçar as espécies nativas. Os resultados indicaram o Lago Três Irmãs – corpo 3 como sendo o mais apropriado para o desenvolvimento de *I. cangae* quando considerados os componentes físicos e físico-químicos do ambiente (água, sedimento, etc.), assim como a ausência de possíveis interações competitivas com outras macrófitas. Isso porque, no ambiente nativo de *I. cangae*, a mesma parece estar sujeita a interações competitivas, resultando em menor desenvolvimento, conforme encontrado no experimento *in situ*. Já na Barragem do Gelado, o menor crescimento parece ser resultado de uma combinação de fatores como um ambiente com condições físico-químicas menos favoráveis, corroborado pelo experimento *ex situ*, e pela interação competitiva com *Utricularia* sp., conforme experimento *in situ*. Sobre as interações competitivas com outras macrófitas, cabe destacar que o gênero *Isoëtes* é tido como um grupo com pouca habilidade competitiva (Szmeja 1994), de modo que outras espécies têm forte influência negativa em sua produtividade e fertilidade, podendo até levar a uma extinção local, a depender do grau de interação (Rhazi et al. 2009). De fato, ambientes oligotróficos, cujas condições se impõem como forte filtro ambiental ao estabelecimento de novas espécies, parece ter resultado em refúgios para manutenção de espécies de *Isoëtes*, sugerindo que a competição com outras espécies de macrófitas possa ser um dos principais fatores definindo sua distribuição (Seddon 1965). Esse argumento é fortalecido pelos nossos estudos, que demonstraram que *I. cangae* é relativamente tolerante às diversas

condições ambientais testadas, mantendo seu desenvolvimento a despeito das variações ambientais. Adicionalmente, há registro de espécies do gênero capazes de tolerar condições extremas de nutrição e irradiância por meio de diferentes mecanismos (Rørslett e Brettum 1989).

Por fim, cabe destacar que a pressão de herbivoria é um importante fator estruturador de comunidades de macrófitas aquáticas, sendo determinado por diversos fatores como a preferência do herbívoro e a palatabilidade das macrófitas-alvo (Qvarnemark e Sheldon 2003). Estudos com outras espécies do gênero *Isoëtes* relatam a ocorrência de herbivoria controlando o tamanho das populações (Dong 2009). A introdução de herbívoros não nativos pode ocasionar uma redução na capacidade de dispersão e na distribuição das espécies de *Isoëtes* (Wang et al. 2004). A herbivoria observada na Barragem do Gelado sugere ser o resultado da tentativa de consumo de um novo potencial alimento, ou o consumo acidental, considerando que apenas alguns dos espécimes tiveram consumidas as pontas de algumas folhas, mas não indicam ter se tornado alimento preferencial. Em contraste, no Lago Três Irmãs, a pressão de herbivoria é um fator limitante para o estabelecimento de uma população de *I. cangae*, mesmo que os outros aspectos avaliados o apontem como o mais apropriado para o desenvolvimento de *I. cangae*.

## 9.9 Experimento de Colonização Assistida com *I. cangae*

Considerando os resultados obtidos nos experimentos *ex situ* e *in situ* apresentados, no segundo semestre de 2019, foi delineado e implantado um experimento-piloto de colonização assistida no Lago Três Irmãs – corpo 3 na Barragem do Gelado e no Lago do Amendoim, este último incluído como controle experimental. Em cada ambiente, foi definido um ponto para monitoramento contínuo de variáveis ambientais com o uso de equipamentos autônomos e por atividades trimestrais de coleta de dados e amostras. Na Barragem do Gelado e no Lago do Amendoim foram delimitadas dez parcelas para colonização de *I. cangae* (1 × 1 m cada), nas quais foram implantados 300 espécimes em cada ambiente testado (figura 9.11).



**Figura 9.11** Montagem de experimento de colonização assistida. (A) Manipulação dos espécimes realizada pela equipe do NUPEM para estabelecimento na Barragem do Gelado, sendo possível ver um dos mergulhadores recebendo um dos espécimes para plantio. (B) Espécimes já estabelecidos na Barragem do Gelado, marcados individualmente por etiquetas de identificação vermelhas numeradas.

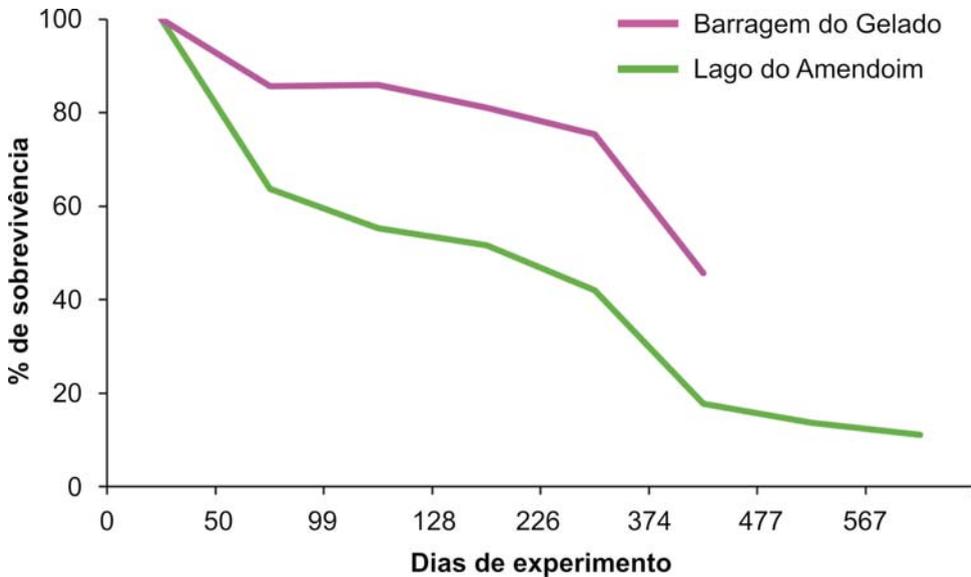
Para o Lago Três Irmãs – corpo 3, a intensa herbivoria demandou outras estratégias, sendo: gaiolas de exclusão aderidas ao fundo do lago, para proteger os espécimes de *I. cangae* implantados, e cultivos flutuantes. Medidas de controle populacional dos ciclídeos têm sido conduzidas pela Vale, em parceria com os órgãos ambientais, visando à redução da população da espécie invasora e permitindo a implantação de experimentos sem gaiolas, em futuro próximo.

Esse experimento de colonização assistida avaliou e monitorou os espécimes manejados por um ano e meio a dois anos sob diferentes aspectos indicadores da saúde e do grau de adaptação das plantas à nova condição, entre outros. Esses incluíram avaliação específica da taxa de sobrevivência, desenvolvimento avaliado pelo número de folhas novas, pelo número total de folhas e comprimento das maiores, pela atividade fotossintética, pela alteração de comunidade microbiana e pelos marcadores moleculares de estresse.

O delineamento desse experimento também incluiu o desenvolvimento e o uso de técnica de manipulação que permitisse a implantação de populações na ordem de milhares de espécimes. Os principais resultados alcançados por essa iniciativa pioneira são apresentados a seguir.

No Lago do Amendoim e na Barragem do Gelado, o percentual de espécimes remanescentes nas parcelas experimentais sofreu uma redução progressiva ao longo dos dois anos (figura 9.12). Entretanto, a taxa de mortalidade diária em cada ambiente de introdução, em relação ao número de espécimes

remanescentes em cada campanha, não foi linear. Observa-se um pico de mortalidade nos primeiros 50 dias de experimento, sendo esta de aproximadamente 14 % no Lago do Amendoim e de 36 % na Barragem do Gelado. Nos períodos subsequentes, observou-se uma certa estabilidade na mortalidade dos espécimes tanto no Lago do Amendoim quanto na Barragem do Gelado, com certa oscilação. Com aproximadamente um ano de estabelecimento, a taxa de sobrevivência dos espécimes no Lago do Amendoim foi de aproximadamente 46 %, enquanto na Barragem do Gelado não alcançou 18 %. Para os espécimes estabelecidos no Lago Três Irmãs – corpo 3 e protegidos por gaiola de exclusão esse percentual de sobrevivência foi de aproximadamente 50 %.



**Figura 9.12** Percentual de sobrevivência na Barragem do Gelado e no Lago do Amendoim nas diferentes campanhas de monitoramento do experimento, conduzidas até março de 2021 (aproximadamente 567 dias de experimento).

Os parâmetros de desenvolvimento dos espécimes seguem um padrão consonante com o observado para a mortalidade. Na Barragem do Gelado, foi observada uma proporção menor de espécimes com folhas novas, quando comparado com os espécimes implantados no Lago do Amendoim e no corpo 3 do Lago Três Irmãs. Na média do número de folhas (total de folhas), e na média do comprimento das três maiores, foi distinguida uma redução significativa nos espécimes presentes na Barragem do Gelado já nos primeiros meses de experimento, enquanto nos lagos do Amendoim e Três Irmãs,

foi observado um aumento progressivo ao longo do tempo, até uma certa estabilização ao final do experimento.

Há o entendimento de que o sucesso de uma ação de colonização assistida está relacionado ao estabelecimento de uma população viável, ou seja, um grupo de indivíduos autossustentável que, portanto, continue seu processo de manutenção de tamanho populacional de forma independente de ação humana ou manejo. Assim sendo, a avaliação da presença de estruturas reprodutivas (esporângios) na base das folhas mais maduras (as mais periféricas na roseta de folhas) e a respectiva maturidade das células reprodutivas (esporos) são um importante indicativo de reprodução sexuada.

Os espécimes, estabelecidos há mais de um ano nos ambientes testados, foram avaliados no auge do período de cheia (março/abril), momento em que é observado o pico reprodutivo de *I. cangae*. Nos espécimes introduzidos na Barragem do Gelado, foram observados apenas megásporos imaturos, não sendo observados micrósporos. Em contrapartida, nos espécimes introduzidos no Lago do Amendoim, local nativo de *I. cangae*, e no Lago Três Irmãs – corpo 3, foram observados megásporos e micrósporos maduros. Esse resultado sugere que os espécimes introduzidos na Barragem do Gelado têm seu potencial reprodutivo afetado pelas condições adversas impostas por esse ambiente, entretanto, apresentam pleno potencial reprodutivo no Lago Três Irmãs. Apesar desse resultado, é fundamental evidenciar a ocorrência de recrutamento de novos indivíduos e seu respectivo desenvolvimento para que o ciclo de vida esteja completo. Recentemente, os primeiros resultados desse potencial de recrutamento têm sido encontrados, com algumas dezenas de recrutas aparecendo naturalmente no sedimento do Lago Três Irmãs – corpo 3 presente nos cultivos flutuantes.

## 9.10 Considerações sobre os Experimentos de Colonização Assistida

O método de colonização assistida mostrou-se adequado para o estabelecimento dos espécimes de *I. cangae* em novos ambientes, tendo uma mortalidade inicial relativamente baixa quando comparado a outros estudos similares (Abeli et al. 2012, 2018). A mortalidade inicial detectada pode ser esperada em função de alguns fatores já relacionados na bibliografia, como:

- (1) estresse gerado pela mudança brusca de ambientes, uma vez que os espécimes saíram de piscinas de rustificação para o ambiente natural, onde encontram condições consideravelmente distintas;

- (2) danos referentes ao processo de manipulação dos espécimes, que inclui sua retirada do substrato estável da piscina, montagem nos recipientes tubulares e introdução;
- (3) estresse causado pelo transporte até o ambiente de introdução, que pode provocar movimentações no sedimento das raízes e eventualmente quebra de folhas, principalmente as de maior comprimento.

As taxas de mortalidade observadas entre os ambientes ao longo do experimento foram diferenciadas e atribuídas a diferentes hipóteses a serem testadas. No Lago do Amendoim, a mortalidade observada pode ser predominantemente resultado de interação competitiva com outras macrófitas, em especial *Helathium tenellum*, dominante do ambiente bentônico do lago. No transcorrer do experimento, as parcelas experimentais foram gradativamente colonizadas por *H. tenellum*, espécie que coexiste com *I. cangae* de forma natural, provavelmente em uma relação competitiva por nichos e recursos. Cabe destacar que a colonização e o desenvolvimento de *H. tenellum* nas parcelas de introdução pode seguir o padrão ecológico e as relações fitossociológicas naturais no ambiente do Lago do Amendoim, onde *H. tenellum* desenvolve denso dossel.

Na Barragem do Gelado, os resultados no experimento de mesocosmo *in situ*, apesar de positivos, não corresponderam à realidade em ambiente natural, aparentemente por fatores físicos do ambiente, como irradiância e sedimentação (conforme aventado no capítulo 5). O baixo desempenho está expresso na maior taxa de mortalidade, no menor percentual de espécimes com folhas novas, na estabilidade no número total e no comprimento das folhas (em número e comprimento consideravelmente menores aos encontrados no ambiente nativo). Da mesma forma, a condição adversa imposta pela Barragem do Gelado parece afetar potencial reprodutivo da espécie, uma vez que não foram encontradas células reprodutivas masculinas nesses espécimes.

O método de introdução utilizando proteção física por gaiolas, desenvolvido e utilizado no âmbito desse projeto, sobretudo no Lago Três Irmãs – corpo 3, mostrou-se adequado para o estabelecimento dos espécimes de *I. cangae* em ambiente com a presença da espécie onívora e invasora *C. rendalli*. Entretanto, o sistema apresenta riscos, pois foram vulneráveis às insistentes investidas de *C. rendalli*, que conseguiram penetrar na gaiola ao danificar a malha de revestimento ou cavando e passando por baixo da borda da gaiola. A entrada de *C. rendalli* na gaiola resultou no consumo e na perda de todos os exemplares instalados. Desconsiderando a pressão de herbivoria, o am-

biente oferecido pelo corpo 3 do Lago Três Irmãs mostrou-se o mais propício para o estabelecimento de *I. cangae*, dentre os ambientes testados. Isto também ficou evidente com os resultados obtidos quanto ao potencial reprodutivo dos espécimes introduzidos e os mantidos nos cultivos flutuantes *in situ* (ver seção sobre “maturação reprodutiva”). Entretanto, cabe destacar que seu estabelecimento sem proteção física só será possível caso a pressão de forrageio exercida por *C. rendalli* seja reduzida a nível inferior à capacidade de desenvolvimento e à proliferação da planta.

### 9.11 Considerações Finais

Nesses cinco anos de estudo, foi gerado vasto conhecimento que subsidiou o desenvolvimento de importantes técnicas de manejo de *I. cangae* com foco na sua conservação por meio da colonização assistida. Diferentes aspectos sobre a biologia da espécie e a ecologia dos ambientes foram estudados, visando manter uma segurança ambiental apreciável durante todo o processo, tanto para a espécie alvo de futuras ações de manejo quanto dos possíveis ambientes receptores. Foi testado como as características físicas e biológicas dos ambientes podem afetar *I. cangae* e vice-versa, buscando prever possíveis impactos de uma eventual ação de manejo, assim como o seu sucesso. Os resultados obtidos nos estudos de colonização, considerando ambientes com características opostas, proporcionaram um melhor entendimento dos limites fisiológicos da espécie além de servirem como parâmetro de comparação para futuros estudos de colonização assistida da espécie. Espera-se que os estudos de colonização assistida de *I. cangae* representem uma referência para a conservação de macrófitas aquáticas, em especial as endêmicas, no território brasileiro e em outras partes do mundo.

### Referências

- Abeli, T. et al. 2012. A cost-effective model for preliminary site evaluation for the reintroduction of a threatened quillwort. – *Aquat Conserv* 22: 66-73.
- Abeli, T. et al. 2018. A gleam of hope for the critically endangered *Isoetes malinverniana*: Use of small-scale translocations to guide conservation planning. – *Aquat Conserv* 28: 501-505.

- Albritton Jonsson, F. 2012. The Industrial Revolution in the Anthropocene. – *J Mod Hist* 84: 679-696.
- Antoun, H. e Kloepper, J. W. 2001. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). – In: *Encyclopedia of Genetics*. Academic Press, pp. 1477-1480.
- APHA (2005). Standard methods for examination of water and wastewater. American Public Health Association. 21st Edition. Washington, DC. pp. 4-144.
- Arlidge, W. N. S. et al. 2018. A Global Mitigation Hierarchy for Nature Conservation. – *BioScience* 68: 336-347.
- Baptiste, M. P. e Múnera, C. 2010. Análisis de riesgo de vertebrados terrestres introducidos en Colombia. – In: *Análisis de riesgo y propuesta de categorización de especies introducidas para Colombia*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, pp. 149-199.
- Brodie, J. F. et al. 2021a. Global policy for assisted colonization of species. – *Science* 372: 456-458.
- Brodie, J. F. et al. 2021b. Assisted colonization risk assessment-Response. – *Science* 372: 925-926.
- Casemiro, F. A. S. et al. 2018. The invasive potential of tilapias (Osteichthyes, Cichlidae) in the Americas. – *Hydrobiologia* 817: 133-154.
- Commander, L. E. et al. 2018. Guidelines for the Translocation of Threatened Plants in Australia. – Australian Network for Plant Conservation.
- Consorte-McCrea, A. et al. 2014. Diretrizes para reintroduções e outras translocações para fins de conservação. – IUCN Species Survival Commission.
- Dong, Y. 2009. Effects of Ecological Factors on the Endangerment of *Isoëtes yunguiensis*. – *J Anhui Agric Sci* 37: 5793-5797.
- Drayton, B. e Primack, R. B. 2012. Success Rates for Reintroductions of Eight Perennial Plant Species after 15 Years. – *Restor Ecol* 20: 299-303.
- Essl, F. et al. 2019. A Conceptual Framework for Range-Expanding Species that Track Human-Induced Environmental Change. – *BioScience* 69: 908-919.
- Genner, M. J. et al. 2018. A Guide to the Tilapia fishes of Tanzania. Disponível em: <https://martingenner.weebly.com/tanzania-tilapia-guide.html>. Acessado em 9 de maio de 2023.

- Godefroid, S. et al. 2011. How successful are plant species reintroductions? – *Biol Conserv* 144: 672-682.
- IUCN. 2013. Guidelines for reintroductions and other conservation translocations, Version 1.0 (IUCN Species Survival Commission, Switzerland, 2013). Gland, Switzerland: 57 pp.
- Lamboj, A. 2004. The Cichlid Fishes of Western Africa. – Birgit Schmettkamp Verlag, Bornheim, Germany. 255 p.
- Lansdown, R. V. 2019. *Isoëtes cangae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T136249847A136250011.
- Mallet, D. e Pelletier, D. 2014. Underwater video techniques for observing coastal marine biodiversity: A review of sixty years of publications (1952-2012). – *Fish Res* 154: 44-62.
- Maschinski, J. e Albrecht, M. A. 2017. Center for Plant Conservation's Best Practice Guidelines for the reintroduction of rare plants. – *Plant Divers* 39: 390-395.
- McDonald, C. B. 1996. The regulatory and policy context. – In: Restoring diversity: strategies for reintroduction of endangered plants. First Edition. Island Press, pp. 87-100.
- MMA/ICMBio. 2020. PORTARIA Nº 91, DE 4 DE FEVEREIRO DE 2020. Disponível em: <http://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-n-91-de-4-de-fevereiro-de-2020-241574956/>. Acessado em 31 de outubro de 2021.
- Morgan, J. W. 1999. Have tubestock plantings successfully established populations of rare grassland species into reintroduction sites in western Victoria? – *Biol Conserv* 89: 235-243.
- Nally, S. et al. 2018. Policy, approvals and translocation proposals. – In: Guidelines for the Translocation of Threatened Plants in Australia. Australian Network for Plant Conservation, pp. 60-65.
- Natakimazi, G. e Hanssens, M. 2005. *Tilapia rendalli*. 2006 IUCN Red List of Threatened Species.
- Noss, R. F. et al. 1996. Restoring Diversity: Strategies for Reintroduction of Endangered Plants (DA Falk, CI Millar, and P Olwell, Eds.). – Island Press.

Pavlik, B. M. 1996. Defining and measuring success. – In: Restoring diversity: strategies for the reintroduction of endangered plants. Island Press, pp. 127-155.

Pereira, J. B. D. S. et al. 2016. Two New Species of *Isoëtes* (Isoetaceae) from northern Brazil. – Phytotaxa 272: 141-148.

Philippart, J.-C. e Ruwet, J.-C. 1982. Ecology and distribution of tilapias. In R. S. V. Pullin and Lowe-McConnell (eds.), The Biology and Culture of Tilapias. ICLARM Conference Proceedings 7, 432 pages. pp 15-59. Manila, Philippines: ICLARM-International Center for Living Aquatic Resources Management.

Qvarnemark, L. M. e Sheldon, S. P. 2004. Moose Grazing Decreases Aquatic Plant Diversity. – J Freshw Ecol 19: 407-410.

Reiter, N. et al. 2016. Orchid re-introductions: an evaluation of success and ecological considerations using key comparative studies from Australia. – Plant Ecol 217: 81-95.

Rhazi, M. et al. 2010. Competition in microcosm between a clonal plant species (*Bolboschoenus maritimus*) and a rare quillwort (*Isoëtes setacea*) from Mediterranean temporary pools of southern France. – In: Oertli, B. et al. (eds), Pond Conservation in Europe. Developments in Hydrobiology 210. Springer Netherlands, pp. 271-280.

Ricciardi, A. e Simberloff, D. 2009a. Assisted colonization is not a viable conservation strategy. – Trends Ecol Evol 24: 248-253.

Ricciardi, A. e Simberloff, D. 2009b. Assisted colonization: good intentions and dubious risk assessment. – Trends Ecol Evol 24: 476-477.

Ricciardi, A. e Simberloff, D. 2021. Assisted colonization risk assessment. – Science 372: 925-925.

Rørslett, B. e Brettum, P. 1989. The genus *Isoëtes* in Scandinavia: An ecological review and perspectives. – Aquat Bot 35: 223-261.

Seddon, B. 1965. Occurrence of *Isoëtes echinospora* in Eutrophic Lakes in Wales. – Ecology 46: 747-748.

Seddon, P. J. 2010. From Reintroduction to Assisted Colonization: Moving along the Conservation Translocation Spectrum. – Restor Ecol 18: 796-802.

- Stuwe, J. 1980. Rare and endangered Victorian plants 1. *Acacia enterocarpa*. Vict Nat 97: 157-158.
- Szmeja, J. 1994. Effect of disturbances and interspecific competition in isoetid populations. – Aquat Bot 48: 225-238.
- Thomaz, S. M. et al. 2003. Macrófitas aquáticas em Itaipu: ecología e perspectivas para o manejo. – In: Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas. Editora da Universidade Estadual de Maringá, pp. 319-341.
- Wang, J. et al. 2006. Ecology and conservation of the endangered quillwort *Isoetes sinensis* in China. – J Nat Hist 39: 4069-4079.
- Willis, J. H. 1951. Sydenham sanctuary for vanishing basalt flowers (a peerless orchid is saved). Walkabout 17: 36-37.
- WWF. 2020. Living Planet Report 2020 – Bending the curve of biodiversity loss. Almond, R. E. A., Grooten, M. and Petersen, T. (Eds). WWF, Gland, Switzerland.



## CAPÍTULO 10

---

---

### Técnicas e Inovações para a Produção, o Plantio e a Conservação de *Isoëtes cangae*

\* Danielle S. Santos \* Mirella P. Santos \* Naiara V. Campos  
\* Lísia M. S. Gestinari \* Aline K. Araújo \* Rodrigo L. Martins  
\* Marcos Paulo F. Barros \* Analy M. O. Leite \* Paula Veronesi  
\* Sergio L. Cavaleiro-Filho \* Antônio J. D. Cogo \* Aline Lemos  
\* Arthur V. Sant'anna Lopes \* Fabíola M. Santos \* Vinícius M. S. Gomes  
\* Laís B. Jordão \* Luiz Carlos F. Ribeiro \* Rafael R. Ferreira

TÍTULO CURTO (*RUNNING TITLE*)

---

---

Aspectos Relevantes da Biologia de *I. cangae*

## Resumo

O manejo para a conservação de espécie é uma ciência aplicada e empírica que envolve o desenvolvimento específico de diferentes tecnologias para a conservação. Neste capítulo elencamos algumas tecnologias desenvolvidas para otimizar processos produtivos, de propagação em ambiente natural e conservação de *I. cangae*, visando potencializar o processo de instalação de novas populações em ambientes aquáticos e descrever protocolos para a preservação e a criação de bancos de sementes ou esporos criopreservados, culturas de tecidos, coleções vivas, dentre outras técnicas. O uso de sementes artificiais produzidas em 2 ou 3 % de alginato contendo megásporos fecundados ou plântulas é uma das metodologias apresentadas, o que representa o avanço na introdução de uma espécie subaquática. No que tange aos estudos acerca do banco de germoplasma na espécie *Isoëtes cangae*, verificou-se que os esporos criopreservados são capazes de gerar indivíduos saudáveis cujo desenvolvimento assemelha-se ao dos indivíduos gerados a partir de esporos dessecados e mantidos à temperatura ambiente, diferindo por apresentarem maior alongamento foliar e maior número de esporângios maduros. Com relação ao favorecimento do crescimento vegetal por meio do inóculo de microrganismos, os ensaios indicaram que as espécies cultivadas de *I. cangae* obtiveram respostas promissoras em relação ao tamanho e à robustez da raiz, bem como maior resistência a condições abióticas extremas na presença de bactérias endofíticas. Ademais, estudos de fitorremediação estão sendo implementados na espécie *I. cangae* em associação a fungos micorrízicos arbusculares (FMA), na busca pela identificação e pelo isolamento de FMAs para o estabelecimento de cultivos em áreas contaminadas por rejeitos de mineração.

**Palavras-chave:** sementes artificiais; banco de germoplasma; bactérias promotoras do crescimento; fungos micorrízicos arbusculares.

## 10.1 Introdução

Estimativas recentes indicam que até um quinto das espécies vegetais em todo o mundo pode estar em risco de extinção (Pimm e Raven 2017), o que tem acelerado o ritmo de produção de tecnologias que visem à conservação de espécies, especialmente àquelas ameaçadas. As espécies vegetais podem ser conservadas por meio da manutenção de coleções *ex situ*, como bancos de sementes ou esporos criopreservados, culturas de tecidos, coleções vivas ou por meio da manutenção *in situ* a partir da preservação das populações em seus habitats naturais (Volis 2016, 2017).

Neste capítulo elencamos algumas tecnologias desenvolvidas para otimizar processos produtivos, de propagação em ambiente natural e conservação de *I. cangae*, listando:

- (1) produção de tecnologia de semeadura a partir de esporos, em ambiente aquático;
- (2) preservação a partir de bancos de sementes ou esporos criopreservados, culturas de tecidos, coleções vivas, dentre outras técnicas;
- (3) emprego de bactérias endofíticas com potencial de promoção de crescimento.

## 10.2 Técnicas para Aumento de Produção de Plantas no Cultivo *Ex Situ* e para Plantio Direto em Novos Ambientes

A conservação *in situ*, amplamente aceita como estratégia primária e mais adequada para a conservação da biodiversidade, pode envolver ou não o estabelecimento de novos exemplares da espécie ao habitat original ou mesmo em áreas vizinhas dentro do bioma de origem, uma atividade denominada colonização assistida ou translocação (Volis e Blecher 2010, Orsenigo 2018). Nesse contexto, alguns estudos têm demonstrado que o uso de um número suficiente de indivíduos utilizados no plantio representa o principal fator de contribuição para o sucesso de colonização assistida (Deredec e Courchamp 2007, Godefroid et al. 2011, Silcock et al. 2019). Esse fato é, de certo modo, compreensível, devido à mortalidade decorrente de problemas de aclimatação e transporte entre ambientes distintos.

A instalação de novas populações ou translocações pode ocorrer por propágulos vegetativos, como mudas cultivadas *ex situ*, estacas, e/ou plantas inteiras resgatadas ou produzidas (incluindo adultos e mudas), semeadura

direta ou pela translocação do solo superficial que supostamente contenha um banco de sementes das espécies-alvo (Silcock et al. 2019). Para plantas aquáticas, a introdução de novos indivíduos torna-se um pouco mais complexa, em especial quando a espécie é subaquática, podendo haver a necessidade de mergulho para a introdução dos propágulos. Dessa forma, a implementação de tratamentos que melhorem a sobrevivência dos propágulos e minimizem os choques de translocação é fator importante de melhoria para atender aos critérios de sucesso de curto e médio prazos.

O presente item apresenta métodos que facilitariam o estabelecimento de plântulas subaquáticas de *I. cangae* por meio de plantio direto sem a necessidade de mergulho. Esta espécie subaquática é encontrada a até 6 m de profundidade exclusivamente em um único lago permanente, conhecido como Lago do Amendoim, localizado a 730 m de altitude na Serra Sul dos Carajás (Troia et al. 2016), expondo a necessidade de metodologia específica, ou seja, que não conta com ampla bibliografia de apoio.

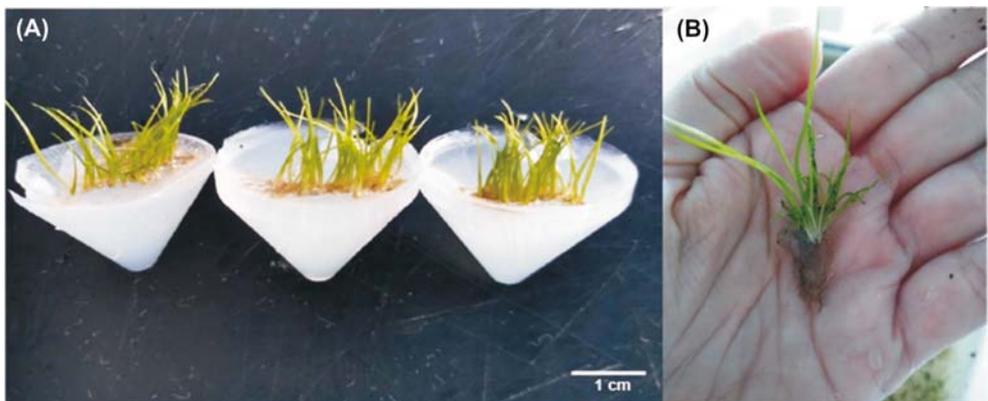
Existem apenas dois casos de translocação para espécies do gênero *Isoëtes* registrados na literatura. O primeiro foi a reintrodução documentada de *I. louisianensis* Tiferet em 2008 nos EUA, embora o trabalho não tenha sido publicado (Faulkner et al. 2009). O segundo caso foi a translocação de *I. malinverniana* Ces. e De Not para um corpo d'água restaurado dentro da reserva "Bosco del Vignolo" (Abeli et al. 2018). A espécie *I. malinverniana* também é classificada como criticamente ameaçada por possuir distribuição endêmica na planície do Rio Po, uma região com intensa atividade agrícola no norte da Itália (Abeli et al. 2018). Nesse caso, indivíduos adultos da espécie foram inseridos no sedimento do curso d'água, e uma rede plástica foi fixada entre as plantas a fim de evitar o desenraizamento pelo fluxo de água. Abeli e colaboradores (2018) também desenvolveram um protocolo eficaz para a regeneração de *I. malinverniana in vitro*, que forneceu a base para o desenvolvimento de uma população *ex situ* fundamentado na regeneração de esporófitos obtidos a partir de uma cultura mista de macrósporos e micrósporos em placas de ágar-água e posterior transferência para frascos de vidro contendo ágar, suplementado com sais do meio Murashige e Skoog (Abeli et al. 2018).

Assim como *I. malinverniana*, a espécie *I. cangae* também precisa de medidas urgentes de conservação que incluem não só a proteção de seu hábitat, mas também o desenvolvimento de populações *ex situ*, a partir de ações de colonização assistida. Dessa forma, apresentaremos a seguir alguns métodos utilizados em simulações preliminares de propagação da espécie em ambiente controlado, a fim de descrever a funcionalidade de cada método

e subsidiar escolhas em trabalhos futuros em larga escala, tanto para cultivos *ex situ* como *in situ*, e até mesmo de outras espécies de plantas subaquáticas.

### 10.2.1 Germinação de plântulas sob matrizes de gel

Essa técnica foi elaborada com a intenção de ter plantas fixadas em uma base gelatinosa para facilitar o transporte e a introdução da espécie em novo ambiente. A produção das plântulas com crescimento em matriz de gel ocorreu após a fecundação dos esporos femininos (megásporos). Um total de 600 megásporos maduros foram utilizados, obtidos de 20 megasporângios de dez plantas diferentes e misturados a um *pool* de esporos masculinos, obtidos de 20 microsporângios maduros de dez plantas distintas. A mistura de esporos masculinos e femininos (1 mL) foi adicionada em frascos tipo Falcon contendo 1, 2 ou 5 mL de ágar (1 %) ou agarose (1 %) no fundo e 25 mL de água destilada. Os frascos foram mantidos a 25 °C em câmara de crescimento até as plântulas atingirem um mês de idade. Então, foi avaliada a capacidade de enraizamento das plântulas na matriz de gel (figura 10.1). Após o crescimento e o enraizamento das plântulas nas matrizes de gel, essas foram colocadas na superfície dos aquários e soltas para que afundassem, chegando ao fundo corretamente. Foi avaliado de que forma a espessura da matriz gelatinosa (1, 2 ou 5 cm) afeta a imersão das raízes até o fundo dos aquários. Esse fator é importante para verificar a fixação das raízes no substrato.



**Figura 10.1** Plântulas de *Isoëtes cangae* germinadas em matrizes de gel. (A) Plântulas enraizadas em matriz de gel de agarose de formato cônico. (B) Várias plântulas jovens de *I. cangae* unidas após três meses de cultivo em matriz de gel.

Após três meses de cultivo, alguns pontos negativos foram observados nesse método: a) algumas matrizes inverteram-se ao descer pela coluna d'água, o que dificultou o desenvolvimento das plântulas; b) as matrizes menos espessas (1 cm) permaneceram flutuando na coluna d'água, o que impediu o enraizamento das plântulas no substrato do aquário; c) nas matrizes menos espessas (1 cm), observou-se que o número de plantas foi um fator relevante a ser considerado, uma vez que causaram a flutuação da base gelatinosa; e d) as plântulas produzidas em matriz mais espessa (5 cm), apesar de afundarem rapidamente, não tiveram suas raízes fixadas adequadamente no substrato. Assim, as plântulas germinadas sob a matriz de 2 cm foram as que melhor se estabeleceram, uma vez que as raízes atingiram o solo mais rapidamente e se fixaram antes de a matriz se desfazer.

Entretanto, essa técnica não se apresentou totalmente eficaz, uma vez que poucas plântulas se estabeleceram no substrato, e aquelas que enraizaram no solo mantiveram a região do corno (caule subterrâneo bulboso) exposto quando o gel desfez-se por completo. Além disso, a germinação de várias plântulas próximas em uma mesma matriz favorece a competição entre elas e reduz o desenvolvimento dos indivíduos, o que poderia acrescentar mais etapas ao processo de transplante, tornando o método mais laborioso (figura 10.1).

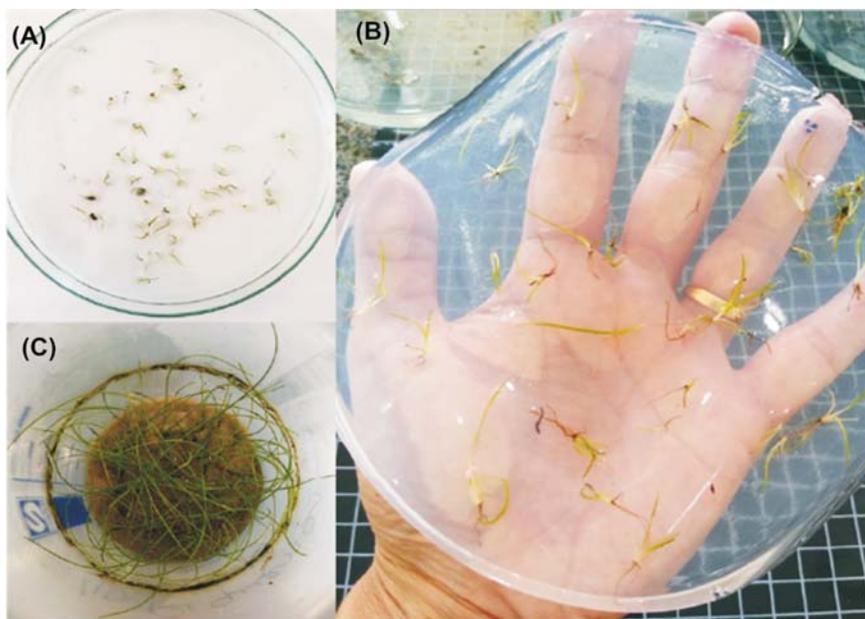
### 10.2.2 Transferência de plântulas para matrizes de gel

Diferente da técnica descrita anteriormente, o método atual intenta conseguir desenvolver, de forma facilitada, plântulas soltas na coluna de água (oriundas da fecundação natural das plantas adultas) bem como as plântulas produzidas em laboratório. O método utilizou plântulas previamente geradas em água, com idade entre um e três meses, que foram posteriormente acrescentadas em ágar. Uma mistura de ágar-água 1 % foi vertida em placas de Petri (150 mm × 25 mm), formando uma fina camada (< que 1 cm). Antes de ocorrer solidificação do ágar, um total de 25 plântulas de *I. cangae* foi incluído no mesmo, com auxílio de pinças. Os discos de ágar, já solidificados, contendo as plântulas foram retirados da placa e distribuídos no fundo de aquários ou béqueres (5 L) contendo substrato.

Como limitações, tornar-se-á importante verificar o momento mais propício para adição das plântulas na matriz de ágar, devido à temperatura elevada do ágar antes da sua solidificação. Ademais, os discos de ágar são frágeis e necessitam de cuidados na sua manipulação. Apesar de ser uma técnica mais laboriosa, o presente cultivo permite obter resultados promiss-

sores para o plantio de plantas aquáticas. Além disso, o presente método permite maior controle sobre o número de indivíduos, uma vez que a seleção de plântulas já germinadas proporciona maior efetividade ao trabalho.

Cabe destacar que o estabelecimento das plântulas ao substrato pode ser observado após 15 dias, estando aptas para o transplante para novo substrato após três meses de desenvolvimento (figura 10.2). A transferência de plântulas para a matriz ágar-água permitiu a sobrevivência e o estabelecimento de aproximadamente 90 % dos indivíduos no substrato, o que é muito superior ao método tradicional de plantio de plântulas manualmente no substrato (que gera morte expressiva de plântulas sensíveis a esse tipo plantio).



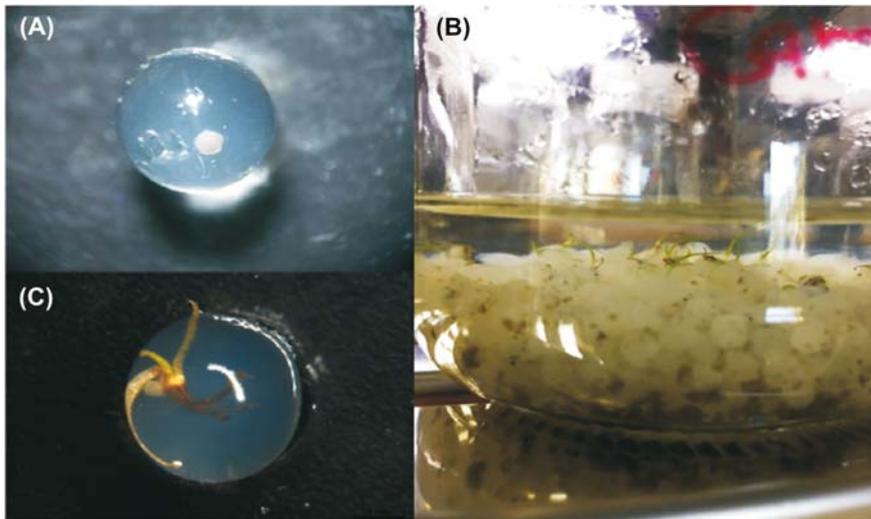
**Figura 10.2** Transferência de plântulas para matrizes de gel. (A) Plântulas de *I. cangae* foram dispostas em gel ágar-água 1 % semissólido com auxílio de pinças. (B) Disco de ágar, já solidificado, contendo as plântulas que serão depositadas no fundo de aquários contendo substrato composto por areia e turfa. (C) Plântulas de *I. cangae* após dois meses da transferência dos discos de ágar para o fundo do aquário.

### 10.2.3 Produção de sementes artificiais contendo megásporos fecundados

Essa técnica foi desenvolvida com o intuito de facilitar o cultivo *ex situ* e a introdução da espécie em novo ambiente sem a necessidade de plantio

manual. Com essa técnica é possível individualizar melhor as plantas introduzidas, o que reduz a competição das plantas estabelecidas, bem como permite adicioná-las facilmente em novo ambiente. A produção de sementes artificiais ocorreu a partir de esporos femininos (megásporos) previamente fecundados, como citado anteriormente.

Após a mistura de esporos masculinos e femininos, eles foram mantidos submersos em água destilada por 15 dias para que ocorresse a fecundação. Os megásporos fecundados foram separados em três grupos, cada um contendo 200 megásporos potencialmente fertilizados. Cada grupo de megásporo foi retirado da água destilada, utilizando uma pipeta e dispersado em três soluções com concentrações diferentes de alginato de sódio (1 %, 2 % ou 3 %). As soluções de alginato, contendo os megásporos, foram transferidas para uma bureta e gotejadas em uma solução de cloreto de cálcio 100 mmol.L<sup>-1</sup> (Mallón et al. 2007, Saxena et al. 2019). As sementes formadas pelo englobamento dos megásporos individualizados, ou não, foram mantidas na solução de cloreto por 30 minutos. Após esse tempo, as sementes artificiais foram coletadas com o auxílio de uma peneira e mantidas em água destilada até a germinação das plântulas. Após a germinação das sementes, as plântulas foram distribuídas em aquários, e o crescimento e o enraizamento foram avaliados após três meses do semeio (figura 10.3).



**Figura 10.3** Produção de sementes artificiais contendo megásporos fecundados. (A) Sementes artificiais produzidas a partir do englobamento de megásporos previamente fecundados. (B) Plântulas de *I. cangae*, germinadas em semente artificial, prontas para o plantio. (C) Detalhe de plântula de *I. cangae* germinada em semente artificial.

As cápsulas formadas em 2 % ou 3 % de alginato afundaram na coluna d'água, e as plântulas perfuraram a cápsula e conseguiram fixar-se no substrato. De acordo com os presentes resultados, as sementes artificiais produzidas em 2 % ou 3 % de alginato contendo megásporos fecundados ou plântulas em desenvolvimento inicial foram os métodos mais eficientes na introdução de uma espécie subaquática por meio da introdução da espécie de forma direta e facilitada. No entanto, as cápsulas formadas em 1 % de alginato foram as primeiras a emitir plântulas de *I. cangae*, porém, mostraram-se frágeis e algumas malformadas. Além disso, as cápsulas que continham mais de um indivíduo não foram capazes de afundar, flutuando na superfície ou no meio da coluna d'água.

Adicionalmente, os cuidados necessários limitam-se à seleção prévia de sementes fecundadas e plântulas ainda pequenas, uma vez que plântulas maiores podem se soltar da cápsula de alginato antes de ocorrer a fixação no substrato. Esse método ainda será avaliado em larga escala, em ambiente controlado, como o cultivo *ex situ* em mesocosmos e em ambiente natural *in situ*. A produção das sementes artificiais foi o método mais eficaz até o presente momento, pois apresenta as maiores taxas de plantas fixadas corretamente no substrato. Essa técnica será promissora para trabalhos futuros, porque poderá reduzir a necessidade de mergulhos para a introdução da espécie subaquática *in situ*.

### 10.3 Banco de Germoplasma

Os bancos de germoplasma são ferramentas eficazes para a conservação *ex situ* de espécies ameaçadas cuja função é manter, a longo prazo, a viabilidade do material biológico, a sua capacidade de crescimento, bem como a sua integridade genética (Pence 2008, Ballesteros 2010). Fazendo parte dos bancos de germoplasma, os esporos são objetos de estudo ideais para a conservação *ex situ* de samambaias e licófitas, uma vez que são estruturas pequenas e, na maioria das vezes, fáceis de armazenar e de se obter em grandes quantidades (Dyer 1994, Pence 2008, Ballesteros 2010, Ibars e Estrelles 2012). Cabe ressaltar que esporos clorofilados apresentam maiores conteúdos hídricos e taxas metabólicas em comparação com esporos não clorofilados, fazendo com que percam a viabilidade mais rapidamente após a sua liberação no ambiente (Lloyd e Klekowski 1970).

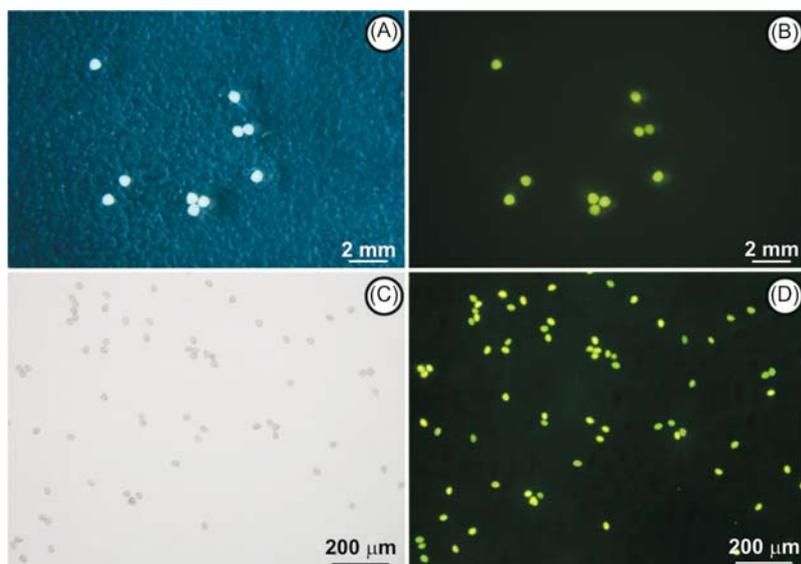
Quanto às condições de armazenamento, a temperatura e a umidade são, sem dúvida, fatores primordiais para o sucesso da preservação de geroplasmas. Temperaturas ultrabaixas interrompem o metabolismo celular, permitindo a manutenção da viabilidade de tecidos vivos durante longos períodos (Ballesteros et al. 2011, 2012, Li e Shi 2014, Ballesteros e Pence 2018). Entretanto, quando submetidas a temperaturas (ultra) congelantes, as células podem sofrer crioinjúrias, as quais ocorrem devido à formação de cristais de gelo (De Souza et al. 2014). Os cristais de gelo afetam a integridade osmótica, coligativa e estrutural das células, resultando em rupturas físicas e em danos mecânicos às paredes, às membranas e às organelas (Benson 2008). Dessa forma, a dessecação de esporos constitui também um passo fundamental para evitar as crioinjúrias (Ballesteros e Walters 2007). Uma alternativa é a adição de substâncias crioprotetoras que evitam a formação dos cristais de gelo, tais como os açúcares (e. g., sacarose e trealose) e álcoois (e. g., glicerol) (Wolkers e Oldenhof 2021).

Com o intuito de investigar as condições ideais para a preservação de esporos femininos e masculinos (megásporos e micrósporos, respectivamente) de *Isoëtes cangae*, indivíduos adultos foram coletados no Lago do Amendoim e trazidos para laboratório. As folhas férteis de cada indivíduo foram retiradas, e as bases foliares foram armazenadas em tubos Falcon contendo água até o início dos experimentos. Os esporângios foram destacados das bases das folhas com o auxílio de pinça, classificados em femininos e masculinos, e mantidos em água destilada.

Para o primeiro experimento, foram selecionados 15 esporângios masculinos (microesporângios) e 15 femininos (megasporângios). O conteúdo dos microesporângios foi homogeneizado em 30 mL de água destilada e, em seguida, foram separadas alíquotas ( $n = 60$ ) de 500  $\mu\text{L}$  de solução de micrósporos. Após a centrifugação a água dos tubos foi removida e foram adicionados 2 mL de solução de glicerol a 1 %. As amostras de micrósporos foram então transferidas para criotubos. De forma similar, foi preparado um *mix* de megásporos, provenientes dos 15 esporângios femininos, o qual foi subdividido em amostras ( $n = 60$ ), cada uma com dez megásporos. As amostras de megásporos foram acondicionadas em criotubos de 2 mL contendo solução de glicerol 1 %. As amostras de micrósporos e megásporos foram divididas em cinco condições de armazenamento: 25 °C (temperatura ambiente), 8 °C, -20 °C, -80 °C e -80 °C com imersão prévia de 15 min em nitrogênio líquido. As amostras armazenadas em temperatura ambiente foram mantidas apenas em água.

A viabilidade das amostras foi testada mensalmente durante um ano por meio da microscopia de fluorescência, utilizando o reagente diacetato de fluoresceína (FDA) a  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  (do Rego et al. 2021). Esse reagente permeia a membrana celular e é metabolizado por esterases do citoplasma, gerando um composto fluorescente impermeável à membrana. A retenção do composto indica a viabilidade celular.

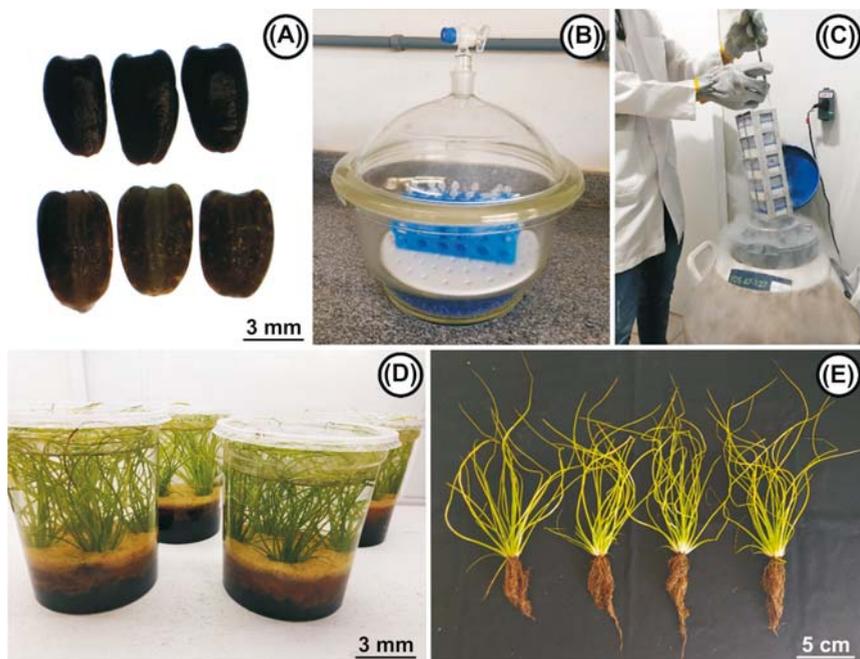
Para a realização dos testes de viabilidade, as amostras submetidas ao resfriamento/congelamento foram degeladas/descongeladas a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras estocadas em solução de glicerol 1 % foram lavadas em água destilada. Todas as amostras, inclusive as armazenadas em temperatura ambiente, foram então imersas em acetona por 10 min, incubadas em solução de FDA a  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  durante 20 min no escuro e depois lavadas três vezes em água destilada. As amostras de megásporos foram transferidas para vidros de relógio e analisadas em estereomicroscópio sob luz. Cada amostra de dez megásporos foi fotografada em campo claro e em luz fluorescente para análise do percentual de viabilidade. Alíquotas de  $20 \mu\text{L}$  da solução de micrósoros foram transferidas para lâminas histológicas, montadas em água, e observadas em microscópio sob luz fluorescente. Para cada tratamento foram montadas três lâminas e foram fotografados dois campos por lâmina. Na figura 10.4, observam-se megásporos e micrósoros de *I. cangae* submetidos ao teste com FDA.



**Figura 10.4** Viabilidade celular de megásporos (A, B) e micrósoros (C, D) de *Isoëtes cangae* fotografados em campo claro (A, C) e sob luz fluorescente (B, D).

Durante o desenvolvimento do experimento, uma sexta condição foi adicionada. Amostras ( $n = 6$ ) de esporângios femininos e masculinos inteiros foram selecionadas e acondicionadas em criotubos – um esporângio feminino e um masculino em cada tubo – contendo 2 mL de solução de glicerol a 1 %. Essas amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante um ano e analisadas quanto à sua viabilidade a cada dois meses. A viabilidade das amostras foi atestada seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente, com a diferença de que os esporângios foram rompidos após o descongelamento. De cada esporângio feminino foram selecionados aleatoriamente 20 megásporos, e de cada microsporângio foi retirada uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  da solução de micrósoros, previamente homogeneizados em água, para a análise da viabilidade, utilizando o FDA. A partir do oitavo mês de análise, uma amostra adicional (dez megásporos e 100  $\mu\text{L}$  de micrósoros) de cada período foi utilizada para realização de testes de germinação. Para isso, os esporos foram cultivados conjuntamente em tubos Falcon de 50 mL contendo água destilada e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo 12 h/12 h (claro/escuro).

Os megásporos e os micrósoros armazenados em temperatura ambiente apresentaram 35 % e 40 % de viabilidade, respectivamente, após um ano de armazenamento (figura 10.5). Os esporos mantidos a  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e os micrósoros mantidos a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  apresentaram viabilidade entre 40-45 %. Os megásporos armazenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e os esporos imersos em nitrogênio líquido, e acondicionados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , apresentaram 60 % de viabilidade. O acondicionamento em nitrogênio líquido foi a condição que se mostrou mais promissora, após um ano de armazenamento, a porcentagem de viabilidade celular foi de 80 % para micrósoros e 90 % para megásporos. Apesar do elevado percentual de viabilidade dos esporos armazenados a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  ao longo de um ano, eles não foram capazes de regenerar novos indivíduos. Apenas um megásporo apresentou sinal de germinação. Acredita-se que o grau de maturidade dos megásporos armazenados esteja relacionado com a baixa taxa de germinação.

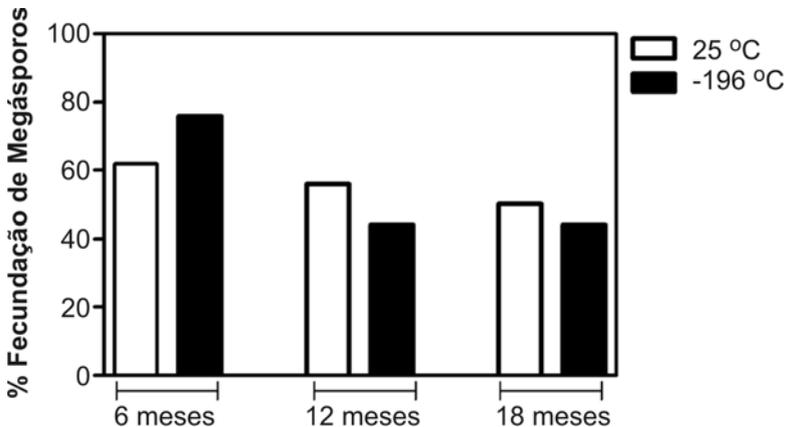


**Figura 10.5** Etapas da criopreservação de esporos de *Isoëtes cangae*. (A) Separação de esporângios masculinos (acima) e femininos (abaixo) maduros. (B) Dessecação de esporos em dessecador contendo sílica gel. (C) Armazenamento de esporos em galão criogênico. (D) Cultivo de plantas obtidas a partir do cruzamento de esporos criopreservados. (E) Esporófitos com um ano de idade.

Com o intuito de testar um novo protocolo, esporângios recém-coletados, provenientes de cinco indivíduos, foram cuidadosamente examinados e classificados em masculinos e femininos e em maduros e imaturos. Esporângios com parede de coloração marrom-escura foram selecionados para obtenção de esporos maduros (figura 10.5A). Megásporos maduros de *I. cangae* foram segregados por indivíduo em criotubos de 2 mL. Amostras de micrósporos maduros suspensos em água destilada (1 mL) foram transferidas para tubos de 2 mL. Os tubos contendo micrósporos foram centrifugados, e o sobrenadante foi descartado. O excesso de água dos tubos contendo megásporos foi retirado com auxílio de pipeta. Em seguida, os tubos foram transferidos para um dessecador contendo sílica gel ativa para a dessecação dos esporos (figura 10.5B). Após atingirem peso constante, as amostras de cada indivíduo foram repartidas em seis tubos. Metade das amostras foram armazenadas em temperatura ambiente (25 °C), e a outra metade, em nitrogênio líquido (-196 °C) (figura 10.5C).

A viabilidade das amostras do segundo experimento foi acompanhada por meio de testes de fecundação de esporos masculinos e femininos submetidos às mesmas condições de armazenamento. A análise do percentual de germinação dos esporos é um dos procedimentos mais utilizados para o monitoramento da viabilidade, e a medição é feita a partir da contagem do número de esporos germinados em uma amostra contendo um número conhecido de esporos (Galán e Prada 2010). Nesse estudo, o percentual de germinação foi avaliado tomando como base o número total de megásporos. A viabilidade foi testada no tempo zero e após seis, 12 e 18 meses de armazenamento das amostras. Amostras controle de megásporos e micrósporos, não submetidas à dessecação, foram utilizadas para avaliar a viabilidade inicial dos esporos.

As amostras frescas de megásporos e micrósporos mantidas à temperatura ambiente apresentaram um percentual de germinação de 96 %. A viabilidade dos esporos dessecados e armazenados a 25 °C reduziu gradativamente com o tempo de armazenamento; após 18 meses, o percentual de germinação foi de 31 % (figura 10.6). Para as amostras dessecadas e congeladas em nitrogênio líquido, o percentual de germinação variou entre 50-76 %. Esse resultado indica que esporos dessecados e criopreservados são capazes de germinar após o descongelamento e mantêm-se após 18 meses de armazenamento mais viáveis do que esporos dessecados e mantidos à temperatura ambiente.



**Figura 10.6** Percentual de fecundação de megásporos dessecados de *Isoëtes cangae* após 12 meses de armazenamento em temperatura ambiente e em nitrogênio líquido.

Para avaliar o desenvolvimento dos esporófitos gerados a partir da fecundação de esporos dessecados e criopreservados durante um ano, parte dos esporófitos gerados ( $n = 24$ ) foram transferidos para frascos contendo substrato do Lago do Amendoim, coberto por uma fina camada de areia, e preenchidos com água corrente. A partir de três meses de idade, os esporófitos foram mantidos em potes de 2 L contendo Jiffy®, sedimento do lago e areia na proporção 4:2:1 (figura 10.5D). Os potes foram preenchidos com água corrente, sendo o volume de água ajustado conforme o crescimento das plantas. As plantas foram cultivadas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 °C e fotoperíodo 12 h/12 h (claro/escuro). Após seis e 12 meses de crescimento das plantas foram contabilizados o número de folhas e o de esporângios, e foram mensurados o comprimento foliar e o radicular dos esporófitos.

Os esporófitos gerados a partir de esporos criopreservados apresentaram, após seis meses de vida, por volta de dez folhas, 12 cm de comprimento foliar e 7 cm de comprimento radicular. Após um ano de desenvolvimento, as plantas apresentaram, aproximadamente, 32 folhas e comprimento foliar e radicular de 26 e 12 cm, respectivamente (figura 10.5E). Das 32 folhas, aproximadamente metade estava fértil, sendo que metade dos esporângios se encontrava maduros. Esporófitos com um ano de idade provenientes de esporos dessecados e mantidos à temperatura ambiente apresentaram 32 folhas, com comprimento foliar máximo de 18 cm e 13 cm de comprimento radicular. Essas plantas apresentaram aproximadamente 16 folhas férteis, sendo que um terço delas abrigavam esporângios maduros. Esses resultados indicam que esporos criopreservados são capazes de gerar indivíduos saudáveis cujo desenvolvimento assemelha-se ao dos indivíduos gerados a partir de esporos dessecados e mantidos à temperatura ambiente, diferindo por apresentarem maior alongamento foliar e maior número de esporângios maduros. Os indivíduos provenientes de esporos congelados apresentaram um número de folhas semelhante ao observado em plantas com um ano de idade obtidas a partir de esporos frescos, e um número maior de folhas férteis em relação a essas mesmas plantas (aproximadamente 34 folhas, sendo um terço fértil – capítulo 6).

Ademais, nesse estudo foi comprovado que megásporos e micrósporos de *I. cangae* não são clorofilados, exibem uma relativa tolerância à dessecação e são capazes de se manterem viáveis em temperaturas ultrabaixas. A dessecação dos esporos inibe grande parte das atividades enzimáticas, o que, em conjunto com baixas temperaturas, reduz as taxas respiratórias e

metabólicas das células, permitindo a manutenção de sua viabilidade durante longos períodos (Harrington 1963). Além disso, o baixo conteúdo hídrico eleva a viscosidade citoplasmática, o que desacelera a formação dos cristais de gelo em temperaturas congelantes e facilita a sobrevivência dos esporos (Wesley-Smith et al. 2004). O declínio do percentual de fecundação dos esporos após um ano de armazenamento evidencia a necessidade de novos estudos para comprovação da eficiência do protocolo.

Grandes lacunas ainda existem no entendimento das condições fisiológicas ideais para a preservação de esporos de samambaias e licófitas e os impactos do armazenamento a longo prazo na longevidade do material preservado (Ballesteros et al. 2012). Apesar do grande número de espécies de *Isoetes* ameaçadas encontradas nos trópicos, ainda são escassos os programas de conservação *ex situ* para elas (Caldeira et al. 2019). Diante do exposto, o desenvolvimento de protocolos para preservação de esporos e cultivo de plantas *in vitro* é fundamental para constituição dos bancos ativos de geroplasma e, em conjunto com ações de conservação *in situ*, imprescindíveis para garantir a diversidade genética de espécies ameaçadas.

## 10.4 Microrganismos Potenciais para Promoção do Crescimento de *Isoetes cangae*

Em habitats naturais, diferentes comunidades microbianas estão associadas às diferentes espécies de plantas e podem exercer um papel benéfico ao crescimento delas, em uma relação de simbiose. Os microrganismos envolvidos nessas associações possuem grande importância biotecnológica, já que são produtores de metabólitos secundários que afetam a fisiologia das plantas (Strobel e Long 1998, Azevedo 2000). Nesta seção serão apresentados estudos desenvolvidos com isolados bacterianos e esporos de fungos micorrízicos que têm se mostrado promissores por seu potencial biotecnológico e de promoção de crescimento vegetal, tema ainda pouco explorado na bibliografia no que tange à associação com *I. cangae*.

### 10.4.1 Bactérias endofíticas

A seleção e a aplicação de inóculos contendo microrganismos promotores de crescimento de plantas surgem como uma alternativa biotecnológica sustentável para mitigar os efeitos deletérios nos cultivos vegetais, uma vez

que atuam promovendo o crescimento direto ou indireto, como agentes de controle biológico de doenças de plantas (Kuss et al. 2007, Asghar et al. 2002).

Amorim e Melo (2002) destacaram que as bactérias benéficas podem auxiliar em todo o ciclo das plantas, possibilitando aumentos na taxa de germinação, desenvolvimento de órgãos reprodutivos e aumento de produtividade. Diante do exposto, o presente estudo investigou o desempenho do crescimento da planta nativa *I. cangae*, por meio da aplicação de bactérias endofíticas em elevadas concentrações, segundo os estudos de Adhikari et al. (2001), Bai e Smith (2003), Castro et al. (2007) e Chanway et al. (2000).

Inicialmente, foram realizadas as seguintes etapas: isolamento de bactérias endofíticas associadas a *I. cangae*, caracterização morfológica, identificação molecular e avaliação do potencial de fixação de nitrogênio, produção de ácido indolacético (AIA) e sideróforos, além da mineralização de fosfato (Ribeiro et al. 2018).

Após a avaliação do potencial de promoção de crescimento de 49 isolados bacterianos, quatro estirpes identificadas como *Acinetobacter soli* (OC10 e LF5), *Enterobacter* sp. (NF8), e *Bacillus* sp. (NR4) foram selecionadas para montagem dos consórcios bacterianos. Todas as estirpes selecionadas apresentaram potencial de fixação de nitrogênio e mineralização de fósforo. O potencial de produção de sideróforos foi observado para as estirpes OC10, NF8, enquanto a produção de ácido indol acético (AIA) foi detectada para as estirpes OC10, NF8, NR4. Em seguida, tendo em vista a montagem de um consórcio bacteriano, o perfil antagonista das estirpes selecionadas foi avaliado por meio da técnica *cross-streak*, de acordo com Velho-Pereira e Kamat (2011). A antibiose e/ou competição por espaço e nutriente, exercida entre bactérias, pode prejudicar o cultivo simultâneo de microrganismos (Velho-Pereira e Kamat 2011). Tal fato pode ser decorrente de diferentes mecanismos, tais como síntese de substâncias antimicrobianas, secreção de enzimas líticas, alteração de pH e/ou síntese de compostos voláteis, representando perdas ou inibição entre as espécies bacterianas, quando cultivadas em consórcio (Li et al. 2012).

Os consórcios foram constituídos a partir das seguintes colônias bacterianas: consórcio 1: OC10, correspondente à espécie *Acinetobacter soli* (fixadora de nitrogênio, produtora de sideróforos e mineralizadora de fósforo); NF8, correspondente ao gênero *Enterobacter* sp. (produtora de AIA, fixadora de nitrogênio, produtora de sideróforos e mineralizadora de fósforo); NR4, *Bacillus* sp. (fixadora de nitrogênio, mineralizadora de fósforo e produtora de AIA). Cabe destacar que um segundo consórcio também foi desenvolvi-

do, aplicando os isolados LF5 (fixadora de nitrogênio, produtora de sideróforos e mineralizadora de fósforo), correspondente à *Acinetobacter soli*, em associação à NF8 e à NR4, previamente descritas.

Em função dos resultados obtidos, dois consórcios distintos foram desenvolvidos: o primeiro (C1), constituído pelas estirpes OC10, NF8 e NR4, e o segundo (C2), pelas estirpes LF5, NF8 e NR4.

#### **10.4.1.1 Ensaios de inoculação: plantas jovens e adultas oriundas do Lago do Amendoim**

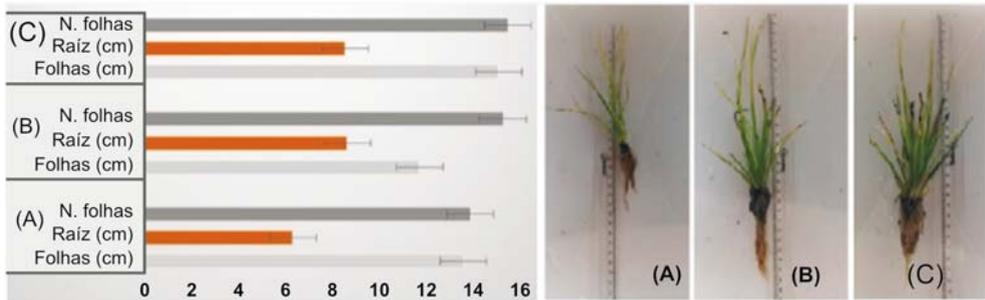
Os ensaios foram realizados no Viveiro do NUPEM/UFRJ, onde as plantas foram aclimatadas em substrato arenoso e Jiffy<sup>®</sup>, devidamente esterilizados e adicionados de água destilada na proporção 1:10 (substrato: água). O desenho experimental continha 30 plantas em microcosmos: 15 plantas jovens, oriundas do Lago do Amendoim, e 15 plantas adultas, oriundas do Lago do Amendoim. Ademais, as plantas adultas foram podadas ao início dos ensaios de forma que as folhas e as raízes se mantivessem em proporções semelhantes ao início dos ensaios. Os tratamentos 1, 2 e 3 consistem no cultivo de *I. cangae* por meio da aplicação dos consórcios denominados C1, C2, bem como controle (sem adição de microrganismos), respectivamente. Para cada tratamento foram utilizados cinco indivíduos de *I. cangae*.

Os microrganismos foram ativados em caldo LB na proporção de 10 % v/v, incubados a 28 °C a 100 rpm por 18-24 h. A inoculação no sedimento foi feita por meio de seringas estéreis, após centrifugação 8 000 rpm e ressuspensão em solução salina 0,9 % v/v (adaptado de Somasegaram et al. 1985, Ribeiro et al. 2018). Após seis meses de cultivo com os inoculantes adicionados às plantas jovens a cada três meses, oriundas do lago, os resultados do tratamento 1 se mantiveram visualmente mais favoráveis, no que tange à robustez radicular, bem como foliar, quando comparados ao controle, conforme observado na figura 10.7A e B.



**Figura 10.7** (A) Crescimento de plantas jovens sem inoculante bacteriano (controle). (B) Efeito da aplicação do consórcio 1 (C1) em plantas jovens oriundas do Lago do Amendoim, após cultivo em viveiro. (C) Indivíduo de *I. cangae* cultivado com o C1 após três meses, sob condições extremas de temperatura e desidratação.

Os resultados referentes às plantas jovens, demonstrados na figura 10.8, assim como das plantas adultas coletadas no Lago do Amendoim, indicam que os melhores resultados foram obtidos pela aplicação do consórcio 1 diante das plantas jovens e pela aplicação do consórcio 2 nas plantas adultas. As variáveis de resposta representadas pelo número de folhas e tamanho médio das folhas, após cultivo vegetal, não apontaram variações significativas entre os tratamentos citados. No entanto, o comprimento médio da raiz diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ), por meio do teste ANOVA, em ambos os ensaios com plantas jovens e adultas, realizado com os tratamentos 1 e 2. O consórcio 1 (C1) destacou-se dos demais, indicando melhorias no cultivo vegetal. Segundo Mantelin e Touraine (2004), os efeitos positivos causados pela adição de bactérias promotoras do crescimento vegetal estão sempre relacionados a alterações morfológicas da raiz, corroborando para o resultado do referido desenho experimental.



**Figura 10.8** Crescimento de folhas e raiz da planta *I. cangae* (plantas jovens) oriundas do Lago do Amendoim, a partir de diferentes tratamentos com inoculantes bacterianos (C1, C2) e controle.

Cabe ressaltar que o tratamento com o consórcio 1 também destacou-se dos demais em ambos os ensaios com plantas provenientes do Lago do Amendoim (jovens e adultas), no que tange à maior sobrevivência em condições extremas de seca, temperaturas elevadas durante o período de três meses (03/2020 a 05/2020) (figura 10.7C). Neste sentido, os inoculantes mostraram-se promissores ao crescimento radicular e à manutenção vegetal, beneficiando-o fisiologicamente e possibilitando maior tolerância ao estresse ocasionado por fatores abióticos e bióticos. Os resultados corroboram para os estudos de De Souza et al. (2021), que verificaram melhorias significativas no cultivo do milho, por meio da aplicação de diferentes estirpes de *Bacillus spp.*, gênero que também foi incluído na confecção dos consórcios de bactérias utilizados neste trabalho. A figura 10.7C ilustra um indivíduo de *I. cangae* cultivado com o tratamento 1, indicando que a aplicação desse consórcio possibilitou a manutenção dele em condições extremas.

#### 10.4.1.2 Ensaios de inoculação: plantas jovens oriundas dos tanques de cultivo

Os resultados descritos acima permitiram a realização de ensaios de inoculação para investigar o crescimento de *Isoetes cangae* oriundas de tanques de cultivo. Os ensaios foram realizados nas condições descritas anteriormente, sendo utilizado o desenho experimental com 15 plantas em microcosmos, sendo cinco indivíduos de *I. cangae* para cada tratamento.

Após seis meses de cultivo com os consórcios adicionados nas plantas oriundas dos tanques de cultivo, os resultados dos tratamentos com os isolados bacterianos mantiveram-se positivos quando comparados ao controle,

apresentando melhorias de até 50 % do crescimento plantular na presença do consórcio. Os melhores resultados foram obtidos pela aplicação do consórcio 1, seguido do Controle.

O comprimento médio da raiz diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) por meio do teste ANOVA realizado entre os diferentes tratamentos. As demais variáveis de resposta do cultivo vegetal, representadas pelo número de folhas no cultivo das plantas, tamanho médio das folhas, apresentaram-se superiores, embora não tenha ocorrido diferença estatística significativa. No entanto, as plantas adicionadas de inoculantes apresentam-se mais robustas, além do comprimento foliar e de variáveis quantificados, conforme reportado por De Souza et al. (2021).

Os ensaios indicaram que as espécies de *I. cangae* cultivadas nos tanques também demonstraram variações expressivas quanto ao monitoramento de espécies bacterianas presentes no cultivo em relação ao Lago do Amendoim. Nestes casos, o uso dos inoculantes nas plantas cultivadas nos tanques são de suma relevância para manutenção das bactérias endofíticas promotoras do crescimento vegetal. Consideramos, então, que as plantas que possuem *deficit* de microrganismos presentes no ambiente de crescimento/cultivo podem ser fortemente beneficiadas com o uso dos inoculantes. Salienta-se que, mesmo as plantas jovens e adultas, oriundas diretamente do Lago do Amendoim (ambiente endêmico), obtiveram respostas relevantes em relação ao tamanho de raiz, bem como robustez, assim como números favoráveis em termos de disponibilização de nitrogênio e fósforo, e maior resistência a condições abióticas extremas, também constatado por Etesami et al. (2018).

Chi et al. (2005) também verificaram que a inoculação de bactérias influenciou na área foliar e na biomassa da parte aérea, atribuindo tais alterações ao aumento na capacidade fotossintética. Segundo De Andrade et al. (2019), um consórcio contendo o gênero *Enterobacter sp.*, produtor de AIA e fixador de nitrogênio, conforme conduzido no presente trabalho, foi aplicado periodicamente na espécie *Fragaria ananassa* e possibilitou melhorias do crescimento na parte aérea do vegetal. Adicionalmente, Kleingesinds (2010) reportou que a aplicação de *Acinetobacter sp.*, gênero bacteriano presente também neste estudo, promoveu um acréscimo no número de folhas sem aumento do comprimento foliar, indicativo este favorável para a fisiologia e a resistência da planta a estresses abióticos. Neste sentido, outros estudos corroboram para os resultados apresentados nos presentes ensaios. Diante do exposto, os resultados alcançados apresentaram-se extremamente positivos no que concerne aos tratamentos com aplicação do consórcio de inoculantes.

Portanto, o presente estudo reforça a importância dos microrganismos promotores do crescimento diante da saúde de espécies vegetais. Além disso, os inoculantes bacterianos podem conferir maior resistência a possíveis infecções nas próximas gerações de *Isoëtes cangae*. Perspectivas proveem o desenvolvimento de diferentes estratégias de inoculação dos consórcios, com base na ampliação de escala e no desenvolvimento de tecnologias para imobilização de células, de forma a proporcionar maior habilidade para alguns microrganismos fixarem-se em diferentes ambientes, promovendo resultados melhores de crescimento/produção dos consórcios bacterianos.

#### 10.4.2 O potencial de fungos micorrízicos arbusculares em *Isoëtes cangae*

Os fungos micorrízicos, em geral, associam-se às raízes das plantas sem lhes causarem doenças e estabelecem uma relação de mutualismo em que ambos se beneficiam. Esses fungos aumentam a capacidade de absorção de água e nutrientes das plantas enquanto essas fornecem aos fungos carboidratos e vitaminas essenciais para o seu desenvolvimento. Aproximadamente 80 % das espécies de plantas terrestres formam simbiose micorrízica com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Wang e Qiu 2006). A bibliografia sobre o tema mostra que os FMAs têm papel importante no crescimento, e a fisiologia das plantas hospedeiras podem aumentar a competitividade da planta, com consequência importante na estrutura da comunidade vegetal (Sikes et al. 2009, Vander Heijden e Horton 2009, *apud* Fusconi e Mucciarelli 2018). Além de trazer benefícios às plantas com quem estão associados, os FMAs podem também influenciar positivamente o ambiente em que se encontram, uma vez que são amplamente conhecidos por sua participação na fitorremediação de ambientes impactados pelos mais diversos tipos de contaminantes.

Devido à importância crescente dos fungos, em especial os FMAs e o seu papel na biotecnologia como biorremediador, um desdobramento das pesquisas com *I. cangae* tem sido a busca pela identificação de FMA associado a essa espécie de planta. Dessa forma, *I. cangae* pode apresentar efeito fitorremediador, principalmente devido à associação com FMAs específicos, tornando uma espécie útil para cultivo em áreas com águas oligotróficas contaminadas com metais. A redução na biodisponibilidade de metais no solo e na água pode ter papel fundamental na recuperação desses ambientes utilizando uma espécie nativa.

Para a identificação de espécies de FMA presentes nas raízes e rizosfera da *I. cangae* foi utilizada uma técnica denominada cultura-armadilha. Essa técnica é comumente utilizada para multiplicar os esporos, já que em campo é mais difícil de se conseguir uma quantidade grande de esporos viáveis representantes de todas as espécies na associação. Assim, foram montados potes de cultura utilizando areia e substrato Jiffy® autoclavados e a raiz da *I. cangae* proveniente do campo como inóculo. A planta hospedeira escolhida foi a *Brachiaria brizantha*, por ter a maior biomassa radicular e rápido crescimento. Os cultivos foram podados a cada três meses e passaram por regimes de estresse hídrico programados para estimular a produção de esporos de FMA.

Após um ano do cultivo, os esporos foram extraídos do substrato pela técnica do peneiramento úmido e centrifugação com solução de sacarose 60 % (Gerdermann e Nicolson 1963, Brundrett et al. 1996). Os esporos extraídos ainda estão em processo de identificação morfológica e molecular (figura 10.9).

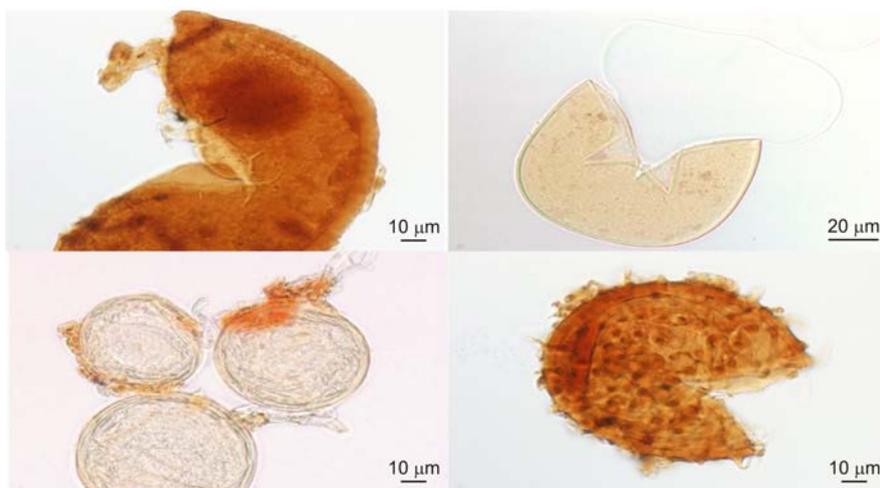


Figura 10.9 Morfotipos de esporos já obtidos por meio da técnica de cultura armadilha.

Como perspectiva futura, a identificação dos esporos obtidos com a técnica cultura-armadilha, bem como das comunidades de FMA associadas a *I. cangae* será realizada por meio de técnicas moleculares, utilizando gene-alvo específico para esse grupo de interesse de fungos micorrízicos.

## Referências

- Abeli, T. et al. 2018. A gleam of hope for the critically endangered *Isoëtes malinverniana*: Use of small-scale translocations to guide conservation planning. – *Aquat Conserv* 28: 501-505.
- Adesemoye, A. O. e Kloepper, J. W. 2009. Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. – *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1-12.
- Adhikari, T. B. et al. 2001. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. – *Can J Microbiol* 47: 916-924.
- Agrawal, D. C. et al. 1993. Cryopreservation of Spores of *Cyathea spinulosa* Wall. ex. Hook. f. – An Endangered Tree Fern. – *J Plant Physiol* 142: 124-126.
- Amorim, E. P. D. R. e Melo, I. S. D. 2002. Ação antagonista de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e p. citrophthora e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. – *Rev Bras Frutic* 24: 565-568.
- Asghar, H. et al. 2002. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. – *Biol Fertil Soils* 35: 231-237.
- Azevedo, J. L. et al. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. – *Electron J Biotechnol* 3: 15-16.
- Bai, Y. et al. 2003. Enhanced Soybean Plant Growth Resulting from Coinoculation of Bacillus Strains with *Bradyrhizobium japonicum*. – *Crop Sci* 43: 1774-1781.
- Ballesteros, D. 2010. Conservation of Fern Spores. – In: Kumar, A. et al. (eds), *Working with Ferns: Issues and Applications*. Springer, pp. 165-172.
- Ballesteros, D. e Walters, C. 2007. Water properties in fern spores: sorption characteristics relating to water affinity, glassy states, and storage stability. – *J Exp Bot* 58: 1185-1196.
- Ballesteros, D. e Pence, V. C. 2018. Fern Conservation: Spore, Gametophyte, and Sporophyte *Ex Situ* Storage, *In Vitro* Culture, and Cryopreservation. – In: Fernández, H. (ed), *Current Advances in Fern Research*. Springer International Publishing, pp. 227-249.
- Ballesteros, D. et al. 2006. Responses of Pteridophyte spores to ultrafreezing temperatures for long-term conservation in Germplasm Banks. – *Fern Gaz* 17: 293.

- Ballesteros, D. et al. 2011. Effect of Storage Temperature on Green Spore Longevity for the Ferns *Equisetum ramosissimum* and *Osmunda regalis*. – Cryoletters 32: 89-98.
- Ballesteros, D. et al. 2012. Effects of temperature and desiccation on *ex situ* conservation of nongreen fern spores. – Am J Bot 99: 721-729.
- Benson, E. E. 2008. Cryopreservation theory. In: Reed, B. M., Editor. Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer, New York, NY, USA, pp. 15-32.
- Caldeira, C. F. et al. 2019. Sporeling regeneration and *ex situ* growth of *Isoëtes cangae* (Isoetaceae): Initial steps towards the conservation of a rare Amazonian quillwort. – Aquat Bot 152: 51-58.
- Castro-Sowinski, S. et al. 2007. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. – FEMS Microbiol Lett 276: 1-11.
- Chanway, C. P. et al. 2000. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. – For Ecol Manage 133: 81-88.
- de Andrade, F. M. et al. 2019. Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. – Microbiol Res 223-225: 120-128.
- de Sousa, S. M. et al. 2021. Tropical Bacillus Strains Inoculation Enhances Maize Root Surface Area, Dry Weight, Nutrient Uptake and Grain Yield. – J Plant Growth Regul 40: 867-877.
- de Souza, E. H. et al. 2015. Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic Forest. – Euphytica 204: 13-28.
- Deredec, A. e Courchamp, F. 2007. Importance of the Allee effect for reintroductions. – Écoscience 14: 440-451.
- Dyer, A. F. 1994. Natural soil spore banks – can they be used to retrieve lost ferns? – Biodivers Conserv 3: 160-175.
- Etesami, H. e Maheshwari, D. K. 2018. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. – Ecotoxicol Environ Saf 156: 225-246.

- Faulkner, P. et al. 2009. *Isoëtes louisianensis* (Louisiana quillwort) transplant project: partnership in action. – Poster presentation at the Center for Plant Conservation's International Symposium, St Louis, Missouri.
- Galán, J. M. G. y. e Prada, C. 2010. Pteridophyte spores viability. – In: Kumar, A. et al. (eds), Working with Ferns: Issues and Applications. Springer, pp. 193-205.
- Godefroid, S. et al. 2011. How successful are plant species reintroductions? – Biol Conserv 144: 672-682.
- Harrington, J. F. 1962. The effect of temperature on the germination of several kinds of vegetable seeds. – Proceedings of the 16th International Horticultural Congress 2: 435-441.
- Ibars, A. M. e Estrelles, E. 2012. Recent developments in *ex situ* and *in situ* conservation of ferns. – Fern Gaz 19: 67.
- Kennedy, K. et al. 2012. Synthesis and Future Directions. – In: Maschinski, J. et al. (eds), Plant Reintroduction in a Changing Climate: Promises and Perils. The Science and Practice of Ecological Restoration. Island Press/Center for Resource Economics, pp. 265-275.
- Kleingesinds, C. K. 2010. Efeito da inoculação de uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio (*Acinetobacter* sp. ICB117) no desenvolvimento da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. variedade SP791011). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- Kuss, A. V. et al. 2007. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. – Pesq agropec bras 42: 1459-1465.
- Lansdown, R. V. 2019. *Isoëtes cangae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T136249847A136250011.
- Li, Y. e Shi, L. 2014. Effect of desiccation level and storage temperature on green spore viability of *Osmunda japonica*. – Cryobiology 68: 446-450.
- Li, H. et al. 2012. Endophytic *Bacillus subtilis* ZZ120 and its potential application in control of replant diseases. – Afr J Biotechnol 11: 231-242.
- Lloyd, R. M. e Klekowski, E. J. 1970. Spore Germination and Viability in Pteridophyta: Evolutionary Significance of Chlorophyllous Spores. – Biotropica 2: 129-137.

- Mallón, R. et al. 2007. Encapsulation of moss buds: an efficient method for the *in vitro* conservation and regeneration of the endangered moss *Splachnum ampullaceum*. – Plant Cell Tiss Organ Cult 88: 41-49.
- Mantelin, S. e Touraine, B. 2004. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. – J Exp Bot 55: 27-34.
- Maschinski, J. e Albrecht, M. A. 2017. Center for Plant Conservation's Best Practice Guidelines for the reintroduction of rare plants. – Plant Divers 39: 390-395.
- Orsenigo, S. 2018. Editorial: How to halt the extinction of wetland-dependent plant species? The role of translocations and restoration ecology. – Aquat Conserv 28: 772-775.
- Pence, V. 2002. Cryopreservation and *in vitro* methods for *ex situ* conservation of pteridophytes. – Fern Gaz 16: 362-368.
- Pence, V. C. 2008. *Ex situ* conservation of ferns and lycophytes – approaches and techniques. – In: Haufler, C. H. and Ranker, T. A. (eds), *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes*. Cambridge University Press, pp. 284-300.
- Pennisi, E. 2010. Tending the Global Garden. – Science 329: 1274-1277.
- Pereira, J. B. D. S. et al. 2016. Two New Species of *Isoëtes* (Isoetaceae) from northern Brazil. – Phytotaxa 272: 141-148.
- Pimm, S. L. e Raven, P. H. 2017. The Fate of the World's Plants. – Trends Ecol Evol 32: 317-320.
- Potters, G. et al. 2007. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? – Trends Plant Sci 12: 98-105.
- Prado, J. et al. 2015. Diversity of ferns and lycophytes in Brazil. – Rodriguésia 66: 1073-1083.
- Ribeiro, V. P. et al. 2018. Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. – Braz J Microbiol 49: 40-46.
- Rogge, G. D. et al. 2000. Cryopreservation of spores of *Dicksonia sellowiana*: an endangered tree fern indigenous to South and Central America. – Cryo Letters 21: 223-230.
- Saxena, A. et al. 2019. Synthetic Seeds: Relevance to Endangered Germplasm Conservation *In Vitro*. – In: Faisal, M. and Alatar, A. A. (eds), *Synthetic Seeds: Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects*. Springer International Publishing, pp. 21-60.

Silcock, J. L. et al. 2019. Threatened plant translocation in Australia: A review. – *Biol Conserv* 236: 211-222.

Simpson, M. 2019. Evolution and Diversity of Vascular Plants. – In: *Plant Systematics*. 3rd Edition. Academic Press, pp. 75-130.

Somasegaran, P. e Hoben, H. J. 1985. Methods in legume-Rhizobium technology. University of Hawaii, NifTAL Project and Mircen, Hawaii. 510 p.

Strobel, G. A. e Long, D. M. 1998. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. – *Amer Soc Microbiol News* 64: 263-268.

Troia, A. et al. 2016. The genus *Isoëtes* (Isoetaceae): a provisional checklist of the accepted and unresolved taxa. – *Phytotaxa* 277: 101-145.

Velho-Pereira, S. e Kamat, N. M. 2011. Antimicrobial Screening of Actinobacteria using a Modified Cross-Streak Method. – *Indian J Pharm Sci* 73: 223-228.

Volis, S. 2016. How to conserve threatened Chinese plant species with extremely small populations? – *Plant Divers* 38: 45-52.

Volis, S. 2017. Conservation utility of botanic garden living collections: Setting a strategy and appropriate methodology. – *Plant Divers* 39: 365-372.

Wesley-Smith, J. et al. 2004. The influence of water content, cooling and warming rate upon survival of embryonic axes of *Poncirus trifoliata* (L.). – *Cryoletters* 25: 129-138.

Wolkers, W. F. e Oldenhof, H. 2021. Principles Underlying Cryopreservation and Freeze-Drying of Cells and Tissues. – In: Wolkers, W. F. and Oldenhof, H. (eds), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Methods in Molecular Biology. Springer US, pp. 3-25.

## CAPÍTULO 11

---

---

### Considerações Finais e Perspectivas para a Conservação de *Isoëtes cangae*

\* *Fernando Marino Gomes dos Santos* \* *Emiliano Nicolas Calderon*  
\* *Cecílio Frois Caldeira* \* *Allysson Buraslan Cavalcante*  
\* *Rodrigo Lemes Martins*

TÍTULO CURTO (*RUNNING TITLE*)

---

---

Presente e Futuro das Pesquisas em *Isoëtes cangae*

## Resumo

O presente capítulo resume os avanços alcançados por meio das pesquisas apresentadas nos diferentes capítulos, focando em como este conhecimento está sendo útil para subsidiar ações efetivas de conservação da espécie *Isoëtes cangae*. Em suma, os estudos possibilitam avanços na conservação *in situ* e *ex situ* de *I. cangae*, por meio de diferentes estratégias, incluindo a colonização assistida em outros corpos hídricos naturais da Floresta Nacional de Carajás e em sistemas artificiais. Os resultados obtidos até o momento estão sendo utilizados para embasar a criação de um programa de conservação da espécie, atendendo às demandas dos órgãos ambientais relacionadas ao licenciamento ambiental do Projeto Ferro Carajás S11D. Destaca-se também que as pesquisas estão em total consonância com a política nacional da biodiversidade do Brasil e com a legislação ambiental do país, que têm como foco principal a conservação da biodiversidade e a utilização sustentável de seus recursos. Por fim, são apresentadas algumas ações que ainda estão em andamento no âmbito da parceria de pesquisas entre a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), o Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável (ITVDS) e a Vale.

**Palavras-chave:** translocação de conservação, colonização assistida, conservação *ex situ*, cultivo em larga escala, monitoramento genético.

## 11.1 Introdução

Os capítulos anteriores reuniram diversas pesquisas produzidas por mais de 40 pesquisadores, de graduandos até pesquisadores seniores, das áreas de taxonomia, fisiologia, ecologia, botânica, genética, química e microbiologia, provenientes da UFRJ e do ITVDS. Essas pesquisas, desenvolvidas em parceria com a Vale S.A., são multidisciplinares e visam produzir conhecimento fundamental para subsidiar tomadas de decisão quanto à execução de ações efetivas de conservação de *Isoëtes cangae*, e que podem ser replicadas em outras espécies macrófitas aquáticas.

No contexto conservacionista e da legislação ambiental brasileira destaca-se que as pesquisas desenvolvidas e aqui apresentadas estão em consonância com a atual política nacional da biodiversidade (Decreto nº 4 339, de 22 de agosto de 2002), cujo objetivo geral foi pautado na promoção, de forma integrada, da conservação da biodiversidade e da utilização sustentável de seus recursos, sendo regida por diversos princípios, destacando:

- i) os ecossistemas devem ser entendidos e manejados em um contexto econômico, objetivando reduzir distorções de mercado que afetam negativamente a biodiversidade;
- ii) a pesquisa, a conservação *ex situ* e a agregação de valor sobre componentes da biodiversidade brasileira devem ser realizadas preferencialmente no país;
- iii) as ações nacionais de gestão da biodiversidade devem estabelecer sinergias e ações integradas com convenções, tratados e acordos internacionais relacionados ao tema da gestão da biodiversidade;
- iv) as ações de gestão da biodiversidade devem ter caráter integrado, descentralizado e participativo, permitindo que todos os setores da sociedade brasileira tenham, efetivamente, acesso aos benefícios gerados por sua utilização.

Cabe destacar ainda a Instrução Normativa (IN) ICMBio nº 6, de 03 de fevereiro de 2022, que regula a coleta de sementes e demais propágulos de espécies vegetais nativas em unidades de conservação federais, a qual evidencia a necessidade de ações cautelares de resgate e conservação *ex situ* para fins de restauração de paisagens e ecossistemas ou de recuperação populacional de espécies ameaçadas, à luz do Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC).

Nesse contexto, as pesquisas conduzidas pelo ITVDS se iniciaram em 2016, e, desde 2017, contaram com a participação protagonista da UFRJ, o que representou um forte incremento no processo de produção de conhecimento e formação de recursos humanos. Os avanços obtidos, dado o número de pesquisadores e instituições envolvidas, representam, sem dúvida, um dos maiores e mais produtivos esforços multidisciplinares para compreensão da biologia e evolução de uma espécie em território nacional. Espécie essa que, no nosso entendimento, é um excelente modelo de estudo para conservação de macrófitas aquáticas, cujo conhecimento gerado atualmente se encontra sintetizado em mais de duas dezenas de artigos e capítulos de livros, além da formação de recursos humanos vinculados às pesquisas realizadas.

Por fim, as pesquisas científicas para aprofundar o conhecimento sobre ecologia, reprodução, fisiologia, aclimatização, propagação e execução de protocolos de cultivo e translocação da espécie, até o presente momento, geraram informações suficientes para subsidiar a criação de um programa de conservação, atendendo às demandas dos órgãos ambientais relacionadas ao licenciamento ambiental vinculado ao Projeto Ferro Carajás S11D. Os estudos também já permitem avançar na conservação *in situ* e *ex situ* de *I. cangae*, utilizando diferentes estratégias, inclusive a colonização assistida em outros corpos hídricos naturais da Floresta Nacional de Carajás e em sistemas artificiais. Cabe destacar que as pesquisas desenvolvidas foram discutidas, formalizadas e aprovadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio) e pela chefia da Unidade de Conservação (Floresta Nacional dos Carajás – PA), onde elas estão sendo executadas por meio das licenças SISBio de pesquisa e coleta n<sup>os</sup> 59 724, 64 187 e 78 698 e todas as suas condicionantes são integralmente atendidas.

Este capítulo final pontua algumas ações que ainda se encontram em execução dentro da parceria de pesquisas entre a UFRJ, o ITVDS e a Vale S.A. Essas ações buscam o aumento de escala para a produção de plantas, necessárias aos ensaios de plantio em campo, com foco na colonização assistida. Também pontua os desdobramentos práticos, no contexto da conservação de *I. cangae*, do aprimoramento de alguns dos protocolos de análise dos biomarcadores de estresse para o estudo de *I. cangae* em campo e resultado do estudo da dinâmica populacional da espécie, que ainda demanda acompanhamento fitossociológico e limnológico ao longo de diversos ciclos sazonais.

## 11.2 Instalação de Planta de Cultivo em Larga Escala

Em um contexto conservacionista, o cultivo de *I. cangae* em larga escala é estratégico para a implementação de medidas ativas de conservação. Essas medidas podem apresentar vantagens, tais como:

- (1) manutenção de exemplares da espécie coletados em diferentes locais, preservando a diversidade genética da população;
- (2) reserva de espécimes para ações de colonização assistida sem necessidade de coletas adicionais na população natural do Lago do Amendoim;
- (3) estudos da espécie em condições alternativas ao natural, abrangendo diferentes aspectos como plasticidade morfológica e fisiológica ao longo do ciclo de vida, com especificidades sobre nutrição, reprodução e crescimento.

Quatro tipos de sistemas estão sendo implantados para produção vegetal em larga escala:

- (1) produção de *Isoëtes* em béqueres plásticos dispostos em viveiros do NUPEM/UFRJ;
- (2) produção de *Isoëtes* em uma planta experimental de biofábrica, mantida no laboratório do ITVDS;
- (3) produção de *Isoëtes* em aquários para semeadura, mantidos em ambientes abertos com iluminação natural direta no Viveiros de Mudanças de Carajás;
- (4) produção em larga escala de mudas de *Isoëtes* em sistemas controlados.

Um banco de espécimes é mantido ainda em sistema de quatro caixas d'água de 1 000 L, independentes, compondo uma população geneticamente diversa e que tem produzido, de forma natural, novos propágulos. Todos os modelos destinam sua produção para sistemas de piscinas desenvolvidos para rustificação de plantas antes que elas sejam transplantadas para outros ambientes, ou utilizadas em experimentos. A estrutura montada permite a produção/manutenção de 1 800 plantas em diferentes estágios de desenvolvimento, sem incluir as plantas em processo de rustificação, conforme apresentado no item seguinte.

Toda essa estrutura ainda será transferida futuramente dentro da Bio-fábrica do Projeto Ferro Carajás S11D, a qual contemplará laboratórios para produção de mudas das espécies endêmicas e restritas das cangas de Carajás, incluindo aquelas mais raras e que produzem pequenas quantidades de propágulos para que ações de conservação similares as já implementadas para o *I. cangae* possam ser executadas para toda a diversidade de plantas de Carajás. Por fim, esse complexo de laboratórios e viveiros servirá ainda como um centro de visitação e educação ambiental da empresa Vale, na região de Canaã dos Carajás.

### 11.3 Sistema de Rustificação em Piscinas

O sistema de rustificação em piscinas tem a finalidade de replicar o ambiente aquático da espécie. As plantas são mantidas o tempo todo submersas e fixadas ao substrato previamente testado na primeira fase do projeto. Esse modelo representa uma forma de acomodação dos exemplares produzidos *ex situ*. As piscinas de lona estão instaladas em área definida no Viveiro Florestal de Carajás de Serra Norte.

Atualmente há em operação seis piscinas de rustificação, sendo quatro no Viveiro de Mudas de Carajás, incluindo: duas piscinas de  $1,6 \times 2,6 \text{ m}^2$ , uma de  $3,2 \times 2,9 \text{ m}^2$  e uma de  $3,2 \times 1,6 \text{ m}^2$ ; e duas no NUPEM/UFRJ de  $1,6 \times 2,6 \text{ m}^2$ . Essas piscinas atualmente comportam até 1 700 plantas, em sistema rotativo de produção, suficiente para receber o volume de plantas produzido e instalado nos sistemas experimentais. A produção de novas plântulas tem sido realizada por meio de fecundação dentro das próprias áreas de rustificação, somando novos espécimes ao contingente de mudas produzidas.

### 11.4 Translocação de *Isoëtes cangae*

O processo de translocação pela colonização assistida de uma população representativa da diversidade genética original tem avançado de forma experimental dentro dos lagos, dos alagados e das barragens. Estes estudos consideram os resultados dos testes de interação realizados em condições experimentais de mesocosmos *ex situ* (em sistema montado no Viveiro Florestal de Carajás) e *in situ* (instalados nos lagos e barragens), nos quais os resultados indicam o Lago Três Irmãs – corpo 3 como o mais apropriado

para o desenvolvimento de *I. cangae* quando considerados os componentes físico-químicos do ambiente (água, sedimento, etc.), assim como a ausência de possíveis interações competitivas com outras macrófitas.

Sobre a metodologia de plantio, os estudos seguem considerando a realidade dos lagos, dos alagados e das barragens, os testes de estabelecimento assistido, os resultados dos experimentos-piloto e todo o arcabouço de conhecimentos já produzidos. Os espécimes de *I. cangae* estão sendo colocados em densidade superior à obtida por meio de estimativas conservadoras de população mínima viável (Dalapicolla et al. 2021), além de respeitar o conhecimento obtido a partir de levantamento demográfico em quatro diferentes períodos: setembro de 2018, setembro de 2021, março e outubro de 2022.

Os plantios consideram o estabelecimento direto no substrato, tendo suas raízes posicionadas a uma profundidade de cerca de 10 cm no sedimento, assim como a técnica semeadura com megásporos fecundados e mantidos em cápsula de alginato. Esta última, técnica inovadora de produção de sementes artificiais planejada para promover adensamento (capítulo 10).

Um aspecto relevante da colonização assistida são as interações ecológicas que se estabelecem entre a espécie manipulada e as já residentes no novo ambiente, que podem se impor como um desafio para o sucesso da colonização. Durante os experimentos-piloto realizados, foi detectada intensa atividade de herbivoria causada pela espécie exótica invasora, *Coptodon rendalli* (tilápia), introduzida no Lago Três Irmãs. Essa espécie tem sido apontada como provável responsável pela baixíssima diversidade no Lago Três Irmãs (capítulo 8) e, caso não seja excluída, ficam inviabilizadas quaisquer ações de incremento de biodiversidade no corpo hídrico, incluindo a translocação de *I. cangae*. As ações de despesca, atualmente em prática no lago, com autorização e supervisão dos gestores da unidade, têm se mostrado incipientes frente à capacidade reprodutiva da espécie exótica e demanda a aplicação de técnicas mais eficientes. Contudo, outras técnicas, além da despesca, não foram autorizadas pelo órgão ambiental até o momento, mesmo considerando os argumentos técnicos já apresentados pela equipe de pesquisadores envolvidos e as prerrogativas da IN ICMBio nº 06/2019, que dispõe sobre a prevenção de introduções e o controle ou erradicação de espécies exóticas ou invasoras em Unidades de Conservação Federais e suas zonas de amortecimento.

## 11.5 Monitoramento das Novas Populações de *Isoëtes cangae*

Desde o início das pesquisas, estão sendo realizadas análises da resposta fisiológica das plantas e alterações das condições ambientais encontra-

das no Lago Três Irmãs e na Barragem do Gelado. Os testes ampliaram-se e passaram a incluir exemplares de colonizações assistidas dispostas em alagados na região do Lago Três Irmãs. Esses testes vêm permitindo avaliar continuamente a dinâmica populacional, incluindo as taxas de crescimento e mortalidade, definindo a necessidade da implementação de estratégias de replantio. A avaliação contínua das populações também permite inferir sobre os possíveis resultados e consequências da translocação nos ambientes-alvo e contribuirá para a definição de novos ambientes favoráveis a estratégias de aumento da área de distribuição da espécie, o que poderá ampliar a área de ocorrência da espécie e reduzir o risco associado à manutenção de sua população em hábitat restrito.

Com base no exposto, os estudos atuais têm avançado com os seguintes objetivos:

- i) avaliar as condições abióticas e bióticas dos ambientes usados nos testes de estabelecimento da espécie com aqueles registrados em seu ambiente natural;
- ii) correlacionar a colonização de *I. cangae* com a presença ou ausência de outras espécies de organismos.

Para avaliação das condições limnológicas dos sistemas, considerando as variáveis abióticas e bióticas, coletas pontuais têm sido realizadas nos locais dos experimentos de colonização assistida de *I. cangae*, além de outros locais já monitorados pelo projeto de pesquisa. Os levantamentos biológicos e as coletas de amostras para análise de características da água estão sendo realizados trimestralmente, devendo ser mantida essa periodicidade enquanto o programa de monitoramento for executado, seguindo o ciclo sazonal: início do período seco, fim do período seco, início e fim do período chuvoso. Assim, espera-se identificar variações na comunidade vegetal, na água e no sedimento de acordo com a variação hídrica desses sistemas.

### **A) Variáveis abióticas**

A análise das variáveis abióticas deve seguir por meio de registradores autônomos instalados nos lagos, barragens e no Lago do Amendoim (para fins de controle). Esses equipamentos permitem a coleta de dados de diversos parâmetros físico-químicos da água em intervalo de poucas horas, fornecendo um conjunto de dados temporalmente robustos. Paralelamente ao monitoramento remoto, também é realizado um cronograma de coletas de água da subsuperfície para posterior análise em laboratório.

## **B) Comunidades bacterianas associadas à espécie *Isoëtes cangae* pós-translocação**

As pesquisas relatadas nos capítulos 2 e 8 já permitiram concluir que a espécie apresenta uma biodiversidade bacteriana alta associada aos tecidos da planta, sugerindo pouca dependência de microrganismos do sedimento e da rizosfera, o que pode favorecer o seu estabelecimento em um novo ambiente. No entanto, o monitoramento do impacto da incorporação de microrganismos inoculados, bem como a influência de um “core” microbiano associado às plantas e aos ambientes é um passo importante para definir o estado de saúde das plantas manipuladas em uma ação de colonização assistida, atuando também como mecanismo de detecção de estresses.

## **11.6 Monitoramento Genético das Populações de *Isoëtes cangae***

### **11.6.1 A diversidade genética e o monitoramento nas populações pós-translocação**

A manutenção da diversidade genética é um marco importante para a maioria dos planos de conservação de espécies (Mengxue et al. 2018) e um objetivo da Política Nacional de Biodiversidade. Estimar o nível e o padrão de variação genética dentro e entre as populações de espécies ameaçadas é necessário para fornecer informações fundamentais para a definição de estratégias de conservação eficazes (Hoban et al. 2020, Laikre et al. 2020).

Em geral, a maioria das espécies com ampla distribuição tem alta diversidade genética, tanto entre quanto dentro das populações. No entanto, populações pequenas, muitas dessas raras e endêmicas, podem apresentar reduzida variabilidade genética em função do pequeno tamanho populacional e são comumente diferenciadas em populações geneticamente únicas adaptadas às condições locais de sobrevivência e crescimento (Hamrick et al. 1996, Lande 1988). Assim, as espécies de plantas com pequenos tamanhos populacionais, em habitats isolados ou fragmentados, como *I. cangae*, sofrem maiores riscos de extinção devido à perda de variação genética causada por deriva genética e endogamia (Barrett e Kohn 1991).

Com base no exposto, as informações obtidas pelos marcadores moleculares na atual fase de pesquisa do projeto fornecem informações importantes e úteis sobre a estrutura das populações de *I. cangae*. A diversidade genética tem sido avaliada por meio de diversos tipos de marcadores (Santos et al.

2019, Nunes et al. 2018). A partir desse estudo tem sido determinada diversidade genética entre e dentro das populações, determinado com segurança o número mínimo viável de espécimes que deverão compor uma nova população estabelecida por colonização assistida.

Atualmente o valor que tem sido considerado, com base nas estimativas mais conservadoras para a manutenção da diversidade e sustentabilidade de uma população introduzida, é de 2 200 espécimes. Esse tamanho populacional foi calculado com base nos estudos de marcadores moleculares, incluindo ainda uma considerável margem de segurança para o sucesso das novas populações (Dalpicolla et al. 2021). As populações serão monitoradas numérica e geneticamente na tentativa de produzir informações dinâmicas, permitindo o sucesso no processo de introdução em novos ambientes e no conhecimento sobre a biologia genética e a evolução da espécie.

### 11.6.2 Marcadores de desenvolvimento e estresse no monitoramento de plantas

O sucesso na colonização assistida de uma espécie alvo de conservação em um novo hábitat depende da aclimatização da espécie às variações nas condições oferecidas pelo novo ambiente. Nesse contexto, o uso de marcadores de desenvolvimento e estresse permitem uma análise profunda e precisa das condições fisiológicas das plantas, viabilizando o monitoramento das futuras populações de *I. cangae* resultantes de ações de colonização assistida.

Assim, estão sendo analisados transcritos de genes-alvo relacionados ao desenvolvimento e estresse que codificam enzimas antioxidantes e do metabolismo energético (ex.: ATPases). Também está sendo realizado o sequenciamento de RNA (RNA seq), para verificar os transcritos em plantas submetidas a condições estressantes (como exemplo: alta/baixa luminosidade, estresse biótico, escassez nutricional) e não estressantes a fim de selecionar genes candidatos a marcadores para *Isoëtes*.

## 11.7 Manutenção da Diversidade *Ex Situ* – Banco de Germoplasma

A conservação de germoplasma é um complemento da conservação *in situ*, constituindo uma ferramenta de segurança adicional para a conservação das espécies, garantindo a possibilidade de sua perpetuidade em condições seguras e controladas, além de manter, permitir tentativas de reforço

populacionais e até mesmo reintroduções de populações extintas na natureza. A conservação de germoplasma é realizada em temperaturas ultrabaixas em que todos os processos metabólicos são desativados, permitindo a manutenção durante longos períodos (Benson et al. 1998).

Na atual etapa de pesquisa, diversos protocolos de preservação de esporos estão em teste. Os resultados denotam sucesso nos testes de criopreservação de esporos dessecados em nitrogênio líquido e apontam o congelamento em ultrafreezer como a alternativa mais viável para preservação de megásporos e micrósporos de *I. cangae*. Além disso, os melhores percentuais de germinação e geração de esporófitos, a partir de esporos dessecados, foram obtidos com essa abordagem, até o momento.

As pesquisas desenvolvidas mostram que os esporos de *I. cangae* se mostraram, tolerantes à dessecação, e os indivíduos jovens, oriundos de esporos dessecados, apresentaram desenvolvimento normal. O protocolo desenvolvido é funcional e representa o primeiro protocolo descrito para criopreservação de esporos de licófitas. De forma complementar, esporos coletados em campo também serão enviados para a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), conforme parceria estabelecida entre essa instituição e a Vale, compondo assim um novo banco de material germinativo para a espécie.

## 11.8 Conclusão e Perspectivas Futuras

Nesta obra foram apresentados avanços científicos e tecnológicos sobre biologia, ecologia e métodos de manejo desenvolvidos para *I. cangae*. Esses avanços alcançados em quase dez anos de estudos são um exemplo de como o conhecimento voltado para a conservação pode progredir a passos largos, partindo da descoberta da espécie até se tornar uma das licófitas mais bem estudadas e conhecidas atualmente (Prado et al. 2023).

Entendemos que os avanços produzidos para a espécie microendêmica de macrófita amazônica, *I. cangae*, podem ser aplicados para a conservação de outras espécies vegetais, que estão sob ameaça e possuem lacunas de conhecimento similares. Assim, *I. cangae* representa um modelo de estudo pioneiro que merece destaque no contexto da Biologia da Conservação e da colonização assistida como estratégia conservacionista. A atual maturidade do conhecimento, gerado com foco na conservação da espécie, a coloca na fronteira de se iniciarem ações ativas para sua conservação. Também devem ser consideradas as conclusões sobre as melhores práticas que podem reduzir os riscos de técnicas de gerenciamento ineficazes e possibilitar o sucesso na conservação de ambientes e espécies.

Por fim, cabe mencionar que antecipar estratégias, concentrando esforços nas etapas preventivas da hierarquia da mitigação, reduz o intervalo de tempo entre impacto (perdas de biodiversidade) e resultados de conservação (ganhos de biodiversidade), diminuindo as incertezas e os riscos à biodiversidade (Fernandes et al. 2022, Ekstrom et al. 2015, Gardner et al. 2013). Cabendo destacar que essa foi a premissa que direcionou os esforços de pesquisa aplicados na conservação de *Isoëtes cangae*.

Esperamos que nos próximos anos mais ações similares sejam planejadas e implementadas no Brasil, fruto de parcerias de órgãos ambientais, centros de pesquisa e empresas públicas ou privadas. Ações estas que já considerem a prática da colonização assistida como uma política pública dentro das prioridades de conservação desenvolvidas pelos órgãos ambientais, e pautadas pelo rigor técnico-científico, como aplicado internacionalmente (Abelli et al. 2020, Abelli et al. 2017, Comander et al. 2018).

## Referências

- Abeli, T. et al. 2018. A gleam of hope for the critically endangered *Isoëtes malinverniana*: Use of small-scale translocations to guide conservation planning. – *Aquat Conserv* 28: 501-505.
- Abeli, T. et al. 2020. The ecology of the endemic quillwort *Isoëtes malinverniana*: From basic research to legal and *in situ* conservation. – *Aquat Conserv* 30: 1719-1722.
- Barrett, S. C. H. e Kohn, J. R. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. – In: *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, pp. 3-30.
- Benson, E. E. et al. 1998. Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology. – *Ag Biotech News Inf* 10: 133-141.
- Chappuis, E. et al. 2015. Deleterious interaction of light impairment and organic matter enrichment on *Isoëtes lacustris* (Lycopodiophyta, *Isoëtales*). – *Hydrobiologia* 760: 145-158.
- Comander, L. E. et al. 2018. *Guidelines for the Translocation of Threatened Plants in Australia*. 3rd Edition. Australian Network for Plant Conservation, Canberra.

- Dalapiccola, J. et al. 2021. Conservation implications of genetic structure in the narrowest endemic quillwort from the Eastern Amazon. – *Ecol Evol* 11: 10119-10132.
- Ekstrom, J. et al. 2015. A cross-sector guide for implementing the Mitigation Hierarchy. – In: Cross Sector Biodiversity Initiative, Cambridge, UK.
- Fernandes, T. N. et al. 2023. Mainstreaming Flora Conservation Strategies into the Mitigation Hierarchy to Strengthen Environmental Impact Assessment. – *Environ Manage* 71: 483-493.
- Gardner, T. A. et al. 2013. Biodiversity Offsets and the Challenge of Achieving No Net Loss. – *Conserv Biol* 27: 1254-1264.
- Hamrick, J. L. e Godt, M. J. W. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. – In: Conservation genetics: case histories from nature. Chapman & Hall, Melbourne, pp. 281-304.
- Hoban, S. et al. 2020. Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity Framework must be improved. – *Biol Conserv* 248: 108654.
- ICMBio. 2009. Roteiro metodológico para a elaboração de plano de manejo para florestas nacionais (AR Gonçalves, CHV Fernandes, D Penteadó, and V Veloso, Eds.).
- Laikre, L. et al. 2020. Post-2020 goals overlook genetic diversity. – *Science* 367: 1083-1085.
- Lande, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. – *Science* 241: 1455-1460.
- Mengxue, M. A. et al. 2019. Outcrossing rates and gene flow in natural population of the endangered endemic aquatic lycophyte *Isoëtes yunguiensis* as revealed by ISSR markers. – *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca* 47: 339-346.
- Nunes, G. L. et al. 2018. Quillworts from the Amazon: A multidisciplinary populational study on *Isoëtes serracarajensis* and *Isoëtes cangae*. – *PLoS ONE* 13: e0201417.
- Prado, L. A. S. et al. 2023. Environmental characterization of an Amazonian Lake for *Isoëtes cangae* translocation. – *Plant Ecol* in press.
- Santos, M. P. et al. 2019. Genetic diversity by ISSR of two endemic quillworts (*Isoëtes* L.) species from Amazon Iron Rocky Outcrops, *Isoëtes cangae* e *I. serracarajensis*.: bioRxiv, 635771.



---

---

## Sobre os Autores

\* *Adriano Caliman*

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Mestre em Ecologia pela UFRJ e Doutor em Ecologia pela UFRJ. Filiação: Departamento de Ecologia – Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4147444251852878>.

Contato: [caliman21@gmail.com](mailto:caliman21@gmail.com)

\* *Aline Karl Araújo*

Graduada em Engenharia de Petróleo pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Lenep), Mestre em Engenharia de Produção pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e Doutora em Ciências Ambientais e Conservação em andamento pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (NUPEM). Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1158072953848391>.

Contato: [alinekarl.ufrj@gmail.com](mailto:alinekarl.ufrj@gmail.com)

\* *Aline Lemos Ferreira*

Graduada em Ciências Biológicas (ênfase em Biotecnologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Mestre Profissional em Ambiente, Sociedade e Desenvolvimento pela UFRJ e Doutoranda em Biotecnologia Vegetal pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Filiação: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8422671491452506>.

Contato: [alf97ufrj@gmail.com](mailto:alf97ufrj@gmail.com)

\* ***Allysson Buraslan Cavalcante***

Graduado em Engenharia Florestal pela Universidade Federal Rural da Amazônia, MBA em Perícia, Auditoria e Gestão Ambiental pelo Instituto de Pós-Graduação (IPOG) e Mestrando em Uso Sustentável de Recursos Naturais pelo Instituto Tecnológico Vale (ITV). Filiação: Vale S.A.

Lattes: <https://lattes.cnpq.br/1844949299465981>.

Contato: [allysson.cavalcante@vale.com](mailto:allysson.cavalcante@vale.com)

\* ***Analy Machado de Oliveira Leite***

Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Fluminense (UFF), Mestre e Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2481332921510340>.

Contato: [analyleite@yahoo.com.br](mailto:analyleite@yahoo.com.br)

\* ***Anderson da Rocha Gripp***

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Mestre e Doutor em Ecologia pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia da UFRJ. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5747006337228970>.

Contato: [argripp@ufrj.br](mailto:argripp@ufrj.br)

\* ***Antônio Jesus Dorighetto Cogo***

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Vila Velha, Mestre e Doutor em Biociências e Biotecnologia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9753308606151415>.

Contato: [antoniojesusdc@gmail.com](mailto:antoniojesusdc@gmail.com)

\* ***Arthur Vinícius de Sant'anna Lopes***

Graduado em Ciências Biológicas (ênfase em Biotecnologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Mestre pelo Programa de Pós-Graduação Profissional em Ambiente, Sociedade e Desenvolvimento pelo NUPEM/UFRJ. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <https://lattes.cnpq.br/7333960973043692>.

Contato: [lopes.arth@gmail.com](mailto:lopes.arth@gmail.com)

\* ***Cecilio Frois Caldeira***

Graduado em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Mestre em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Lavras e Doutor em Biologia Integrativa de Plantas pela Université de Montpellier/França. Filiação: Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável – ITVDS.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4071467514868919>.

Contato: [cecilio.caldeira@itv.org](mailto:cecilio.caldeira@itv.org)

\* ***Clarice Casa Nova***

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Mestre e Doutora em Ecologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (PPGE/UFRJ). Filiação: Universidade Federal do Rio de Janeiro e WSP Brasil.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4773918018263713>.

Contato: [casanova.cla@gmail.com](mailto:casanova.cla@gmail.com)

\* ***Daniel Basílio Zandonadi***

Graduado em Agronomia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Mestre em Produção Vegetal pela UENF e Doutor em Biotecnologia Vegetal pela UENF. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3660503715109916>.

Contato: [daniel.ufrj@icloud.com](mailto:daniel.ufrj@icloud.com)

\* ***Daniel da Silva Farias***

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Mestre em Ciências Biológicas pela UNIRIO e Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Filiação: Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (PPGE/UFRJ).

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9439538985414396>.

Contato: [fariassd@gmail.com](mailto:fariassd@gmail.com)

\* ***Danielle da Silveira dos Santos Martins***

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Santa Úrsula, Doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e PhD em Desenvolvimento de Bioprocessos no Núcleo de Biocombustíveis, Petróleo e seus Derivados (NBPD/Escola de Química da UFRJ). Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9231270931245394>.

Contato: [dani.usu@gmail.com](mailto:dani.usu@gmail.com)

\* ***Emiliano Nicolas Calderon***

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Mestre em Zoologia e Doutor em Ecologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1060859483970244>.

Contato: [emiliano.coral@gmail.com](mailto:emiliano.coral@gmail.com)

\* ***Erica Maria Pellegrini Caramaschi***

Graduada em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas pela Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, Mestre e Doutora em Ecologia e Recursos Naturais pela Universidade Federal de São Carlos. Filiação: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Departamento de Ecologia.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5356106015121653>.

Contato: [erica.caramaschi@gmail.com](mailto:erica.caramaschi@gmail.com)

\* ***Fabiola Máximo dos Santos***

Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0566371849934605>.

Contato: [fabiolamaximo04@gmail.com](mailto:fabiolamaximo04@gmail.com)

\* ***Fernando Marino Gomes dos Santos***

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Mestre em Biologia Vegetal pela UFMG. Filiação: Vale S.A. – Gerência de Estudos e Licenciamento Ambiental Corredor Norte.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1362180263162838>.

Contato: [fernando.gomes.santos@vale.com](mailto:fernando.gomes.santos@vale.com)

\* *Francisco de Assis Esteves*

Graduado em Biologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro e Doutor pelo Max-Planck Institut für Limnologie, Universität Kiel (Christian-Albrechts). Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6635523086396765>.

Contato: [festeves0409@gmail.com](mailto:festeves0409@gmail.com)

\* *Guilherme Corrêa de Oliveira*

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais e Doutor pela Texas A&M University. Foi pesquisador Titular da Fundação Oswaldo Cruz. Filiação: Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável – ITVDS.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8563794592947521>.

Contato: [guilherme.oliveira@itv.org](mailto:guilherme.oliveira@itv.org)

\* *Heitor Monteiro Duarte*

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Mestre em Ecologia pela UFRJ e Doutor em Botânica (Fisiologia Vegetal) pela Technische Universität Darmstadt, Alemanha. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade de Macaé – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3152169551717768>.

Contato: [heitor.m.duarte@gmail.com](mailto:heitor.m.duarte@gmail.com)

\* *Henrique Fragoso dos Santos*

Graduado em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia) pela UFRJ e Doutor em Microbiologia pela UFRJ, com doutorado sanduíche na University of Groningen/Holanda (Rijksuniversiteit Groningen). Filiação: Departamento de Biologia Marinha – UFF.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6070374339833433>.

Contato: [henriquefds@id.uff.br](mailto:henriquefds@id.uff.br)

\* *Hugo Emiliano de Jesus*

Graduado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Mestre e Doutor em Microbiologia pela Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes – UFRJ. Filiação: Universidade Federal Fluminense.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5608004523765034>.

Contato: [hugoemil@gmail.com](mailto:hugoemil@gmail.com)

\* ***Janiélio Gonçalves da Rocha***

Graduado em Agronomia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Mestre em Agronomia (Ciências do Solo) pela UFRRJ e Doutor em Produção Vegetal pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/ UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1824866350417900>.

Contato: [janieliogr@yahoo.com.br](mailto:janieliogr@yahoo.com.br)

\* ***Jeronymo Dalapicolla***

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Mestre em Biologia Animal pela UFES e Doutor em Ecologia Aplicada pela Universidade de São Paulo (USP). Filiação: Departamento de Sistemática e Ecologia, Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0831988373556961>.

Contato: [jeronymo@ccen.ufpb.br](mailto:jeronymo@ccen.ufpb.br)

\* ***José Augusto Pires Bitencourt***

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Fluminense (UFF), Mestre em Biologia Marinha pela UFF e Doutor em Biologia Marinha pela UFF. Filiação: Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável – ITVDS.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1330312158604944>.

Contato: [jose.augusto.bitencourt@itv.org](mailto:jose.augusto.bitencourt@itv.org)

\* ***Jorge Gabriel Fernandes Genovez***

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/ UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0375495655018233>.

Contato: [genovezgabriel@gmail.com](mailto:genovezgabriel@gmail.com)

\* ***José Tasso Felix Guimarães***

Graduado em Oceanografia pela Universidade Federal do Pará (UFPA), Mestre e Doutor em Geologia pela UFPA. Filiação: Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável – ITVDS.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9602707802326509>.

Contato: [tasso.guimaraes@itv.org](mailto:tasso.guimaraes@itv.org)

\* ***Jovani Bernardino de S. Pereira***

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), Mestre em Botânica pela UFPR e Doutor em Evolução e Biodiversidade de Plantas pela Ruhr-Universitaet Bochum (Alemanha).  
Filiação: Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA).

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7578850960256246>.

Contato: [jovanibio@gmail.com](mailto:jovanibio@gmail.com)

\* ***Laís Barreto Jordão***

Bacharel em Ciências Biológicas (ênfase em Meio Ambiente) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4427142399233674>.

Contato: [laisbarretojordao@gmail.com](mailto:laisbarretojordao@gmail.com)

\* ***Lísia M. S. Gestinari***

Graduada em Biologia Marinha pelas Faculdades Maria Thereza, Mestre em Ciências Biológicas (Biotecnologia Vegetal) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro e Doutora em Botânica pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0770145420421898>.

Contato: [lisiagestinari@nupem.ufrj.br](mailto:lisiagestinari@nupem.ufrj.br)

\* ***Luciana Silva Carneiro***

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Mestre e Doutora em Ecologia pela UFRJ. Filiação: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia, Laboratório de Ecologia Aquática.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0236958347394500>.

Contato: [lscarnei@gmail.com](mailto:lscarnei@gmail.com)

\* ***Luigi Pereira Cunha***

Graduado em Ciências Biológicas (ênfase em Biotecnologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Mestrando no Programa de Pós-Graduação Profissional em Ambiente, Sociedade e Desenvolvimento (PPG-ProASD) pelo NUPEM/UFRJ. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9753086959191868>.

Contato: [luigi.p.cunha@gmail.com](mailto:luigi.p.cunha@gmail.com)

\* ***Luis Alfredo dos Santos Prado***

Licenciado em Biologia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Mestre em Biociências e Biotecnologia pela UENF e Doutor em Produção Vegetal pela UENF. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9658731151802956>.

Contato: [luisprado9@hotmail.com](mailto:luisprado9@hotmail.com)

\* ***Luiz Carlos Felisberto Ribeiro***

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Mestrando pelo Programa de Pós-Graduação Profissional em Ambiente, Sociedade e Desenvolvimento da UFRJ. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3499052258650620>.

Contato: [lcfr79@gmail.com](mailto:lcfr79@gmail.com)

\* ***Lupis Ribeiro Gomes Neto***

Graduado em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Mestre em Biociências pela Universidade Federal do Rio de Janeiro *campus* Macaé e Doutor em Biociências e Biotecnologia pela UENF. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7151290270773342>.

Contato: [lupisribeiro@gmail.com](mailto:lupisribeiro@gmail.com)

\* ***Marcos Paulo Figueiredo-Barros***

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica) pelo Instituto Carlos Chagas Filho (UFRJ) e Doutor em Ecologia pela UFRJ. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6641181873729199>.

Contato: [marcosbarros@macae.ufrj.br](mailto:marcosbarros@macae.ufrj.br)

\* ***Mariana Cristina Huguet Marques***

Graduada em Licenciatura e em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e Mestre em Ciências Ambientais e Conservação pelo NUPEM/UFRJ. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1952251168824514>.

Contato: [marycpg@gmail.com](mailto:marycpg@gmail.com)

\* **Markus Gastauer**

Graduado em Agronomia e Mestre em Entomologia pela Rheinische Friedrichs-Wilhelm Universität Bonn e Doutor em Botânica pela Universidade Federal de Viçosa. Filiação: Instituto Tecnológico Vale.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3843526011662634>.

Contato: [markus.gastauer@itv.org](mailto:markus.gastauer@itv.org)

\* **Maurício Takashi Coutinho Watanabe**

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Bahia, Mestre e Doutor em Ciências (Botânica) pela Universidade de São Paulo. Filiação: Instituto Tecnológico Vale.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9674600946036518>.

Contato: [mauricio.watanabe@itv.org](mailto:mauricio.watanabe@itv.org)

\* **Mirella Pupo Santos**

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Mestre em Biologia Vegetal pela UFES e Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6150952876063565>.

Contato: [mirellapupo2020@gmail.com](mailto:mirellapupo2020@gmail.com)

\* **Naiara Viana Campos**

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Mestre e Doutora em Biologia Vegetal pela UFV. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6170651160514007>.

Contato: [naiaravcampos@gmail.com](mailto:naiaravcampos@gmail.com)

\* **Paula Veronesi Marinho Pontes**

Graduada em Farmácia – Habilidade Farmacêutico pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Habilitação em Farmacêutico Bioquímico: Análises Clínicas pela UFRJ e Mestre em Ciências (Microbiologia) pelo Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da UFRJ. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0015705314686743>.

Contato: [paulinhaveronesi@gmail.com](mailto:paulinhaveronesi@gmail.com)

\* ***Paloma Marinho Lopes***

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UFRJ), Mestre e Doutora em Ecologia pela UFRJ. Filiação: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Ecologia.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7867944224612563>.

Contato: [paloma.marinho@gmail.com](mailto:paloma.marinho@gmail.com)

\* ***Rafael Rodrigues Ferreira***

Graduado em Licenciatura em Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9004440602102808>.

Contato: [rafael.work2@gmail.com](mailto:rafael.work2@gmail.com)

\* ***Reinaldo Luiz Bozelli***

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Mestre e Doutor em Ecologia e Recursos Naturais pela UFSCar. Filiação: Departamento de Ecologia – Instituto de Biologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4521181963290823>.

Contato: [bozelli@biologia.ufrj.br](mailto:bozelli@biologia.ufrj.br)

\* ***Renan Monte de Oliveira***

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Mestrando pelo Programa de Pós-Graduação Profissional em Ambiente, Sociedade e Desenvolvimento da UFRJ. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2812684140248570>.

Contato: [renanmontedeoliveira@gmail.com](mailto:renanmontedeoliveira@gmail.com)

\* ***Rodrigo Lemes Martins***

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Uberlândia, Mestre em Biologia (Ecologia) pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Doutor em Ecologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9380597318217382>.

Contato: [rodr.lemes@gmail.com](mailto:rodr.lemes@gmail.com)

\* **Rodrigo Nunes da Fonseca**

Graduado em Ciências Biológicas (Modalidade Médica) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Mestre em Bioquímica pela UFRJ e Doutor em *Genetics and Functional Genomics* pela Universität zu Köln, UK, Alemanha. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5456237658132719>.

Contato: [rodrigo.nunes.da.fonseca@gmail.com](mailto:rodrigo.nunes.da.fonseca@gmail.com)

\* **Roger Paulo Mormul**

Graduado em Ciências Biológicas pela Faculdade Integrada de Campo Mourão, Mestre e Doutor em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais pela Universidade Estadual de Maringá. Filiação: Departamento de Biologia – DBI/UEM, Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais – PEA/UEM, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – Nupélia/UEM.

Lattes: <https://lattes.cnpq.br/5631386564754689>.

Contato: [roger@nupelia.uem.br](mailto:roger@nupelia.uem.br)

\* **Santelmo Vasconcelos**

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Mestre em Genética pela UFPE e Doutor em Biologia Vegetal pela UFPE. Filiação: Instituto Tecnológico Vale.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8188022776360266>.

Contato: [santelmo.vasconcelos@itv.org](mailto:santelmo.vasconcelos@itv.org)

\* **Sergio Luís Cavalheiro Filho**

Bacharel em Ciências Biológicas (ênfase em Meio Ambiente), Mestre em Ciências Ambientais e Conservação pelo Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3407408021011058>.

Contato: [sergiocavalheiro97@gmail.com](mailto:sergiocavalheiro97@gmail.com)

\* **Silvio Ramos**

Graduado em Engenharia Agrônoma pela Universidade Federal de Minas Gerais, Mestre e Doutor em Ciência do Solo pela Universidade Federal de Lavras. Filiação: Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável – ITVDS.

Lattes: CV: <http://lattes.cnpq.br/9652943228276515>.

Contato: [silvio.ramos@itv.org](mailto:silvio.ramos@itv.org)

\* ***Taís Nogueira Fernandes***

Graduada em Ciências Biológicas pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG), Mestre em Zoologia de Vertebrados (ênfase Ambientes Impactados) pela PUC-MG, MBA em Gestão de Projetos Ambientais pelo Instituto de Educação Tecnológica e Doutorado em Ciências pelo Departamento de Engenharia de Minas e Petróleo da Universidade de São Paulo. Filiação: Vale S.A.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2082295181541390>.

Contato: [tais.fernandes@vale.com](mailto:tais.fernandes@vale.com)

\* ***Thainá dos Santos Silva Araujo***

Graduada em Ciências Biológicas (ênfase em Meio Ambiente) pelo Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ. Filiação: Maricá Biotecnologia – CODEMAR/Prefeitura de Maricá, BIOTEC MARICÁ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5091542185848178>.

Contato: [thaina.s.araujo@gmail.com](mailto:thaina.s.araujo@gmail.com)

\* ***Théo Dias Arueira***

Graduado em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Mestrando em Ciências Ambientais e Conservação pelo Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade da UFRJ. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3076913673699997>.

Contato: [dias.theo98@gmail.com](mailto:dias.theo98@gmail.com)

\* ***Vinicius Fortes Farjalla***

Graduado pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Mestre e Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia (PPGE) da UFRJ. Filiação: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Departamento de Ecologia, Laboratório de Limnologia.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7895225100465101>.

Contato: [vinicius.farjalla@gmail.com](mailto:vinicius.farjalla@gmail.com)

\* ***Vinnícius Machado Schelk Gomes***

Graduado em Ciências Biológicas pelo Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade da UFRJ. Filiação: Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM/UFRJ.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8696383531845263>.

Contato: [vinniciusmschelk@gmail.com](mailto:vinniciusmschelk@gmail.com)

# DESAFIOS E PERSPECTIVAS NA CONSERVAÇÃO DA *Isoëtes cangae*:

uma macrófita Endêmica da Amazônia

Este livro representa um estudo profundo e fascinante da área da biologia da conservação, campo acadêmico que surgiu em resposta à crescente crise da biodiversidade. Ele combina diversas disciplinas, incluindo ecologia, genética, fisiologia e gestão ambiental, para enfrentar os desafios únicos da conservação de uma espécie aquática endêmica ancestral.

O livro destaca as espécies endêmicas *Isoëtes cangae*, em paralelo com a *Isoëtes serracarajensis*, ambas descobertas nos Campos Rupestres Ferruginosos da Floresta Nacional de Carajás. Os lagos aqui abordados são rasos, mas biodiversos, e apresentam características incomuns, servindo de habitat para *Isoëtes cangae*.

Esse conjunto curioso de especificidades, do ponto de vista ecológico e botânico, motivou a parceria entre o Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade (NUPEM-UFRJ), o Instituto Tecnológico Vale (ITVDS) e a Vale S.A. para conservá-la. O livro discute a abordagem interdisciplinar necessária para conservar essas espécies e seus ecossistemas, incluindo pesquisas que vão desde a identificação e as buscas pelas espécies, o desenvolvimento de técnicas de propagação e cultivo em larga escala, a determinação da estrutura genética de suas populações e testes em campo para verificação de adequabilidade de habitat.

Destinado a estudantes, pesquisadores e entusiastas da ecologia, este livro é um guia indispensável para compreender a importância da conservação da biodiversidade e as estratégias para alcançá-la. Ele oferece uma visão única e valiosa sobre a complexidade e a beleza do mundo natural, bem como a necessidade urgente de protegê-lo. Finalmente, as informações geradas são parte fundamental para auxílio em gestão pública de áreas destinadas ao manejo e ao uso sustentável de recursos naturais.

ISBN: 978-85-7193-455-9



9 788571 934559



**UFRJ**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO

