



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA AMBIENTAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA AMBIENTAL

DIELLE MEIRE DE SANTANA LOPES

**ANÁLISE FISIOLÓGICA E MOLECULAR EM ESPÉCIE DE  
MANGUE: RESPOSTAS AO ESTRESSE SALINO EM  
CONDIÇÕES DE CAMPO**

VITÓRIA

2019

DIELLE MEIRE DE SANTANA LOPES

ANÁLISE FISIOLÓGICA E MOLECULAR EM ESPÉCIE DE  
MANGUE: RESPOSTAS AO ESTRESSE SALINO EM  
CONDIÇÕES DE CAMPO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Doutor em Oceanografia Ambiental.

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Prof<sup>a</sup>. Mônica Maria Pereira Tognella

Coorientador: Dr. Prof. Antelmo Ralph Falquetto

Dr. Prof. Marcelo Rogalski

VITÓRIA

2019

# ANÁLISE FISIOLÓGICA E MOLECULAR EM ESPÉCIE DE MANGUE: RESPOSTAS AO ESTRESSE SALINO EM CONDIÇÕES DE CAMPO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Doutor em Oceanografia Ambiental.

## COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Gilberto Fonseca Barroso – Examinador Interno  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Profa. Dra. Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo – Examinador Externo  
Universidade Federal do Espírito Santo/CEUNES

---

Mário Luís Gomes Soares – Examinador Externo  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Profa. Dra. Viviane Fernandez – Examinador Externo  
Universidade Federal Fluminense

**A um poeta**

Longe do estéril turbilhão da rua,  
Beneditino escreve! No aconchego  
Do claustro, na paciência e no sossego,  
Trabalha e teima, e lima, e sofre, e sua!

Mas que na forma se disfarce o emprego  
Do esforço: e trama viva se construa  
De tal modo, que a imagem fique nua  
Rica mas sóbria, como um templo grego

Não se mostre na fábrica o suplício  
Do mestre. E natural, o efeito agrade  
Sem lembrar os andaimes do edifício:

Porque a Beleza, gêmea da Verdade  
Arte pura, inimiga do artifício,  
É a força e a graça na simplicidade.

Olavo Bilac

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida.

À professora Dra. Mônica Maria Pereira Tognella pela orientação e por acreditar na realização deste trabalho. Por todo seu conhecimento, disponibilidade, estímulo e amizade.

Ao professor Dr. Antelmo Ralph Falqueto pela coorientação e por toda a ajuda ao longo desses anos, sempre disposto a colaborar. Por disponibilizar a utilização do fluorômetro e clorofilog para as análises de fluorescência da clorofila *a* e índice de clorofila.

Ao professor Dr. Marcelo Rogalski, docente da Universidade Federal de Viçosa, pela coorientação e disponibilização do equipamento StepOne Plus Real Time PCR e reagentes, além da assessoria técnica no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas para realização das atividades de análises de expressão gênica.

À Dr. Amanda de Santana Lopes, pós doc do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, pela assessoria técnica e colaboração na discussão das análises de expressão gênica.

Aos meus pais Edilza e Adilson por todo o amor e dedicação que possibilitaram eu ter chegado até aqui. À minha irmã Amanda, companheira na vida e no trabalho, pela ajuda em campo e nas análises de expressão gênicas. Ao meu esposo Thiago, pela compreensão, companheirismo e ajuda nestes anos de estudo. À Nina por toda a alegria.

Aos professores do Programa de Oceanografia Ambiental e ao coordenador Dr. Renato David Ghisolf pela oportunidade de estar desenvolvendo este trabalho, pelas sugestões e críticas durante as apresentações gerais do programa.

Ao professor Dr. Mário Luís Gomes Soares, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pelo empréstimo do equipamento IRGA para o desenvolvimento da rotina de assimilação de carbono e trocas gasosas.

À professora Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo pela contribuição com reagentes necessários e colaboração nas discussões sobre expressão gênica.

Ao Projeto Micropoluentes orgânicos empregados em sistemas anti-incrustantes: comportamento ambiental, toxicidade e biorremediação, submetido ao Edital MCTI/FINEP CT-Hidro 01/2013, sob a coordenação geral do Dr. Gilberto Fillmann (Universidade do Rio Grande (FURG)) cujo recurso contribuiu para a aquisição do Ultrafreezer, possibilitando o manejo adequado das amostras até Viçosa.

Ao setor de transporte da Ufes, técnicos e motoristas, pelo transporte das amostras de São Mateus (Ceunes/UFES até Viçosa (UFV)).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao FUNBIO que por meio do projeto Manutenção do Estoque Natural: Experiências Compartilhadas com a Comunidade Extrativista, submetido ao Edital Acordo TFCA,

chamada 04/2012 e coordenado por Dra. Mônica Maria Pereira Tognella, adquiriu os sensores de pressão e salinidade utilizados para avaliar a frequência de inundação nas áreas de estudo, bem como, disponibilidade de veículo para as coletas de campo e transporte de amostras.

À FAPES que por meio do edital de evento técnico-científico (Edital 003/2012) contribuiu com a vida do Dr. Ernesto Medina (Instituto Venezuelano de Pesquisas Científicas (IVIC)) durante o Workshop Interamericano de Atualizações Ecológicas no Ambiente Manguezal, quando o especialista ministrou o curso de capacitação técnica em ecofisiologia do ecossistema manguezal e contribuiu para a avaliação das áreas de estudo.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Espírito Santo pelo pagamento de diárias ao Prof. Dr. Ernesto Medina durante sua estadia em atividades de campo.

À equipe do Laboratório de Gestão em Manguezal – GEMA pela ajuda seja em campo ou em laboratório – Ully, Louise, Lais, Neilson, Mateus, Saulo, Eduardo, Geovana, Maykol, Karen e Sália.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O ecossistema manguezal é altamente produtivo, contudo, está constantemente sujeito à tensores ambientais, que incluem salinidade e temperaturas elevadas. O presente estudo teve como objetivo investigar as bases fisiológicas e moleculares da tolerância ao sal em *Rhizophora mangle* a partir das técnicas de análise da fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas, índice de clorofila *a* e expressão gênica por qRT-PCR. O estudo foi realizado em duas florestas de manguezal no Estuário do Rio São Mateus, a área HS de maior salinidade e a área LS de menor salinidade. As amostragens foram conduzidas em abril e setembro de 2016 e março e setembro de 2017. A floresta de manguezal na área LS apresenta-se em estágio de recolonização, processo avaliado como natural havendo substituição de plantas maduras por estágios recentes de desenvolvimento. A área HS foi caracterizada como apresentando maior grau de desenvolvimento estrutural e dominada por indivíduos maduros de *R. mangle*. Os valores da salinidade apresentaram diferenças entre as áreas em todas as amostragens sendo sempre maiores em HS. A taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (*A*), condutância estomática (*g<sub>s</sub>*), transpiração foliar (*E*), eficiência intrínseca do uso da água (*A/g<sub>s</sub>*) e clorofila *a*, Banda L, fase IP e índice de desempenho (PI<sub>TOTAL</sub>) foram maiores na área LS. A eficiência instantânea do uso da água (*A/E*), fluorescência inicial (*F<sub>0</sub>*), fluorescência máxima (*F<sub>m</sub>*) e Ponto J foram maiores em HS. A manutenção fotossintética sob condições de alta salinidade foi sustentada por uma atividade melhorada do fotossistema II (FSII), incluindo o aumento dos centros de reação ativa (RCs) e complexos de evolução do oxigênio (CEOs). Os genes *psbA* (proteína D1 do RC) e *PSBO2* (subunidade do OEC) foram positivamente regulados sob alta salinidade, o que pode estar relacionado ao aumento da eficiência no reparo de lesões no RC e COE por meio da síntese de novas subunidades, melhorando a atividade do FSII. Além disso, a expressão de outros cinco genes envolvidos na síntese de ATP, ativação de RubisCO, sequestro de espécies reativas de oxigênio (EROs), síntese de GABA e sequestro de Na<sup>+</sup> vacuolar foram regulados positivamente sob alta salinidade. Plantas de *R. mangle* apresentam mecanismos que toleram o aumento da salinidade, e isto é avaliado pelas respostas das plantas da área HS onde exibiram maior número de RCs ativos, maior atividade fotoquímica, assim como, melhor conectividade energética entre as antenas e os RCs do FSII e melhor eficiência na transferência de elétrons entre o CEO e o lado acceptor do FSII. Contudo, maiores valores de PI<sub>TOTAL</sub> e da fase IP nas plantas de LS indicam melhor eficiência da redução dos aceptores finais do FSI, que sugere maior atividade do FSI. A variação salina ao longo das amostragens em LS tende a influenciar o transporte de elétrons em plantas de *R. mangle* e, conseqüentemente, prejudicar o desenvolvido estrutural da floresta adulta. Assim, nossos dados lançam luz sobre o mecanismo de tolerância ao sal e indicam atividade de genes específicos regulados pelo sal em *R. mangle* sob condições de campo.

**Palavras chaves:** *Rhizophora mangle*, fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas, pigmentos foliares, expressão gênica.

## ABSTRACT

The mangrove ecosystem is highly productive, however, it is constantly subject to environmental stressors, which include salinity and elevated temperatures. The aim of the present study was to investigate the physiological and molecular bases of salt tolerance in *Rhizophora mangle* using the techniques of chlorophyll *a* fluorescence analysis, gas exchange, chlorophyll *a* index and gene expression by qRT-PCR. The study was carried out in two mangrove forests in the São Mateus River Estuary, in the HS area of higher salinity and in the LS area of lower salinity. Mangrove forest in the LS area is in a recolonization stage, a process evaluated as natural, with replacement of mature plants by recent stages of development. The HS area was characterized as having a higher degree of structural development and dominated by mature *R. mangle* individuals. The salinity values showed differences between the areas in all samplings being always higher in HS. The rate of assimilation of CO<sub>2</sub> (*A*), stomatal conductance (*g<sub>s</sub>*), leaf transpiration (*E*), intrinsic efficiency of water use (*A/g<sub>s</sub>*) and chlorophyll *a*, L-band, IP-phase, and performance index (PI<sub>TOTAL</sub>) were in the higher values in LS area. The instantaneous water use efficiency (*A/ E*), initial fluorescence (*F<sub>0</sub>*), maximum fluorescence (*F<sub>m</sub>*), and J-step were higher in HS. Photosynthetic maintenance under conditions of high salinity was supported by improved activity of photosystem II (PSII), including the increase of active reaction centers (RCs) and oxygen evolution complexes (CEOs). The *psbA* (D1 protein of the RC) and *PSBO2* (subunit of the OEC) genes were up-regulated under high salinity, which may be related to an increased efficiency to repair injuries in the RC and OEC through synthesis of new subunits, improving the PSII activity. In addition, the expression of other five genes involved in ATP synthesis, RubisCO activation, ROS scavenging, GABA synthesis and vacuolar Na<sup>+</sup> sequestration were up-regulated under high salinity. Plants of *R. mangle* present mechanisms that tolerate salinity increase, and this is evaluated by the responses of the plants of the HS area where they exhibited a greater number of active RCs, greater photochemical activity, as well as, better energy connectivity between the antennas and the RCs of the PSII and better efficiency in electron transfer between the CEO and the accepting side of PSII. However, higher values of PI<sub>TOTAL</sub> and IP phase in LS plants indicate a better efficiency of the reduction of PSI final acceptors, which suggests higher PSI activity. The saline variation along the samplings in the LS area tends to influence the transport of electrons in plants of *R. mangle* and consequently, to damage the structural development of the adult forest. Thus, our data shed light on the salt tolerance mechanism and provide specific genes regulated by salt in *R. mangle* under field conditions.

**Keys-words:** *Rhizophora mangle*, chlorophyll *a* fluorescence, gas exchange, leaf pigments, gene expression.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1 - CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA VEGETAÇÃO EM DUAS ÁREAS DE MANGUEZAL SOB SALINIDADE DISTINTA

**Figura 1.1.** Localização geográfica do município de Conceição da Barra e do Manguezal situado no estuário do rio São Mateus com as áreas de estudo denominadas HS – Pontal do Sul e LS – Barreiras. Ponto vermelho indica área intermediária para definição da área de estudo.....33

**Figura 1.2.** Temperaturas mensais no município de São Mateus série temporal de nove anos e para os anos de 2015 a 2017. (A) Temperatura mínima (°C) e (B) Temperatura máxima (°C). Fonte: Incaper. (\*) Janeiro e Fevereiro de 2017 dados faltantes.....38

**Figura 1.3.** Dados da precipitação mensal observada no município de São Mateus (mm) para série de nove anos (2006 -2014) e para os anos de 2015 a 2017. Fonte: Incaper. ....39

**Figura 1.4.** Variação do nível da água em metros ao longo de 49 horas para o ano de 2015 (A), primeira amostragem e 25 horas (B) para o ano de 2016 (amostragem 2). Legenda: — PSFd1 — PSFr1 (A1) — BA1 (A2) .....41

**Figura 1.5.** Dados de valores das medianas das salinidades das áreas de estudo (HS e LS) com base nas coletas dos anos 2013 e 2016. Letras diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .....43

**Figura 1.6.** Distribuição de indivíduos por classes de DAP. A) Pontal do Sul (HS). B) Barreiras (LS). Legenda: ■ Av (*Avicennia germinans*) ■ Lg (*Laguncularia racemosa*) ■ Rh (*Rhizophora mangle*) .....45

### Capítulo 2 – FLUXO DE ELÉTRONS NA ESPÉCIE DE MANGUE *Rhizophora mangle* L. SOB CONDIÇÕES DISTINTAS DE SALINIDADE *IN SITU*

**Figura 2.1.** Curvas da fluorescência transiente da clorofila *a* (escala de tempo log) de *Rhizophora mangle* em duas áreas (HS e LS) com diferença de salinidade mostrando o aumento da fluorescência de  $F_0$  (O) até o máximo,  $F_m$  (P), com etapas intermediárias J e I para os anos de 2016 (Rh1 e Rh2) e 2017 (Rh3 e Rh4). As curvas da fluorescência transiente da clorofila *a* exibem intensidade de fluorescência (u.r. - unidade relativa).....57

**Figura 2.2.** Fluorescência transiente da clorofila *a* de O a P entre  $F_0$  e  $F_P$ . Fluorescência variável relativa [ $V_{OP} = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$ ] de *Rhizophora mangle*, referente à primeira (Rh1), segunda (Rh2), terceira (Rh3) e quarta (Rh4) amostragem, na área HS de maior salinidade e área LS de menor salinidade.....57

**Figura 2.3.** Fluorescência variável relativa [ $V_{OP} = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$ ] de *Rhizophora mangle*, referente à primeira (Rh1), segunda (Rh2), terceira (Rh3) e quarta (Rh4)

amostragem, na área HS de maior salinidade e área LS de menor salinidade.....58

**Figura 2.4.** Fluorescência relativa entre os pontos O (0,05 ms) e K (0,3 ms) apresentados como diferença cinética  $\Delta V_{OK} = [V_{OK} (\text{tratamento}) - V_{OK} (\text{controle})]$  descreve os resultados da banda L para as áreas HS e LS em *Rhizophora mangle* referente à primeira (Rh1), segunda (Rh2), terceira (Rh3) e quarta (Rh4) amostragem, na área HS de maior salinidade e área LS de menor salinidade.....59

**Figura 2.5.** Fluorescência relativa entre os pontos O (0,05ms) e J (2 ms) apresentados como diferença cinética  $\Delta V_{OJ} = [V_{OJ} (\text{tratamento}) - V_{OJ} (\text{controle})]$  corresponde aos dados da banda K para as áreas HS de maior e LS de maior salinidade, em *Rhizophora mangle* referente à primeira (Rh1), segunda (Rh2), terceira (Rh3) e quarta (Rh4) amostragem, na área HS de maior salinidade e área LS de menor salinidade.....59

**Figura 2.6.** Diferença cinética da fluorescência transiente da clorofila *a* de O (0,05 ms) a I (30 ms)  $\Delta V_{OI} = V_{OI} (\text{tratamento}) - V_{OI} (\text{controle})$  para as áreas HS de maior e LS de maior salinidade, em *Rhizophora mangle* referente à primeira (Rh1), segunda (Rh2), terceira (Rh3) e quarta (Rh4) amostragem, na área HS de maior salinidade e área LS de menor salinidade .....60

**Figura 2.7.** Diferença cinética da fluorescência transiente da clorofila *a* de I (30 ms) a P (300 ms)  $\Delta V_{IP} = V_{IP} (\text{tratamento}) - V_{IP} (\text{controle})$  para as áreas HS de maior e LS de menor salinidade, em *Rhizophora mangle* referente à primeira (Rh1), segunda (Rh2), terceira (Rh3) e quarta (Rh4) amostragem, na área HS de maior salinidade e área LS de menor salinidade.....61

**Figura 2.8.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) dos parâmetros calculados a partir do teste JIP (N=12) obtidos de plantas de *Rhizophora mangle* (Rh1, Rh2, Rh3 e Rh4) nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade) em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (Rh3) e setembro de 2017 (Rh4). **A)** banda L, **B)** banda K, **C)** ponto J e **D)** fase IP. Médias diferem estatisticamente pelo teste de *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam comparações entre áreas diferentes (HS e LS). Letras maiúsculas reportam comparações entre amostragem em uma mesma área.....62

**Figura 2.9.** Parâmetros médios ( $\pm$  desvio padrão) do teste JIP (N=12) obtidos de plantas de *Rhizophora mangle* (Rh1, Rh2, Rh3 e Rh4) nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade) em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (Rh3) e setembro de 2017 (Rh4). **A)** intensidade de fluorescência inicial ( $F_0$ ), **B)** intensidade máxima de fluorescência ( $F_m$ ), **C)** eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ). Médias diferem estatisticamente pelo teste de *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam comparações entre áreas diferentes (HS e LS). Letras maiúsculas reportam comparações entre amostragem em uma mesma área.....63

**Figura 2.10.** Parâmetros médios ( $\pm$  desvio padrão) do teste JIP descrevendo os fluxos específicos de energia por centro de reação (N=12) obtidos de plantas de *Rhizophora mangle* (Rh1, Rh2, Rh3 e Rh4) nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade) em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (Rh3) e setembro de 2017 (Rh4). **A)**

Absorção (ABS/RC), **B**) Fluxo de energia capturada (TR<sub>0</sub>/RC), **C**) Fluxo de energia transportados (ET<sub>0</sub>/RC) e **D**) Dissipação de calor (DI<sub>0</sub>/RC). Médias diferem estatisticamente pelo teste de *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam comparações entre áreas diferentes (HS e LS). Letras maiúsculas reportam comparações entre amostragem em uma mesma área.....64

**Figura 2.11.** Parâmetros médios ( $\pm$  desvio padrão) do teste JIP descrevendo os fluxos específicos de energia por centro de reação (N=12) obtidos de plantas de *Rhizophora mangle* (Rh1, Rh2, Rh3 e Rh4) nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade) em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (Rh3) e setembro de 2017 (Rh4). **A**) Índice de desempenho para conservação de energia na redução dos aceptores de elétrons do intersistema (PI<sub>ABS</sub>) e, **B**) Índice de desempenho para conservação de energia na redução dos aceptores finais do FSI (PI<sub>TOTAL</sub>). Médias diferem estatisticamente pelo teste de *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam comparações entre áreas diferentes (HS e LS). Letras maiúsculas reportam comparações entre amostragem em uma mesma área.....65

### Capítulo 3 - TROCAS GASOSAS EM PLANTAS DE *Rhizophora mangle* L. SOB DIFERENTES SALINIDADES EM CONDIÇÕES DE CAMPO

**Figura 3.1.** Parâmetros médios ( $\pm$  desvio padrão) das trocas gasosas e uso da água (N = 12) obtidos de plantas de *Rhizophora mangle* (Rh1, Rh2, Rh3 e Rh4) nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade) em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (Rh3) e setembro de 2017 (Rh4). **A**) Assimilação de CO<sub>2</sub> (A) em  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , **B**) condutância estomática (gs) em  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , **C**) Transpiração (E) em  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , **D**) Concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci) em  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Médias diferem estatisticamente pelo teste de *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam comparações entre áreas diferentes (HS e LS). Letras maiúsculas reportam comparações entre amostragem em uma mesma área.....87

**Figura 3.2.** Parâmetros médios ( $\pm$  desvio padrão) das trocas gasosas e uso da água (N = 12) obtidos de plantas de *Rhizophora mangle* (Rh1, Rh2, Rh3 e Rh4) nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade) em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (Rh3) e setembro de 2017 (Rh4). **A**) temperatura foliar (T<sub>folha</sub>), **B**) intensidade luminosa incidente sobre a superfície foliar (Q<sub>leaf</sub>), **C**) Eficiência do uso da água intrínseco (WUE<sub>int</sub>), **D**) Eficiência do uso da água instantâneo (WUE<sub>ins</sub>) (WUE em  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$ ). Médias diferem estatisticamente pelo teste de *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam comparações entre áreas diferentes (LS e HS). Letras maiúsculas reportam comparações entre amostragem em uma mesma área.....88

### Capítulo 4 - ANÁLISES FOTOSSINTÉTICAS E EXPRESSÃO DE GENES EM PLANTAS DE *Rhizophora mangle* L. QUE CRESCEM SOB CONDIÇÕES DE CAMPO PROPORCIONAM COMPREENSÕES SOBRE ADAPTAÇÕES AO SAL

**Figura 4.1.** Resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Para cada metodologia testada, duas repetições foram feitas (R1 e R2) .....110

**Figura 4.2.** Os níveis de salinidade da área de baixa salinidade (LS) e alta salinidade (HS) monitorados mensalmente. A estação chuvosa (de outubro a março) e a estação seca (de abril a setembro) são exibidas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SE (n = 4). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são destacadas por (\*) .....112

**Figura 4.3.** Parâmetros derivados do JIP test de transientes da fluorescência da clorofila *a* em folhas adaptadas ao escuro de plantas jovens de *Rhizophora mangle* crescendo em ambiente com salinidade contrastante. (A) Valores descrevem a intensidade de fluorescência inicial ( $F_0$ ), intensidade máxima de fluorescência ( $F_m$ ) e eficiência fotoquímica máxima do PSII. (B) Valores descrevendo K-L-Band, J-step e IP-phase. (C) Fluxos específicos de energia por centros de reação ativos. (D) Índice de desempenho. Valores são representados como médias  $\pm$  desvio padrão (n = 12). Asterisco acima das barras indicam diferença significativa,  $p < 0,05$ .....113

**Figura 4.4.** Trocas gasosas e uso da água de obtidas de plantas jovens de *Rhizophora mangle* em ambientes de maior de menor salinidade. **A)** Assimilação de  $CO_2$  (*A*); **B)** Condutância estomática (*gs*); **C)** Transpiração (*E*); **D)** Concentração intercelular de  $CO_2$  (*Ci*). Valores são representados como médias  $\pm$  desvio padrão (n = 12). Asterisco acima das barras indicam diferença significativa,  $p < 0,05$ .....114

**Figura 4.5.** Valores do índice de clorofila e razão Chl *a/b* de plantas jovens de *Rhizophora mangle* crescendo em ambiente natural sob maior e menor salinidade. Valores são representados como médias  $\pm$  desvio padrão (n = 12). Asterisco acima das barras indicam diferença significativa,  $p < 0,05$ .....115

**Figura 4.6.** Análise quantitativa em tempo real por PCR de genes relacionados à fotossíntese, defesa antioxidante e sequestro de  $Na^+$  vacuolar em plantas jovens de *Rhizophora mangle* crescendo nas áreas de menor e maior salinidade. A expressão gênica relativa é dada como *fold expression change* usando a equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (EF1 $\alpha$  como gene de referência). Os dados são apresentados como média  $\pm$  SE (n = 4). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são destacadas por (\*) .....116

## LISTA DE TABELA

### Capítulo 1 - CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA VEGETAÇÃO EM DUAS ÁREAS DE MANGUEZAL SOB SALINIDADE DISTINTA

**Tabela 1.1.** Valores mínimo, máximo e médio da variação do nível da água em metros para as áreas: HS: PSFr e PSFBc; LS nos anos de 2015 e 2016.....40

**Tabela 1.2.** Dados mensais de salinidade monitorados entre abril de 2016 a setembro de 2017 nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade). Os dados são apresentados como valores mínimo, máximo e média (n = 4). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre áreas são destacadas por (\*), dados em negrito correspondem aos meses de amostragens da fluorescência e trocas gasosas.....42

**Tabela 1.3.** Valores de salinidade (mínima e máxima) e parâmetros estruturais contendo densidade de troncos (ha), área basal média ( $m^2 \cdot ha^{-1}$ ), DAP médio (cm), altura (m) com desvio padrão para as florestas de Pontal do Sul (HS) e Barreiras (LS).....43

**Tabela 1.4.** Parâmetros estruturais representando a dominância de área basal por espécie (%) para as florestas de Pontal do Sul (HS) e Barreiras (LS).....44

### Capítulo 2 – FLUXO DE ELÉTRONS NA ESPÉCIE DE MANGUE *Rhizophora mangle* L. SOB CONDIÇÕES DISTINTAS DE SALINIDADE *IN SITU*

**Tabela 2.1.** Dados mensais de salinidade monitorados entre abril de 2016 a setembro de 2017 nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade). Os dados são apresentados como valores mínimo, máximo e média (n = 4). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre áreas são destacadas por (\*), dados em negrito correspondem aos meses de amostragens da fluorescência e trocas gasosas.....56

### Capítulo 3 - TROCAS GASOSAS EM PLANTAS DE *Rhizophora mangle* L. SOB DIFERENTES SALINIDADES EM CONDIÇÕES DE CAMPO

**Tabela 3.1.** Dados mensais de salinidade monitorados entre abril de 2016 a setembro de 2017 nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade). Os dados são apresentados como valores mínimo, máximo e média (n = 4). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre áreas são destacadas por (\*), dados em negrito correspondem aos meses de amostragens da fluorescência e trocas gasosas.....86

**Tabela 3.2.** Parâmetros médios ( $\pm$  desvio padrão) dos índices de clorofila *a*, *b* e totais (*a+b*) e da razão clorofila *a/b* (N=12) obtidos de plantas de *Rhizophora mangle* (Rh1, Rh2, Rh3 e Rh4) nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade) em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (Rh3) e setembro de 2017 (Rh4). Médias diferem estatisticamente pelo teste de *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ . Letras

minúsculas indicam comparações entre áreas diferentes (HS e LS). Letras maiúsculas reportam comparações entre amostragem em uma mesma área.....89

#### **Capítulo 4 - ANÁLISES FOTOSSINTÉTICAS E EXPRESSÃO DE GENES EM PLANTAS DE *Rhizophora mangle* L. QUE CRESCEM SOB CONDIÇÕES DE CAMPO PROPORCIONAM COMPREENSÕES SOBRE ADAPTAÇÕES AO SAL**

**Tabela 4.1.** Genes selecionados para avaliação da expressão por PCR em tempo real em plantas de *Rhizophora mangle*.....107

**Tabela 4.2.** Lista de genes selecionados e primers projetados para a análise da expressão gênica. As sequências utilizadas foram extraídas do Mangrove Transcriptome Database (The Illinois Mangrove Project) e o número de identificação (ID) é mostrado na tabela.....108

## LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

$A$  = Taxa de assimilação

$LS$  = Área de menor salinidade

$HS$  = Área de maior salinidade

$ABS/RC$  = Fluxo de absorção de energia por centro de reação ativos

$CEOs$  = Complexos de evolução do oxigênio

$C_i$  = Concentração interna de carbono

$DI_0/RC$  = Dissipação de calor por centro de reação

$E$  = Transpiração foliar

$EROs$  = Espécies reativas de oxigênio

$ET_0/RC$  = Fluxo de energia transportados por centro de reação

$F_m$  = Intensidade máxima de fluorescência

$F_0$  = Fluorescência inicial

$FS\ I$  = Fotossistema I

$FS\ II$  = Fotossistema II

$F_v/F_m$  = Eficiência quântica do fotossistema II

$g_s$  = Condutância estomática

$PI_{ABS}$  = Índice de desempenho para conservação de energia para redução dos aceptores de elétrons do intersistema

$PI_{TOTAL}$  = Índice de desempenho desde a absorção da energia luminosa até a redução do acceptor final do  $FS\ I$

PQ = Plastoquinona

Q<sub>A</sub> = Quinona A

Q<sub>B</sub> = Quinona B

RC = Centro de reação

Rh 1 = *Rhizophora mangle* referente à primeira amostragem

Rh 2 = *Rhizophora mangle* referente à segunda amostragem

Rh3 = *Rhizophora mangle* referente à terceira amostragem

Rh4 = *Rhizophora mangle* referente à quarta amostragem

T<sub>folha</sub> = Temperatura foliar

TR<sub>0</sub>/RC = Fluxo de energia capturada por centro de reação

WUE<sub>int</sub> = A/E = Eficiência do uso da água intrínseco

WUE<sub>ins</sub> = A/g<sub>s</sub> = Eficiência do uso da água instantâneo

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	21
<b>II. OBJETIVO GERAL</b> .....	24
<b>II.1. Objetivos Específicos</b> .....	24
<b>III. REFERÊNCIAS</b> .....	26

### **CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA VEGETAÇÃO EM DUAS ÁREAS DE MANGUEZAL SOB SALINIDADE DISTINTA**

RESUMO .....	31
1.1 INTRODUÇÃO .....	31
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
1.2.1 Área de Estudo .....	32
1.2.1.1 Definição da Área de Estudo .....	33
1.2.2 Caracterização do Clima .....	34
1.2.3 Caracterização do Tempo de Inundação das Áreas de Estudo .....	34
1.2.4 Caracterização das Florestas .....	35
1.2.4.1 Estrutura da Vegetação .....	35
1.2.4.2 Salinidade .....	36
1.2.5 Análise Estatística .....	36
1.3 RESULTADOS.....	37
1.3.1 Caracterização do Clima .....	37
1.3.2 Caracterização do Tempo de Inundação .....	39
1.3.3 Caracterização da Floresta .....	41
1.3.3.1 Estresse Abiótico .....	41
1.3.3.2 Estrutura da Vegetação .....	43
1.4 DISCUSSÃO.....	45
1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	47
1.6 REFERÊNCIAS .....	48

### **CAPÍTULO 2 - FLUXO DE ELÉTRONS NA ESPÉCIE DE MANGUE *RHIZOPHORA MANGLE* L. CRESCENDO EM CONDIÇÕES DE CAMPO SOB DISTINTAS DE SALINIDADE**

RESUMO .....	50
2.1 INTRODUÇÃO .....	50
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	53
2.2.1 Área de Estudo .....	53
2.2.2 Amostragem .....	53
2.2.3 Mensuração da Fluorescência da Clorofila <i>a</i> .....	53
2.2.4 Salinidade.....	54
2.2.5 Análise Estatística .....	55
2.3 RESULTADOS .....	55
2.3.1 Salinidade .....	55
2.3.2 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	56
2.4 DISCUSSÃO .....	65
2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	73
2.6 REFERÊNCIAS .....	73

**CAPÍTULO 3 - TROCAS GASOSAS EM PLANTAS DE *Rhizophora mangle* L.  
SOB DIFERENTES SALINIDADES EM CONDIÇÕES DE CAMPO**

RESUMO .....	81
3.1 INTRODUÇÃO .....	81
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	84
3.2.1 Área de Estudo .....	84
3.2.2 Amostragem .....	84
3.2.3 Trocas Gasosas .....	84
3.2.4 Índice de Clorofila .....	85
3.2.5 Salinidade .....	85
3.2.6 Análise Estatística .....	85
3.3 RESULTADOS .....	85
3.3.1 Salinidade .....	85
3.3.2 Trocas Gasosas .....	86
3.3.3 Índice de Clorofila .....	88
3.4 DISCUSSÃO .....	89
3.4.1 Trocas gasosas e uso da água são influenciados pela salinidade .....	89

3.4.2 Índices de clorofila não foram interferidos pela salinidade .....	93
3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	95
3.6 REFERÊNCIAS .....	95

**CAPÍTULO 4 - ANÁLISES FOTOSSINTÉTICAS E EXPRESSÃO DE GENES  
EM PLANTAS DE *Rhizophora mangle* L. QUE CRESCEM SOB CONDIÇÕES  
DE CAMPO PROPORCIONAM COMPREENSÕES SOBRE ADAPTAÇÕES AO  
SAL**

RESUMO .....	101
4.1 INTRODUÇÃO .....	101
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	104
4.2.1 Área de estudo.....	104
4.2.2 Amostra vegetal.....	105
4.2.3 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	105
4.2.4 Trocas gasosas e Índice de clorofila.....	106
4.2.5 Seleção de genes .....	106
4.2.6 Seleção e desenho dos primers .....	107
4.2.7 Extração de RNA total em <i>Rhizophora mangle</i> .....	109
4.2.8 Análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real.....	110
4.2.9 Salinidade.....	111
4.2.10 Análise Estatística .....	111
4.3 RESULTADOS .....	111
4.3.1 Salinidade .....	111
4.3.2 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	112
4.3.3 Trocas gasosas e Índice de Clorofila.....	113
4.3.4 Expressão de genes relacionados à fotossíntese, defesa oxidante e transporte de sal.....	115
4.4 DISCUSSÃO.....	116
4.4.1 Melhoria do fotossistema II é induzida em plantas de <i>R. mangle</i> como mecanismo de tolerância ao sal.....	116
4.4.2 Melhoria do fornecimento de ATP e ativação eficiente do <i>RubisCO</i> parece ser necessária para a tolerância ao sal em plantas de <i>R. mangle</i> . .....	120

4.4.3 A expressão de genes relacionados ao sequestro de Na <sup>+</sup> vacuolar, dissipação de ROS e síntese de GABA aumentou em plantas de <i>R. mangle</i> crescendo sob alta salinidade.....	121
4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	123
4.6 REFERÊNCIAS .....	124
<b>IV. CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>134</b>

## I. INTRODUÇÃO GERAL

O manguezal é um ecossistema costeiro sujeito ao regime de marés, que se desenvolve em áreas abrigadas como estuários, baías e lagunas (Tomlinson, 1986). O ecossistema manguezal é altamente produtivo e é considerado um dos ecossistemas mais valiosos, pois pode minimizar o efeito das tempestades nas áreas costeiras, entre outros serviços ecológicos essenciais e únicos (Alongi, 2014; Barbier, 2016). Uma característica especial das espécies de mangue é o seu estilo de vida halofítico, uma vez que são necessárias concentrações salinas moderadas para crescimento e desenvolvimento completos (Ball, 1988). As plantas de mangue estão constantemente sujeitas a condições de estresse, que incluem salinidade e temperatura elevadas, excessos de íons e luz, além do alagamento que junto do tipo de sedimento propicia um ambiente anaeróbico. Isto tudo aliado a má gestão dos recursos hídricos e costeiros e outras atividades antrópicas têm amplificado os tensões e os distúrbios sobre os manguezais.

Este ambiente possui vegetação exclusiva e dentre elas se destacam na linha de costa brasileira a espécie *Rhizophora mangle* (L.) família Rhizophoraceae (Schaeffer-Novelli et al., 1990). Esta espécie é distribuída ao longo das costas do Leste do Pacífico e as costas de ambos os lados do Atlântico (Duke, 1992). Nas Américas Tropicais e Subtropicais, em sua costa leste *R. mangle* ocorre do norte da Flórida ao sul do Brasil, na costa leste do Atlântico (Hao et al., 2009; Soares et al., 2012; Lo et al., 2014; Dangremond et al., 2015). Além do estilo de vida halofítico, *R. mangle* também se desenvolve bem sob água doce (Hao et al., 2009). Esta característica é interessante porque favorece sua distribuição austral, já que seu desempenho fotossintético é mais eficiente em áreas com alto suprimento de água doce a baixas temperaturas (Soares et al., 2015).

As espécies de mangue apresentam mecanismos distintos de tolerar o sal e *R. mangle* eliminam o excesso de sal por um mecanismo de ultrafiltração que ocorre nas membranas das células da raiz (Scholander, 1968). Já as espécies consideradas como excretora de sal, regula os níveis internos de sal secretando o excesso através de estruturas das glândulas foliares (Tomlinson, 1986).

O estudo da estrutura da vegetação fornece uma ideia do grau de desenvolvimento da floresta, possibilitando a identificação e a delimitação de florestas com características semelhantes, o que permite realizar comparações entre áreas diferentes (Schaeffer-Novelli and Cintrón, 1986). Como o crescimento da planta

representa a eficiência da fotossíntese, esperar-se que qualquer efeito da salinidade sobre este processo seja refletido no desenvolvimento estrutural da floresta (Takemura et al., 2000).

O ecossistema de manguezal é um ambiente costeiro altamente produtivo, cuja produtividade primária varia com a espécie vegetal, salinidade do solo, grau de inundação das marés, disponibilidade de nutrientes e capacidade fotossintética das plantas (Ball and Farquhar, 1984; Sobrado, 1999). Dentre estes fatores, a salinidade é o principal tensor e regulador do desenvolvimento e da produtividade das florestas de mangue (Medina et al., 1990; Sobrado and Ball, 1999).

A fluorescência da clorofila *a* que mesmo correspondendo a uma pequena fração da energia dissipada do aparelho fotossintético é amplamente aceita como um mecanismo de análise de alterações no aparato fotossintético, principalmente no fotossistema II (FS II) (Strasser et al., 2004). Este parâmetro avalia a capacidade doadora de elétrons do FS II, pois em resposta a alta intensidade luminosa, apresenta-se como uma curva polifásica elevada, a partir da fluorescência inicial  $F_0$ , até a intensidade máxima de fluorescência  $F_m$  (Strasser et al., 1995). A fluorescência inicial representa a emissão de luz pelas moléculas de clorofila *a* excitadas antes da energia ser dissipada para os centros de reação (RCs) do FS II (Krause and Weis, 1991), podendo ser alterada por processos de estresses que causem alterações estruturais nos pigmentos fotossintéticos.

Quando amostras foliares são mantidas no escuro, o lado aceptor de elétrons do fotossistema II encontra-se oxidado (RCs do FS II estão abertos) e a intensidade da fluorescência é mínima  $F_0$ , representado na curva dos transientes da fluorescência como O (origem) (Maxwell and Johnson, 2000; Stirbet and Govindjee, 2011). A elevação de O para J, conhecida como fase fotoquímica é muito rápida (aproximadamente 2 ms) e dependem da intensidade da luz de excitação, enquanto que as fases J-I e I-P são denominadas fases térmicas (sensível à temperatura) são mais lentas (de 2 ms a 1 s). Em aproximadamente 1s (após a iluminação da amostra) a fluorescência da clorofila alcança o pico P ( $F_m$ ) quando a intensidade de luz é elevada e saturante. Nesse momento todas as moléculas de  $Q_A$  estão completamente reduzidas (os RCs ativos do FS II estão fechados) devido a redução do transporte linear de elétrons de toda a cadeia, que é o resultado do congestionamento do tráfego de elétrons no lado aceptor do FSII (Stirbet and Govindjee, 2011). Assim, pode-se avaliar a capacidade de transporte de elétrons

que levará à redução da água e  $\text{NADP}^+$ , além da síntese de APT, produtos serão usados na etapa bioquímica da fotossíntese.

Medições de trocas gasosas: assimilação, transpiração e condutância estomática, são alterados quando plantas de mangue estão sob efeito de elevadas salinidades (Takemura et al., 2000; Sobrado, 2005; Soares et al., 2015). Aumento da salinidade acarreta maior custo na aquisição de água e essa escassez hídrica leva ao fechamento estomático, como uma medida de economia hídrica. Estas medidas fazem com que a eficiência no uso da água, em algumas espécies de mangue, seja elevada, uma vez que apresentam baixas taxas de transpiração foliar e condutância estomática (Sobrado, 2005).

A determinação da concentração dos pigmentos fotossintéticos também representa uma importante ferramenta na validação em estudos ecofisiológicos (Lambers et al., 1998). As clorofilas, pigmentos responsáveis pela conversão da radiação luminosa em energia química, sob a forma de ATP e NADPH, exercem um controle sobre a quantidade de radiação solar absorvida pelas plantas. Por esta razão, estão estreitamente relacionadas às taxas fotossintéticas e à produtividade primária (Blackburn, 2007) que é assim refletido no crescimento e na adaptabilidade do indivíduo aos diferentes ambientes. A exposição prolongada de plantas ou organelas a condições de estresse como excesso de luz, estresse salino e altas temperaturas pode resultar na fotodestruição dos pigmentos fotossintetizantes, fenômeno normalmente denominado de foto-oxidação, cuja consequência é a diminuição dos teores desses pigmentos, podendo levar à morte da célula ou do organismo (Nandy et al., 2007; Araújo and Deminiciis, 2009).

Vários estudos têm abordado mecanismos de tolerância em espécies de mangue em resposta à salinidade por meio de alterações em suas performances fotossintéticas (Ball 1996; Sobrado and Ball, 1999; Lovelock and Feller, 2003; Sobrado, 2005; Li et al., 2008; Naidoo et al., 2011; Dangremond et al., 2015). A maioria dos estudos fisiológicos, principalmente em plântulas sob condições controladas, estão relacionados à diminuição da eficiência fotossintética, definidas a partir das respostas observadas na condutância estomáticas, assimilação de  $\text{CO}_2$  (Werner and Stelzer, 1990; Krauss and Allen, 2003; López-Hoffman et al., 2006; Hao et al., 2009, Dangremond et al., 2015) e elevação da eficiência do uso da água (Lin and Sternberg, 1992; Bompy et al., 2014; Soares et al., 2015; Lovelock et al., 2017). Entretanto, os mecanismos moleculares, incluindo a regulação da expressão gênica, que subjazem tais performances

fotossintéticas são pouco conhecidos, e particularmente em condições de campo tais trabalhos são inexistentes. Avanços na compreensão do mecanismo de tolerância ao sal tem sido realizado a partir da caracterização molecular envolvendo a identificação de genes e análises de transcriptomas (Dassanayake et al., 2009, 2010; Yamanaka et al., 2009; Chen et al., 2011; Fang et al., 2016; Guo et al., 2017) e proteomas (Wang et al., 2014, 2015; Jing et al., 2015) de espécies de mangue submetidas a condições artificiais de estresse salino. Contudo, a maior parte dos estudos moleculares limitam-se a poucas espécies de mangue, tais como *Kandelia candel* (L.) Druce e *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lam., sendo *R. mangle* ainda pouco estudada em nível molecular.

Desta forma, este estudo avaliará o desempenho fotossintético de *R. mangle* em dois bosques com salinidades distintas além de relacionar esse desempenho com a dominância no bosque adulto. Além disso, genes relacionados à fotossíntese serão avaliados com o intuito de obter respostas sobre a influência da salinidade na expressão gênica. A compreensão desta etapa no processo de produção primária está na análise das diferenças observadas para a espécie *R. mangle* em relação ao rendimento fotossintético e transporte de elétrons (Lopes, 2014). Conseqüentemente, o presente estudo visa responder às seguintes questões: Como a salinidade influencia a produção primária nas espécies de mangue? Como a expressão dos genes atua nos mecanismos de tolerância à salinidade? Para avaliar a influência do sal na produção primária destas halófitas, estabelecemos como hipótese de trabalho que aumento nos níveis de expressão de genes relacionados com os processos fotoquímicos e bioquímicos da fotossíntese, defesa antioxidante e transporte de  $\text{Na}^+$  são responsáveis pela estabilidade do rendimento fotossintético de *R. mangle* em condições de maior salinidade.

## **II. OBJETIVO GERAL**

Relacionar a eficiência fotossintética e a expressão gênica de *Rhizophora mangle* L. com a diferença de salinidade entre bosques situados no estuário inferior e superior do Rio São Mateus.

### **II.1. Objetivos Específicos**

Caracterizar a estrutura vegetal das áreas selecionadas e relacioná-la com os resultados de desempenho fotossintético de *R. mangle*.

Estimar a fluorescência da clorofila *a* para *R. mangle* em condições similares de inundação e contrastantes de salinidade.

Determinar a assimilação de carbono para *R. mangle* em condições similares de inundação e contrastante de salinidade.

Analisar a influência da salinidade na expressão gênica de indivíduos de *R. mangle*.

Esta tese foi dividida em quatro capítulos que serão abordados conforme exposto abaixo.

O capítulo 1 - **Caracterização estrutural da vegetação em duas áreas de manguezal sob salinidade distinta**, faz uma síntese da área de estudo, exibindo as características abióticas como temperatura, precipitação e salinidade, além da composição estrutural da vegetação. Servirá como base para as discussões sobre a influência do sal no processo de produção primária.

O capítulo 2 – **Fluxo de elétrons na espécie de mangue *Rhizophora mangle* L. crescendo em condições de campo sob distintas de salinidade**, corresponde a descrição das diferenças estruturais e funcionais do fotossistema II, por meio das análises da fluorescência da clorofila *a* referentes às quatro amostragens (abril e setembro de 2016 e março e setembro de 2017). Contribuirá para análise da influência do sal no comportamento fisiológico em plantas de *R. mangle* observado nas áreas de estudo.

O capítulo 3 - **Trocas gasosas em plantas jovens de *Rhizophora mangle* (L.) sob diferente salinidade em condições de campo** busca identificar as diferenças nas trocas gasosas sob condições de salinidade distintas e correlacionar o índice de clorofilas em *L. racemosa* e *R. mangle* para com a produtividade observada.

O capítulo 4 - **Análises fotossintéticas e expressão de genes em plantas de *Rhizophora mangle* L. que crescem sob condições de campo proporcionam compreensões sobre adaptações ao sal** aborda as primeiras etapas para as análises de expressão gênica em indivíduos de *R. mangle*. Neste capítulo é avaliado a expressão de genes alvos, relacionados com o processo fotossintético, defesa oxidante e transporte de

Na<sup>+</sup>, relacionado o aumento de suas expressões com melhoria na performance fotossintética.

### III. REFERÊNCIAS

Alongi, D.M., 2014. Carbon cycling and storage in mangrove forests. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 6, 195–219. Doi: 10.1146/annurev-marine-010213-135020

Araujo, S.A.C., Deminicis, B.B., 2009. Fotoinibição da Fotossíntese. *Revista Brasileira de Biociências*. 7(4), 463-472.

Ball, M.C., 1988. Ecophysiology of mangroves. *Trees*. 2, 129-142. <https://doi.org/10.1007/BF00196018>

Ball, M.C., 1996. Comparative ecophysiology of mangrove forest and tropical lowland moist rainforest. In: Mulkey SS, Chazdon RL, Smith AP (ed) *Tropical Forest Plant Ecophysiology*. Springer, Boston, pp 461-496. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1163-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1163-8_16)

Ball, M.C., Farquhar, G.F., 1984. Photosynthetic and stomatal responses of the grey mangrove, *Avicennia marina*, to transient salinity conditions. *Plant Physiology*. 74, 7-11.

Barbier, E.B., 2016. The protective service of mangrove ecosystems: A review of valuation methods. *Mar Pollut Bull.* 109, 676–681. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.033>

Blackburn, G.A., 2007. Hyperspectral remote sensing of plant pigments. *Journal of Experimental Botany*. 58 (4), 855-867. doi

Bompy, F., Lequeue, G., Imbert, D., Dulormne, M., 2014. Increasing fluctuations of soil salinity affect seedling growth performances and physiology in three Neotropical mangrove species. *Plant Soil*. 380- 399. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2100-2>

Chen, S., Zhou, R., Huang, Y., Zhang, M., Yang, G., Zhong, C., Shi, S., 2011. Transcriptome sequencing of a highly salt tolerant mangrove species *Sonneratia alba* using Illumina platform. *Marine Genomics*. 4, 129-136. doi: 10.1016/j.margen.2011.03.005

Dangremond, E.M., Feller, I.C., Sousa, W.P., 2015. Environmental tolerances of rare and common mangroves along light and salinity gradients. *Oecologia*. 179, 1187–1198. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3408-1>

Dassanayake, M., Haas, J.S., Bohnert, H.J., Cheeseman, J.M., 2009. Shedding light on an extremophile lifestyle through transcriptomics. *New Phytologist*. 183, 764-775. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02913.x>

Dassanayake, M., Haas, J.S., Bohnert, H.J., Cheeseman, J.M., 2010. Comparative transcriptomics for mangrove species: an expanding resource. *Funct Integr Genomics*. 10, 523–532. <https://doi.org/10.1007/s10142-009-0156-5>

Duke, N.C., 1992. Mangrove Floristics and Biogeography. In: Robertson, A.I., Alongi, D.M. *Tropical Mangrove Ecosystems, Coastal and Estuarine Studies*, 41, 330. DOI: 10.1029/CE04

Fang, L., Yuchen, Yang, Y., Guo, W., Li, J., Zhong, C., Huang, Y., Zhou, R., Shi, S., 2016. De novo assembly of the transcriptome of *Aegiceras corniculatum*, a mangrove species in the Indo-West Pacific region. *Marine Genomics*. 28, 49-52.

Guo, W., Wu, H., Zhang, Z., Yang, C., Hu, L., Shi, X., Jian, S., Shi, S., Huang, Y., 2017. Comparative Analysis of Transcriptomes in Rhizophoraceae Provides Insights into the Origin and Adaptive Evolution of Mangrove Plants in Intertidal Environments. *Front Plant Sci*. 8, 795. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00795>

Hao, G., Jones, T.J., Luton, C., Zhang, Y.J., Manzane, E., Scholz, F.G., Bucci, S.J., Cao, K.F., Goldstein, G., 2009. Hydraulic redistribution in dwarf *Rhizophora mangle* trees driven by interstitial soil water salinity gradients: impacts on hydraulic architecture and gas exchange. *Tree Physiol*. 29, 697–705. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpp005>

Jing, X., Hou, P., Lu, Y., Deng, S., Li, N., Zhao, R., Sun, J., Wang, Y., Han, Y., Lang, T., Ding, M., Shen, X., Chen, S., 2015. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase from mangrove *Kandelia candel* in tobacco enhances salinity tolerance by the reduction of reactive oxygen species in chloroplast. *Front Plant Sci*. 6, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00023>

Krause, G.H., Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42, 313–349.

Krauss, K.W., Allen, J.A., 2003. Influence of salinity and shade on seedling photosynthesis and growth of two mangrove species *Rhizophora mangle* and *Bruguiera sexangula*, introduced to Hawaii. *Aquatic Botany*. 77(4), 311–324.

Lambers, J., Chapin, F.S., Pons, T.L. *Plant Physiological Ecology*. New York: - Verlag, 540p. 1998

Li, N., Chen, S., Zhou, X., Li, C., Shao, J., Wang, R., Fritz, E., Hüttermann, A., Polle, A., 2008. Effect of NaCl on photosynthesis, salt accumulation and ion compartmentation in two mangrove species, *Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*. *Aquatic Botany*. 88, 303–310.

<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.12.003>

Lin, G., Sternberg, L.S.L., 1992. Effect of Growth Form, Salinity, Nutrient and Sulfide on Photosynthesis, Carbon Isotope Discrimination and Growth of Red Mangrove (*Rhizophora mangle* L.). *Australian Journal of Plant Physiology*. 19, 509–517. <http://dx.doi.org/10.1071/PP9920509>

Lo, E.Y., Duke, N.C., Sun, M., 2014. Phylogeographic pattern of *Rhizophora* (Rhizophoraceae) reveals the importance of both vicariance and long-distance oceanic dispersal to modern mangrove distribution. *BMC Evol Biol*. 14, 83. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-83>

Lopes, D.M.S., 2014. Relação da Estrutura e Fotossíntese em Espécies de Mangue no Rio São Mateus. 2014. 73 f. Dissertação (Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2014.

López-Hoffman, L., DeNoyer, J.L., Monroe, I.E., Shaftel, R., Anten, N.P.R., Martínez-Ramos, M., David, D., Ackerly, D.D., 2006. Mangrove Seedling Net Photosynthesis, Growth, and Survivorship are Interactively Affected by Salinity and Light. *Biotropica*. 38(5), 606–616. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2006.00189.x>

Lovelock, C.E., Feller, I.C., 2003. Photosynthetic performance and resource utilization of two mangrove species coexisting in a hypersaline scrub forest. *Oecologia*. 134, 455–466. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-1118-y>

Lovelock, C.E., Reef, R., Ball, M.C., 2017. Isotopic signatures of stem water reveal differences in water sources accessed by mangrove tree species. *Hydrobiologia*. 803, 133–145. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3149-8>

Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51(345), 659 – 668.

Medina E., García, V., Cuevas, E., 1990. Sclerophylly and oligotrophic environments: relationships between leaf structure, mineral nutrient content and drought resistance in tropical rain forests of the upper Rio Negro Region. *Biotropica*. 22, 51–64.

Naidoo, G., Hiralal, O., Naidoo, Y., 2011. Hypersalinity effects on leaf ultrastructure and physiology in the mangrove *Avicennia marina*. *Flora*. 206, 814–820.

Nandy, P., Das, S., Ghose, M., Spooner-Hart, R., 2007. Effects of salinity on photosynthesis, leaf anatomy, ion accumulation and photosynthetic nitrogen use efficiency in five Indian mangroves. *Wetlands Ecology Manage.* 15, 347–357.

Schaeffer-Novelli, Y., Cintron, G. Guia para estudo de áreas de manguezal e estrutura, função e flora. Caribbean Ecological Research, São Paulo, 150 p, 1986.

Schaeffer-Novelli, Y., Cintrón-Molero, G., Adaime, R.R., 1990. Variability of mangrove ecosystems along the brazilian coast. *Estuaries.* 13(2), 204-218.

Scholander, P.F., 1968. How mangrove desalinated water. *Physiol Plant.* 21, 251-261. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1968.tb07248.x>

Soares, M.L.G., Estrada, G.C.D., Fernandez, V., Tognella, M.M.P., 2012. Southern limit of the Western South Atlantic mangroves: Assessment of potentials effects of global warming from a biogeographical perspective. *Estuar Coast Shelf Sci.* 101, 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.02.018>

Soares, M.L.G., Tognella, M.M.P., Cuevas, E., Medina, E., 2015. Photosynthetic capacity and intrinsic water-use efficiency of *Rhizophora mangle* at its Southern most western Atlantic range. *Photosynthetica.* 53(3), 464-470, 2015.

Sobrado, M.A., 1999. Leaf photosynthesis of the mangrove *Avicennia germinans* as affected by NaCl. *Photosynthetica.* 36(4), 547-555.

Sobrado, M.A., 2005. Leaf characteristics and gas exchange of the mangrove *Laguncularia racemosa* as affected by salinity. *Photosynthetica.* 43(2), 217-221.

Sobrado, M.A., Ball, M.C., 1999. Light use in relation to carbon gain in the mangrove, *Avicennia marina*, under hypersaline conditions. *Australian Journal of Plant Physiology.* 26, 245– 251.

Stirbet, A., Govindjee, 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and PhotoBiology.* (in press.)

Strasser, A., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A., 2004. Analysis of the fluorescence transient, in: Papageorgiou, G. C.; Govindjee (eds.), *Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis.* Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Springer, Dordrecht, p. 32-362

Strasser, R.J., Srivasatava, A., Govindjee, 1995. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology.* 61, 32-34.

Takemura, T., Hanagata, N., Sugihara, K., Baba, S., Karube, I., Dubinsky, Z., 2000. Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorhiza*. *Aquatic Botany*. 68, 15–28.

Tomlinson, P.B., 1986. The botany of mangroves. Cambridge: Cambridge Tropical Biology Series. 419p

Wang, L., Liu, X., Liang, M., Tan, F., Liang, W., Chen, Y., Lin, Y., Huang, L., Xing, J., Chen, W., 2014. Proteomic analysis of salt-responsive proteins in the leaves of mangrove *Kandelia candel* during short-term stress. *PLoS One* 9(1):e83141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083141>

Werner, A., Stelzer, R., 1990. Physiological responses of the mangrove *Rhizophora mangle* grown in the absence and presence of NaCl. *Plant Cell Environ.* 13, 243–255. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1990.tb01309.x>

Yamanaka, T., Miyama, M., Tada, Y., 2009. Transcriptome Profiling of the Mangrove Plant *Bruguiera gymnorhiza* and Identification of Salt Tolerance Genes by Agrobacterium Functional Screening. *Biosci Biotechnol Biochem.* 73(2), 304–310. <https://doi.org/10.1271/bbb.80513>

## CAPÍTULO 1

### CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA VEGETAÇÃO EM DUAS ÁREAS DE MANGUEZAL SOB SALINIDADE DISTINTA

#### RESUMO

Este capítulo tem como objetivo determinar a estrutura vegetal de duas florestas de mangue, situados no estuário do Rio São Mateus, sujeitos a salinidades contrastantes. Três possíveis locais de interesse foram selecionados ao longo do estuário do Rio São Mateus, contudo, foram definidos para estudo os dois extremos de distribuição do manguezal no Rio São Mateus. Nestas florestas foram avaliadas as condições de inundação por meio de sensores de nível da água que foram deixados em campo por um período de 49 horas e outro de 25 horas. A salinidade da água do solo foi determinada a partir de três réplicas mensalmente durante os anos de 2016 e 2017 em cada área de estudo. A área LS e HS não diferiram entre si com relação a amplitude do nível médio da água, bem como não ocorre variação com relação ao tempo em que elas permanecem inundadas (aproximadamente cinco e seis horas, respectivamente). Apesar de todas as oscilações observadas nos valores mensais da salinidade, a área HS sempre registrou os maiores valores quando comparada com a área LS no mesmo mês. O local de maior salinidade (HS) apresentou a menor densidade de troncos por hectare e, portanto, maior área basal, assim como os maiores valores médios de DAP e altura. A área LS registrou a maior densidade de indivíduo e menor contribuição de troncos por hectare. *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* estão presentes nas duas áreas de estudo (HS e LS) e *Avicennia germinans*, apenas na área LS. A floresta de mangue da área LS trata-se de uma área onde estão ocorrendo novos estágios de colonização, devido ao processo natural de substituição de indivíduos maduros por indivíduos jovens. O bosque na área mais salina (HS) foi caracterizado como apresentando maior grau de desenvolvimento e dominado por *R. mangle* de grande porte. Apesar de ser uma espécie que coloniza área com menor salinidade, indivíduos de *R. mangle* tiveram pouca representatividade na área LS. Com isso estudos fisiológicos e moleculares podem contribuir para o entendimento desse processo, já que parâmetros ecológicos sozinhos não são suficientes.

**Palavras-chaves:** Estresse abióticos; Tempo de inundação; Precipitação

#### 1.1 INTRODUÇÃO

O ecossistema manguezal ocupa uma ampla faixa latitudinal e ocorre ao longo de toda região tropical e subtropical e nas zonas costeiras temperadas de clima quente e úmido (Soares et al., 2015). Influenciado pela variação das marés, é caracterizado por solos inundados, hipóxicos e salinos (Dangremond et al., 2015). As respostas fisiológicas aos gradientes de salinidade variam entre as espécies de mangue e podem

afetar suas distribuições espaciais e abundâncias de indivíduos (Ball, 1988, 2002; Krauss et al., 2008).

Com o aumento da salinidade as espécies de mangue tendem a maximizar a eficiência do uso da água, considerada uma das mais altas de todas as plantas C<sub>3</sub>. No entanto, menores índices de evaporação limitam o ganho de carbono e isto afeta negativamente o crescimento do indivíduo e, conseqüentemente, de todo o bosque (Ball et al., 1988; Ball and Pidsley, 1995). Desta forma, como o desenvolvimento da planta representa a eficiência fotossintética, espera-se que qualquer alteração da salinidade sobre este processo seja refletida na aquisição de biomassa do indivíduo (Takemura et al., 2000).

Características estruturais e funcionais da floresta, como a altura do dossel, densidade de árvores, acúmulo e exportação de biomassa também podem ser influenciadas por fatores climáticos que provocam mudanças no regime de chuvas e induzem alterações no *input* de nutrientes (Smith, 1992).

De tal modo, a caracterização estrutural dos manguezais constitui uma valiosa ferramenta no que concerne à resposta desse ecossistema às condições ambientais locais, assim como podem ser indicadores dos processos de alterações do meio ambiente, auxiliando nos estudos e nas ações que promovam a conservação (Soares, 1999).

Este capítulo tem como objetivo determinar a estrutura vegetal de duas florestas de mangue, situados no estuário do Rio São Mateus, sujeitos a salinidades contrastantes. A partir dos resultados obtidos da caracterização da vegetação iremos buscar ferramentas fisiológicas e moleculares que poderão explicar como as diferenças nos processos fotossintéticos estão refletidos no domínio em área basal de uma das espécies observadas no bosque adulto.

## **1.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

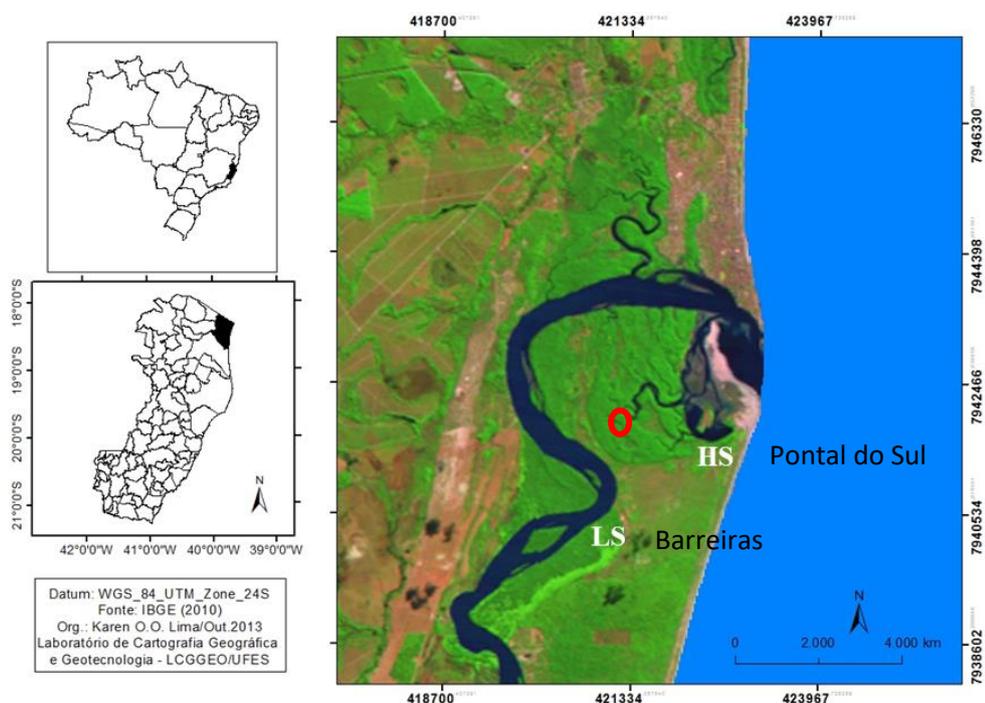
### **1.2.1 Área de Estudo**

O estudo foi realizado em Conceição da Barra (18°35'36'' S; 39°43'56'' W), Norte do Espírito Santo, em duas florestas de franja no manguezal do Rio São Mateus localizados no estuário inferior e superior (Figura 1.1). A área HS localiza-se a 2,8 km da foz do rio, e apresenta maior salinidade (18.8 – 36.5). A área LS, que está situada 7,5 km à montante da foz, possui menor salinidade (9.4 – 25.7). Ambos os pontos de coletas

estão situados em áreas com condição de inundação similar, sendo a salinidade, neste estudo, o parâmetro variável a ser analisado.

### 1.2.1.1 Definição da Área de Estudo

Previamente para a seleção das áreas de estudo, três possíveis locais de interesse foram selecionados ao longo do estuário do Rio São Mateus. Nestas florestas foram avaliadas as condições de inundação por meio de sensores de nível da água Onset HOBO U20 (todo o detalhamento do processo é apresentado em Frequência de Inundação, a seguir). Esta etapa teve como objetivo encontrar áreas que apresentassem as mesmas condições de inundação. Com este objetivo também foi incluído nesta análise uma área intermediária, situada entre Pontal do Sul e Barreiras. Na figura 1.1 esta área está localizada no manguezal situado entre as áreas HS e LS.



**Figura 1.1.** Localização geográfica do município de Conceição da Barra e do Manguezal situado no estuário do rio São Mateus com as áreas de estudo denominadas HS – Pontal do Sul e LS – Barreiras. Ponto vermelho indica área intermediária para definição da área de estudo.

Na avaliação dos resultados de inundação e de salinidade, as três regiões possuem condições similares de duração e frequência de inundação. Entretanto, em relação à salinidade, Pontal do Sul registrou dados similares quando comparado com o local intermediário no estuário e maior intervalo entre os teores mínimos e máximos

quando relacionado com a porção à montante. Desta forma, foram definidos os dois extremos de distribuição do manguezal no Rio São Mateus.

### **1.2.2 Caracterização do Clima**

O norte do Espírito Santo apresenta classificação climática de Köppen Aw, tratando-se de clima tropical úmido com inverno seco, e também corresponde a Planícies Costeiras de até 500 metros de altitude e precipitação anual entre 1.000 a 1.400 mm (Alvares et al., 2014). A região onde estão inseridas as áreas de estudo, região tropical, é caracterizada por um período seco (abril a setembro) e período chuvoso (outubro a março). Assim como é verificada média anual de precipitação de 1311 mm, com déficit hídrico anual de 70 mm, distribuído ao longo do período entre abril a agosto e no mês de fevereiro (Nobrega et al. 2010).

Os dados referentes à caracterização do clima, como temperaturas mínimas e máxima, além da precipitação mensal foram coletadas da estação meteorológica presente no município de São Mateus e cedidos pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER).

### **1.2.3 Caracterização do Tempo de Inundação das Áreas de Estudo**

Para averiguar a condição de inundação, em cada área de estudo foi implantado sensor de nível da água (HOBO® U20 Titanium Water Level Logger) que coleta informações sobre a pressão absoluta local e permite a conversão dos resultados em nível de água (m). Foram realizadas duas amostragens, a primeira em outubro de 2015 (1) e outra em março de 2016 (2).

Na primeira amostragem, os sensores foram deixados por um período de 49 horas em campo, onde foram registradas as variações do nível da água desde o final da maré de quadratura e início da maré de sizígia. Na amostragem de março (2016), os sensores permaneceram 25 horas em campo obtendo-se registros das variações do nível da água apenas no ciclo da maré de sizígia. Os sensores foram programados para obter os dados em intervalos de sessenta minutos, sendo iniciadas e finalizadas às 11:00 horas.

A área de Pontal do Sul apresenta maior variação na declividade ao longo da floresta o que levou a implantação dos sensores na porção frontal do manguezal sendo denominada de frente (PSFr) em contato direto com o rio e de fundo (PSFd), próximo ao cordão arenoso da restinga.

Para esta avaliação preliminar da amplitude e tempo de inundação selecionou-se a maré de sizígia de maior amplitude prevista naquele registro mensal com base nos dados divulgados pela DHN tendo como base o marégrafo instalado na Barra do Riacho no Município de Aracruz ([www.marmil.br](http://www.marmil.br)). Posteriormente, será definida a amplitude e frequência de inundação nas áreas apenas em situações de maré de quadratura.

Para processamento dos dados registrados pelo sensor de inundação foi considerada densidade do fluido para água salobra ( $1.010,000 \text{ kg/m}^3$ ) e como parâmetro para compensação barométrica o nível do mar. Após o registro de dados de pressão pelo sensor, o equipamento permite a conversão dos dados de pressão em nível da água, mecanismo executado pelo programa Hoboware®.

## **1.2.4 Caracterização das Florestas**

### **1.2.4.1 Estrutura da Vegetação**

O método empregado para descrever as florestas denominadas de área HS (maior salinidade) e LS (menor salinidade) baseou-se em Schaeffer-Novelli and Cintron (1986). O tamanho de cada parcela foi definido de modo a garantir a representatividade dos pontos amostrais, isto é, acima de 30 indivíduos adultos (maior que 100 cm de altura). Nas áreas HS e LS, o tamanho das parcelas foi distintos sendo de  $400 \text{ m}^2$  e  $100 \text{ m}^2$ , respectivamente. A caracterização estrutural foi realizada no ano de 2013. Os dados de diâmetro e altura são utilizados para determinar o desenvolvimento da estrutura da floresta, além de permitir comparações entre diferentes florestas.

A construção da tabela de distribuição dos indivíduos por classes de DAP foi feita a partir da seleção do número de grupos de classes e da obtenção de um intervalo de classes entre cada grupo.

A seleção do número de classes foi obtida a partir da regra prática de Sturges:

$$K = 1 + 3,3 \times \log n$$

Onde,

K = número de classes; e

n= número total de trocos observados.

No entanto, o número de classes obtidas é apenas uma ideia. Esse número pode variar, de acordo com o intervalo de classe a ser estabelecido, assim, usa-se número de classes abaixo de 5 e acima de 15.

A Seleção do intervalo de classes foi feita por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Intervalo de classes} = \frac{AT}{\text{números de classes}}$$

Onde,

AT = amplitude total, que é o maior valor de DAP subtraído do seu menor valor.

#### **1.2.4.2 Salinidade**

A salinidade da água do solo foi determinada a partir de três réplicas mensalmente durante os anos de 2016 e 2017 em cada área de estudo. As coletas da salinidade foram sempre no mesmo dia para ambas as áreas, em cada mês.

Para amostragem da água intersticial foram feitos três orifícios no sedimento com aproximadamente 30 cm de profundidade e neles foram inseridos canos de cloreto de polivinila (PVC) para determinar a amostragem sempre no mesmo ponto e sem provocar tantas alterações no sedimento que possam comprometer os dados. Os canos contem 50 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro e tiveram 20 cm de sua base perfurados em toda sua volta sendo o fundo, em contato com o sedimento, vedado com tampa de PVC. A porção superior, aflora no sedimento, sendo fechada com tampa de PVC para evitar a entrada de água da chuva. Esses locais de amostragem permitem o registro da salinidade com maior periodicidade e menor custo.

O registro da salinidade é realizado com a abertura da tampa superior e coleta da água armazenada no interior do cano de PVC, sempre que houver líquido. Após a coleta da água, a leitura da condutividade foi feita com um medidor portátil modelo HQ40D (HACH Company). Desta forma, obteve-se os valores médios mensal, além dos valores mínimos e máximos de salinidade para cada área de estudo.

Valores de salinidade obtidos no ano de 2013 (Lopes, 2014) foram utilizados para comparações com os valores de sal obtidos no presente.

#### **1.2.5 Análise Estatística**

Para avaliar se houve diferença entre médias do nível da água, parâmetros estruturais e salinidade entre áreas, foi realizado a análise de variância ANOVA (One Way), seguida pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Diferenças entre salinidade nos anos

2013 e 2016 foi obtido a partir do teste de medianas *Kruskal-Wallis*. O programa estatístico utilizado foi o *Past*.

## 1.3 RESULTADOS

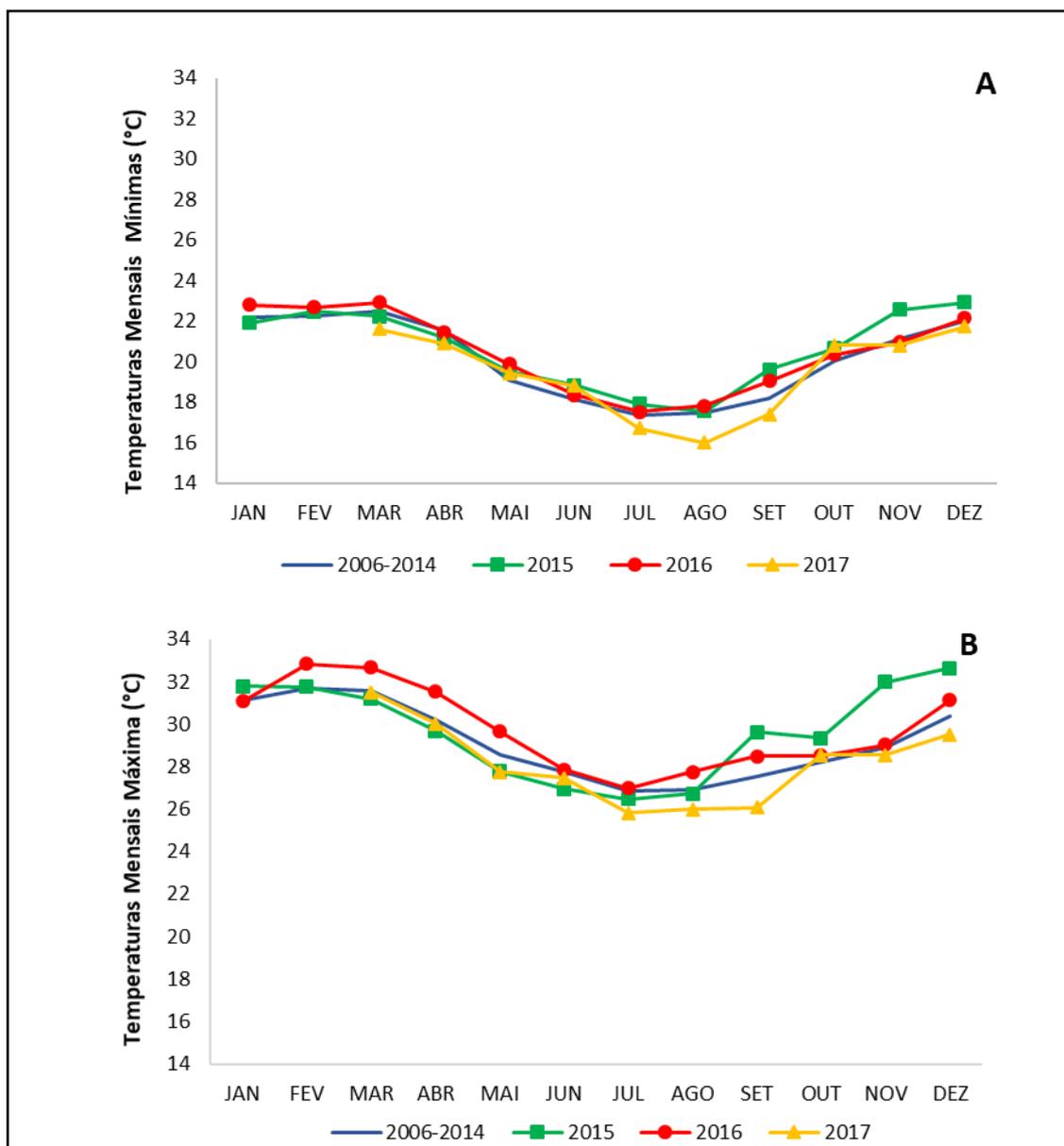
### 1.3.1 Caracterização do Clima

Os valores das temperaturas mínimas e máxima são apresentas na figura 1.2. As temperaturas mínimas se elevaram entre 2015 e 2016, contudo em 2017 houve redução das temperaturas mínimas entre os meses de julho a setembro, chegando a 16 °C em agosto (Figura 1.2A). As temperaturas máximas foram bastante elevadas em 2016, exceto setembro a dezembro de 2015, até mesmo quando comparado com a média acumulada entre os anos de 2006-2014 (Figura 1.2B). O ano de 2017 manteve-se muito próxima a média 2006-2017, exceto os meses entre julho e setembro que registraram valores máximos de temperatura entre 25 e 26 °C.

Os dados mais recentes, mostrando a precipitação mensal observada nos anos de 2015, 2016 e 2017 e entre as médias de nove anos (2006-2014), são exibidas na figura 1.3.

No intervalo de nove anos a precipitação média entre os meses mais secos, maio a setembro, foi de 47,47 mm. Os meses de maior precipitação corresponderam de outubro a abril, sendo a média de precipitação dentro deste intervalo de 138,78 mm, destacando o mês de novembro.

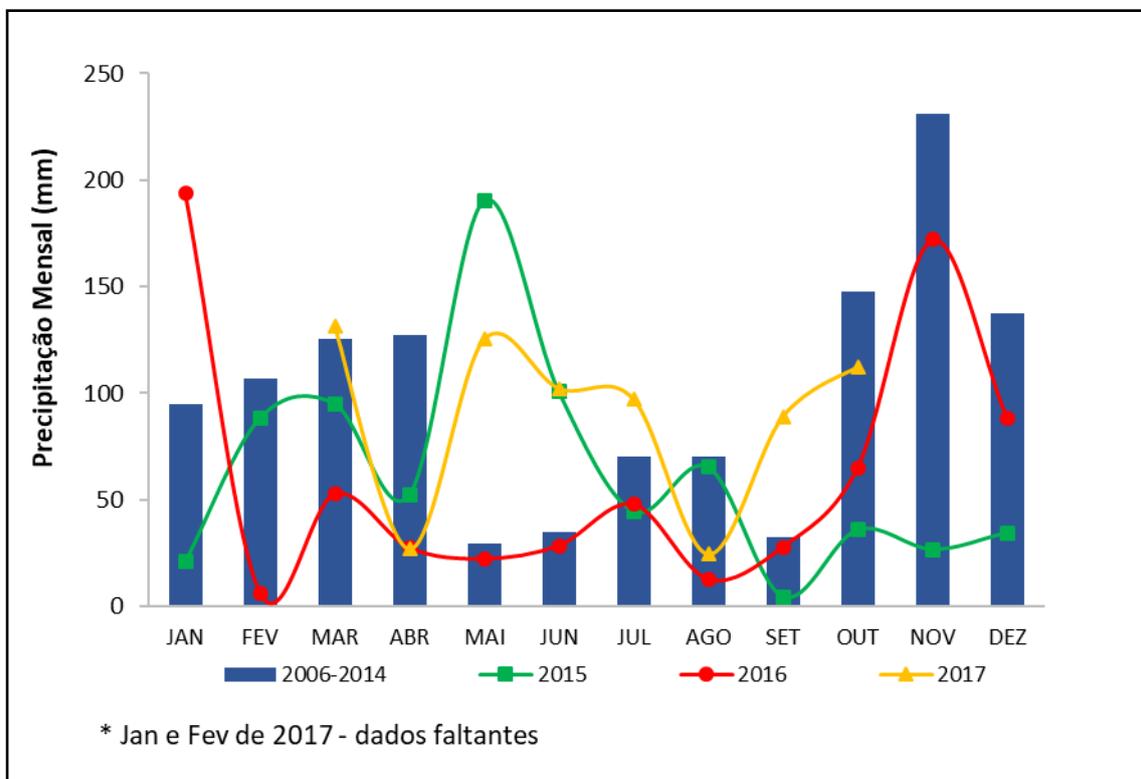
O ano de 2015 comparado aos nove anos anteriores, se caracterizou por apresentar maior precipitação exatamente no período considerada para a região como sendo a ocasião de déficit hídrico e as baixas precipitações neste ano ocorreram nos meses mais chuvoso. Neste ano, no final do verão e início do outono (janeiro a abril) e, posteriormente, entre outubro a dezembro, a média da precipitação mensal nestes intervalos foi de 50,4 mm, com redução em 63,6% quando comparada com os valores médio registrados para os mesmos meses na série de 2006 a 2014. Entre os meses de maio a setembro ocorreu aumento de 41,36% da precipitação, comparada aos nove anos anteriores. No entanto, setembro registrou a menor precipitação do ano, que seguiu muito baixa até o final do ano de 2015.



**Figura 1.2.** Temperaturas mensais no município de São Mateus série temporal de nove anos e para os anos de 2015 a 2017. (A) Temperatura mínima (°C) e (B) Temperatura máxima (°C). Fonte: Incaper. \* Janeiro e Fevereiro de 2017 dados faltantes.

O ano de 2016 iniciou com precipitação acima daquela registrada para o intervalo de 2006 a 2014 e também para o ano anterior no mês de janeiro. Contudo devido a baixa precipitação dos meses subsequentes, em especial o de fevereiro, a média de chuva para o período de janeiro a abril foi de 70 mm, tornando-se similar ao mesmo período de 2015 e abaixo da registrada para a série temporal de nove anos. Em 2016, meses de maio a setembro apresentaram baixa precipitação (média de 27,76 mm) sendo 65,71% menor que os mesmos meses do ano anterior. O último trimestre de 2016 registrou as maiores precipitações com média de 108 mm, sendo novembro o mês mais chuvoso, estas precipitações foram 70,12% mais elevadas que em 2015, porém mesmo

assim com valores inferiores aqueles registrados como a precipitação média para o mesmo período na série de nove anos anteriores (média de 172 mm).



**Figura 1.3.** Dados da precipitação mensal observada no município de São Mateus (mm) para série de nove anos (2006 -2014) e para os anos de 2015 a 2017. Fonte: Incaper.

Nos dados disponibilizados pelo INCAPER para esta análise não foi reportado os dados para janeiro e fevereiro de 2017, contudo, neste ano, somente os meses de março e abril registraram maior média de precipitação (79 mm) quando o período é comparado com os registros para os dois anos anteriores. Similar ao ocorrido em 2015, os meses entre maio a setembro foram bastante chuvosos (média de 87,5 mm) destacando-se os meses de maio e setembro. A precipitação observada no mês de setembro em 2017 foi acima daquelas registradas nos anos anteriores, sendo 95,05 % a mais de chuva neste mês do que a registrada no ano de 2015.

### 1.3.2 Caracterização do Tempo de Inundação

A partir da tabela 1.1 é possível observar que existem diferenças entre a margem da floresta na área (PSFr) em relação às outras estações averiguadas no que diz respeito a amplitude da inundação.

Em PSFr, tanto na primeira quanto na segunda amostragem, houve registro dos maiores valores em nível da água, mínimo e máximo, sendo que os valores máximos chegaram a ultrapassar 1,3 m. A área de fundo de Pontal do Sul (PSFd, área HS) e a área da Barreiras (área LS) não diferiram entre si com relação a amplitude do nível médio da água, em ambas amostragens. Considerando as áreas selecionadas para as coletas, a área LS (Barreiras) registrou o menor valor do nível da água, isto é -0,036 m, e o maior valor, 0,827 m foi registrado na área HS para o ponto PSFd. Os dados médios foram obtidos com base em todas observações realizadas pelos sensores.

A primeira amostragem foi iniciada no final da maré de quadratura, com amplitude de maré um pouco menor que da maré de sizígia. Já a segunda amostragem os registros foram feitos apenas em maré de sizígia, registrando os maiores valores de nível da água em todas as áreas. Apesar disso, não houve diferenças entre essas áreas conforme os resultados de comparação do teste de Tukey (Tabela 1.1).

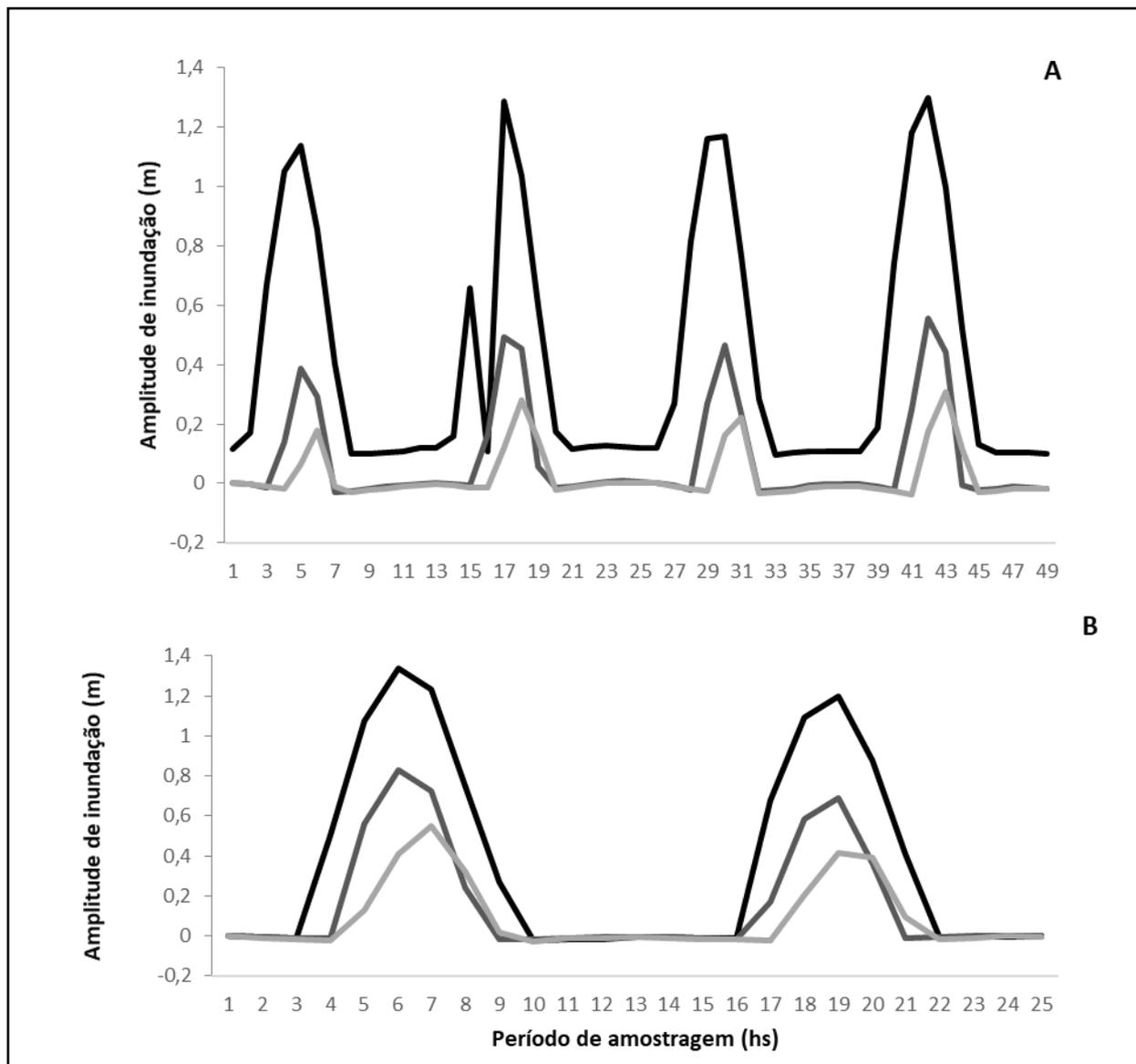
**Tabela 1.1.** Valores mínimo, máximo e médio da variação do nível da água em metros para as áreas: HS: PSFr e PSFBc; LS nos anos de 2015 e 2016.

	Áreas	Ano	Nível da Água (m)		
			Mínimo	Máximo	Média
HS	PSFr	2015	0,098	1,3	0,415 <sup>a</sup> (± 0,05)
	PSFd	2015	-0,031	0,557	0,078 <sup>b</sup> (± 0,02)
LS		2015	-0,036	0,307	0,024 <sup>b</sup> (±0,01)
HS	PSFr2	2016	-0,02	1,337	0,371 <sup>a</sup> (±0,09)
	PSFd2	2016	-0,019	0,827	0,161 <sup>b</sup> (±0,05)
LS		2016	-0,028	0,551	0,093 <sup>b</sup> (±0,03)

Valores na coluna, acompanhados de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A figura 1.4 descreve a variação do nível da água ao longo de 49 horas, amostragem 1 (2015), e de 25 horas, amostragem 2 (2016). Na figura é possível observar que entre as áreas PSFBc (área HS) e LS não ocorre variação com relação ao

tempo em que elas permanecem inundadas (aproximadamente 6 e 5 horas, respectivamente).



**Figura 1.4.** Variação do nível da água em metros ao longo de 49 horas para o ano de 2015 (A), primeira amostragem e 25 horas (B) para o ano de 2016 (amostragem 2). Legenda: — BA1 (LS) — PSFd1 — PSFr1 (HS)

### 1.3.3 Caracterização da Floresta

#### 1.3.3.1 Estresse Abiótico

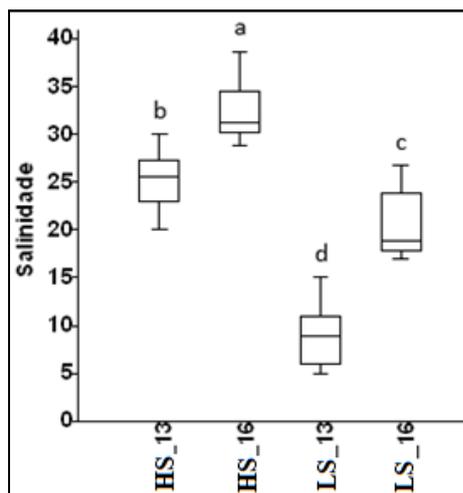
A salinidade registrada entre os meses de amostragens nos anos de 2016 e 2017, nas áreas HS e LS, está exposta na Tabela 1.2. Houve aumento nos dados de salinidade para as duas áreas nos meses de agosto e setembro.

**Tabela 1.2.** Dados mensais de salinidade monitorados entre abril de 2016 a setembro de 2017 nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade). Os dados são apresentados como valores mínimo, máximo e média (n = 4). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre áreas são destacadas por (\*), dados em negrito correspondem aos meses de amostragens da fluorescência e trocas gasosas.

Áreas/Amostragem	LS/2016			HS/2016			LS/2017			HS/2017		
	Min.	Máx.	Média	Min.	Máx.	Média	Min.	Máx.	Média	Min.	Máx.	Média
JAN	-	-	-	-	-	-	5,4	15,2	10,6	8,2	27	14,6
FEV	-	-	-	-	-	-	7,7	15,6	12,2	18,4	23,6	21,9*
MAR (Rh4)	-	-	-	-	-	-	<b>7,3</b>	<b>11,3</b>	<b>9,4</b>	<b>17,7</b>	<b>20</b>	<b>18,8*</b>
ABR (Rh1)	17,2	18,2	17,8	<b>30,3</b>	<b>31,3</b>	<b>30,8</b>	10,1	16,2	13,2	21,2	24,6	23*
MAI	18,4	18,9	18,6	30,1	31,2	30,7	8	9,2	8,5	17,8	19,8	18,5*
JUN	17,8	18,5	18,1	28,6	28,9	28,8*	9,9	11,5	10,8	17,3	23,6	19,4*
JUL	12,5	17,8	15,3	23,3	28,2	26,8*	15,1	22,1	20	25,7	33,5	30*
AGO	24,4	24,9	24,6	27,4	32,4	29,7*	21,3	26,4	24,9	26,7	32,8	29,8
SET (Rh2 e Rh3)	<b>23,9</b>	<b>27</b>	<b>25,5</b>	<b>34,5</b>	<b>38,6</b>	<b>36,5*</b>	<b>24,6</b>	<b>26,6</b>	<b>25,7</b>	<b>29</b>	<b>37</b>	<b>31,7*</b>
OUT	22,8	28,5	25,3	32,3	36,4	34,2*	-	-	-	-	-	-
NOV	3,2	6,8	5,1	9,5	13,7	12*	-	-	-	-	-	-
DEZ	1,6	5,9	3,8	11,6	15,7	13,3*	-	-	-	-	-	-

No ano de 2016, a salinidade manteve-se elevada em praticamente todos os meses de amostragem (Tabela 1.2). O mês de setembro registrou o maior valor médio de salinidade, para a área LS (25,5) e em HS (36,5). Dos meses amostrados neste ano, a salinidade só diminuiu nos dois meses finais, destacando-se o mês de novembro que registrou a menor salinidade média em ambas as áreas (12,0 e 5,1 de salinidade, respectivamente, HS e LS). Em 2017 a salinidade média foi mais variável entre os meses de janeiro a junho, mas se mantendo inferiores que aquelas registradas no ano anterior para o mesmo período. No entanto, em julho deste ano, a salinidade aumentou em ambas as áreas e se conservou elevada até o final da amostragem, em setembro. A menor salinidade média, em 2017, na área HS foi registrada no mês de janeiro (14,6) e na área LS em maio (8,5 psu), a maior salinidade foi observada em setembro, isto é, 31,7 psu (HS) e 25,7 psu (LS). Apesar de todas as oscilações observadas nos valores mensais da salinidade, a área HS sempre registrou os maiores valores quando comparada com a LS no mesmo mês, independente do ano.

Utilizando dados pretéritos de 2013 com aqueles coletados em 2016 (presente estudo), as salinidades entre as áreas HS e LS quando comparadas ano a ano apresentaram diferenças significativas (Figura 1.5). Na figura 5 também é possível observar que, comparado ao ano de 2013, a área LS mesmo exibindo aumento nos registros de salinidade, estes ainda não são comparáveis com aqueles que foram observados durante o ano de 2013 na área HS.



**Figura 1.5.** Dados de valores das medianas das salinidades das áreas de estudo (HS e LS) com base nas coletas dos anos 2013 e 2016. Letras diferem entre si pelo teste de *Kruskal-Wallis* ( $p < 0,05$ ).

### 1.3.3.2 Estrutura da Vegetação

As características estruturais da floresta (densidade, área basal e altura), a composição de espécies da vegetação, bem como, abundância relativa entre elas são distintas para as duas áreas de estudo (Tabelas 1.3 e 1.4).

**Tabela 1.3.** Valores de salinidade (mínima e máxima) e parâmetros estruturais contendo densidade de troncos (ha), área basal média ( $m^2 \cdot ha^{-1}$ ), DAP médio (cm), altura (m) com desvio padrão para as florestas de Pontal do Sul (HS) e Barreiras (LS).

Área	Salinidade		Densidade (tr.ha <sup>-1</sup> )	Área Basal (m <sup>2</sup> .ha <sup>-1</sup> )	DAP (cm)	Altura (m)
	Mínima	Máxima				
HS	20	30	1075 <sup>b</sup>	25,03 <sup>a</sup>	17,22 <sup>a</sup>	11,5 <sup>a</sup> ±5,58
LS	5	15	4700 <sup>a</sup>	18,96 <sup>b</sup>	7,16 <sup>b</sup>	4,11 <sup>b</sup> ±1,86

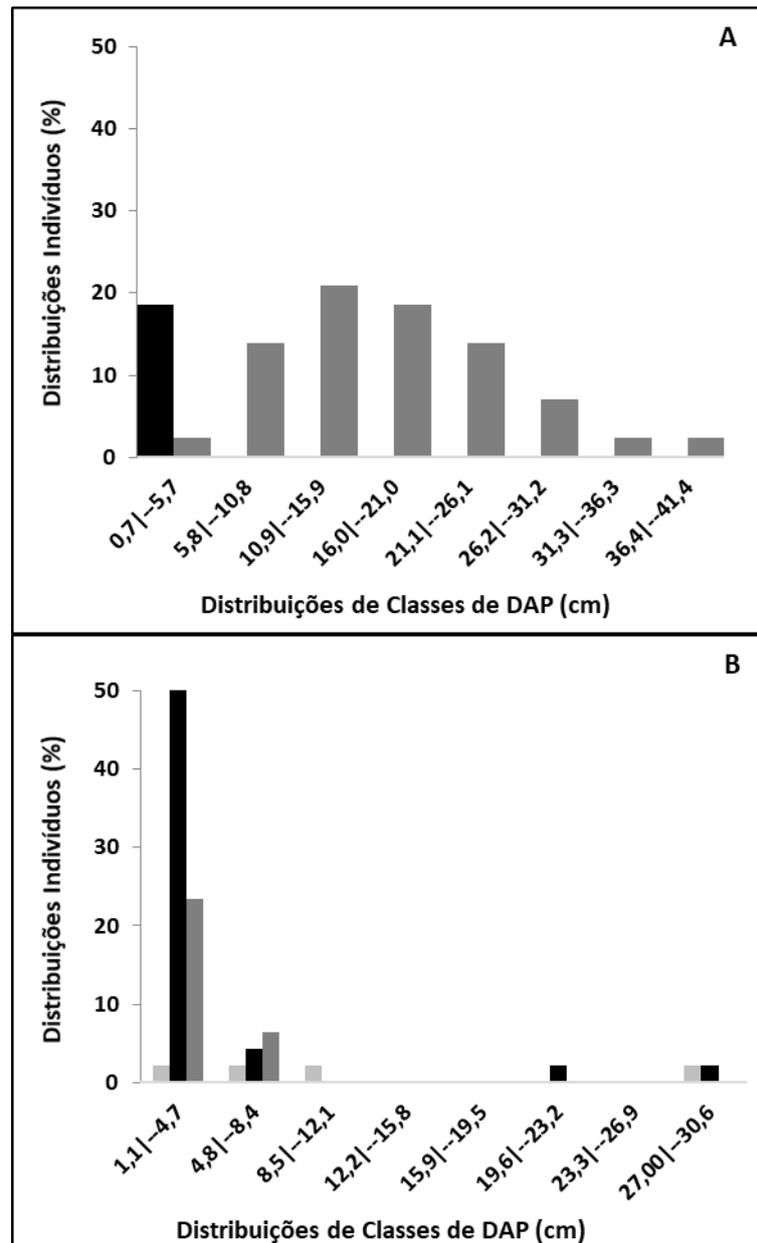
O local de maior salinidade (HS) apresentou a menor densidade de troncos por hectare e, portanto, maior área basal, assim como os maiores valores médios de DAP e altura (Tabela 1.3). A área de menor salinidade (LS) registrou a maior densidade de indivíduo e menor contribuição de troncos por hectare.

*R. mangle*, *L. racemosa* estão presentes nas duas áreas de estudo (HS e LS) e *Avicennia germinans*, apenas na área LS. Na área HS, *R. mangle* foi a espécie dominante, contribuindo com 99,84% da área basal total do bosque. Já na área LS, a contribuição em área basal foi mais diversificada, sendo a dominância distribuída entre *A. germinans* e *L. racemosa* (Tabela 1.4). Nas duas áreas, HS e LS, a contribuição de área basal morta foi nula.

**Tabela 1.4.** Parâmetros estruturais representando a dominância de área basal por espécie (%) para as florestas de Pontal do Sul (HS) e Barreiras (LS).

Área	Dominância em área basal (%)		
	<i>R. mangle</i>	<i>L. racemosa</i>	<i>A. germinans</i>
HS	99,84	0,15	0
LS	6,62	58,61	34,76

A figura 1.6 apresenta a relação da distribuição em percentagem de indivíduos por intervalo de classe de DAP, nas duas áreas de estudo. Na figura 1.7A é possível observar a maior distribuição de indivíduos nas classes de DAP acima de 10 cm, isto é, registrando 65% dos indivíduos adultos na floresta, todos representados por *R. mangle*. A contribuição em torno de 21% ocorreu para o intervalo de 0,7 cm até 5,7 cm, sendo os indivíduos de *L. racemosa* aqueles mais representativos. Destaca-se que a espécie só apresentou indivíduos neste intervalo de diâmetro no bosque. Na figura 1.7B, observa-se a maior ocorrência de indivíduos nos primeiros intervalos de DAP, com domínio em 78,2% das observações para o bosque. Destes, 53% indivíduos são da espécie *L. racemosa*, 23% de *R. mangle* e apenas 2% dos indivíduos neste intervalo correspondem a *A. germinans*. Esta distribuição de frequência de diâmetros por classe de intervalos possibilitou a observação de lacunas no ingresso de indivíduos com ausência de árvores no porte de 12,1 até 19,5 cm. Acima deste intervalo registra-se a ocorrência de um único indivíduo de *L. racemosa* na faixa de diâmetro entre 19,6 a 23,2 cm e dois indivíduos mais maduros acima de 27,0 cm de diâmetro de *A. germinans* e de *L. racemosa*.



**Figura 1.6.** Distribuição de indivíduos por classes de DAP. A) Pontal do Sul (HS). B) Barreiras (LS). Legenda: ■ Av (*A. germinans*) ■ Lg (*L. racemosa*) ■ Rh (*R. mangle*).

## 1.4 DISCUSSÃO

Estudos com plântulas de mangue da família Rhizophoraceae (*Rhizophora mucronata* Lam), mostraram que estas tiveram o melhor desempenho em inundação moderada (isto é, entre 3 a 9 h), onde foi observado o máximo desempenho fotossintético, além do maior acúmulo de biomassa e produção foliar (Hoppe-Speer et al., 2011). Em outro trabalho, Krauss et al. (2006) identificaram que duração da inundação de até 4622 hora/ano, aproximadamente 6 h por dia, não alterou a produção

de biomassa total em indivíduos de *L. racemosa* e *R. mangle*. Assim, o intervalo de tempo de inundação observado nas áreas de estudo se enquadra dentro daquele definido em outros trabalhos e que corresponde às melhores condições de inundação, permitindo melhor desempenho fotossintético para as espécies. Assim, podemos definir que as áreas escolhidas para estudo, especificamente fundo de HS (PSFBc) e LS, são apropriadas para a condução dos experimentos *in situ* que tem como objetivo avaliar a influência do sal na expressão gênica e na eficiência fotossintética. Desta forma, partimos do pressuposto de que está ocorrendo homogeneidade na variável inundação e consideramos a salinidade como a variável de interesse para às áreas de estudo.

Os resultados de estrutura observados caracterizam a área HS como aquela que possui o maior desenvolvimento estrutural. Silva et al. (2005) identificaram, que no estuário inferior do Rio São Mateus, o desenvolvimento estrutural da vegetação das florestas de mangue era menor que daqueles localizados no estuário médio.

As espécies *R. mangle* e *L. racemosa* foram encontradas nas duas áreas, no entanto *A. germinans* só foi observada na área mais a montante do rio. Esta última espécie, no Brasil, tende a ser menos tolerante a valores mais elevados de cloro e sódio, e é normalmente encontrada em ambientes com menor salinidade nas florestas de manguezal na linha de costa brasileira (Tognella, comunicação pessoal). Resultados similares de distribuição e de contribuição em área basal foram observados por Silva et al. (2005) para os manguezais localizados no estuário inferior e superior do rio São Mateus, respectivamente. Sendo registrado dominância de *R. mangle* na área HS e codominância de *L. racemosa* e *A. germinans* na área LS. Nas duas áreas, HS e LS, a contribuição de área basal morta foi nula, sendo um indicativo de que não há maiores tensores sobre as florestas.

Os resultados da estrutura e sua análise por classes de diâmetro permitem avaliar os processos ecológicos que estão envolvidos na colonização da floresta (Tognella De Rosa et al., 2008). O objetivo desta análise é reconhecer a distribuição das espécies por diâmetros e interpretar como se deu o processo de colonização de cada floresta. Este diagnóstico é importante para a interpretação dos resultados de assimilação de carbono e de emissões de fluorescência por espécie. Em relação a floresta de mangue da área LS, as análises da estrutura deixam claro que se trata de uma área onde estão ocorrendo novos estágios de colonização, devido ao processo natural de substituição de indivíduos maduros por indivíduos jovens. Uma vez que ocorre a senescência da população há o

surgimento de clareiras que vão permitir o ingresso de novos indivíduos, processo também observado por Soares (1999) em bosques de mangue na Lagoa da Tijuca.

O bosque na área mais salina (HS) foi caracterizado como apresentando maior grau de desenvolvimento e, praticamente, dominado por *R. mangle* com árvores de grande porte, com boa representatividade ao longo dos diferentes diâmetros observados. *L. racemosa* foi uma espécie pouco representativa na composição da estrutura da floresta. O bosque na área de menor salinidade (LS) foi caracterizado como mais jovem apesar de ter indivíduos mais desenvolvidos. Esta estrutura da comunidade se destaca pela presença de poucas árvores de grande porte e presença marcante de indivíduos de médio porte de *L. racemosa*. A presença de indivíduos de *A. germinans* nessa área corrobora a distinção de salinidade existente entre as áreas HS e LS, uma vez que, mesmo o gênero sendo considerado um dos mais tolerantes a salinidade (Jimenez et al., 1985), a espécie apresenta melhor desenvolvimento e, normalmente, só é encontrada em ambientes com salinidades mais baixas (Cintron and Schaffer-Novelli, 1992). Em ambas áreas, ocorre a presença de indivíduos de *R. mangle* e *L. racemosa* menores que um metro de altura, que não foram contabilizados devido a metodologia clássica de avaliação da estrutura da floresta de manguezal (Schaeffer-Novelli and Cintron, 1986). Por outro lado, nas observações em campo, registra-se a ocorrência de um número alto de indivíduos que estão sendo estudados nas análises fisiológicas (fotoquímica e bioquímica) e, posteriormente, nas análises de expressão gênica nos indivíduos de *R. mangle*.

A região onde se encontra a área de estudo, assim como outras adjacentes, enfrentou um período de estiagem prolongado que tem diminuído a vazão do rio São Mateus possibilitando a maior influência da maré no seu estuário e, conseqüentemente, o aumento da salinidade que já está elevada.

## 1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de ser uma espécie que coloniza área com menor salinidade, indivíduos de *R. mangle* tiveram pouca representatividade na área LS. Com isso estudos fisiológicos e moleculares podem contribuir para o entendimento desse processo, já que parâmetros ecológicos sozinhos não são suficientes. O que permitirá interpretar o funcionamento da espécie em condições salinas diferentes e contribuir para o entendimento do ótimo fisiológico e ecológico das mesmas.

## 1.6 REFERÊNCIAS

Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M., Sparovek, G., 2014. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6), 711–728.

Ball M.C., Cowan I.R., Farquhar, C.D., 1988. Maintenance of leaf temperature and the optimization of carbon gain in relation to water loss in a tropical mangrove forest. *Australian Journal of Plant Physiology*. 15, 263–276

Ball, M.C., 1988. Ecophysiology of mangroves. *Trees*. 2, 129-142. <https://doi.org/10.1007/BF00196018>

Ball, M.C., 2002. Interactive effects of salinity and irradiance on growth: implications for mangrove forest structure along salinity gradients. *Trees – Structure and Function*. 16, 126-139.

Ball, M.C., Pidsley, S.M., 1995. Growth responses to salinity in relation to distribution of two mangrove species, *Sonneratia alba* and *S. lanceolata*, in northern Australia. *Functional Ecology*. 9, 77-85.

Cintron-Molero, G., Schaeffer-Novelli, Y., 1992. Ecology and management of New World mangroves. In: *Coastal Plant Communities of Latin America*. U. Seeliger (ed.). Academic Press, California, p. 233-258.

Dangremond, E.M., Feller, I.C., Sousa, W.P., 2015. Environmental tolerances of rare and common mangroves along light and salinity gradients. *Oecologia*. 179, 1187–1198. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3408-1>

Hoppe-Speer, C.L., Adams, J.B., Rajkaran, A., Bailey, D., 2011. The response of the red mangrove *Rhizophora mucronata* Lam. to salinity and inundation in South Africa. *Aquatic Botany*. 95, 71-76.

Jimenez, J.A., Martinez R., Encarnacion, L., 1985. Massive tree mortality in a Puerto Rican mangrove forest. *Caribbean Journal of Science*. 21, 75-78.

Krauss, K.K., Doyle, T.W., Robert R., Twilley, R.R., Rivera-Monroy, V.H., Sullivan, J.K., 2006. Evaluating the relative contributions of hydroperiod and soil fertility on growth of south Florida mangroves. *Hydrobiologia*. 569, 311–324.

Krauss, K.W., Lovelock, C.E., Mckee, K.L., López-Hoffman, L., Ewe, S.M.L., Sousa, W.P., 2008. Environmental drivers in mangrove establishment and early development: a review. *Aquatic Botany*. 89, 105–127.

Lopes, D.M.S., 2014. Relação da Estrutura e Fotossíntese em Espécies de Mangue no Rio São Mateus. 2014. 73 f. Dissertação (Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus.

Nóbrega, N.E.F., Silva, J.G.F., Ramos, H.E.A., Pagung, A.F.S., 2008. Balanço Hídrico Climatológico e Classificação Climática de Thornthwaite e Köppen para o Município de São Mateus – ES. In: Congresso Nacional de Irrigação e Drenagem, 18., 2018, São Mateus. O Equilíbrio do fluxo hídrico para a agricultura irrigada sustentável: anais. São Mateus: ABID, 2008. Disponível em: <http://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/item/247/1/1568-marilandia.pdf>

Schaeffer-Novelli, Y., Cintron, G., 1986. Guia para estudo de áreas de manguezal e estrutura, função e flora. Caribbean Ecological Research, São Paulo, 150 p.

Silva, M.A.B., Bernini, E., Carmo, T.M.S., 2005. Características estruturais de bosques de mangue do estuário do rio São Mateus, ES, Brasil. Acta Botânica Brasilica. 19(3) 465-471.

Smith, T.J., 1992. Forest Structure. In: Robertson e D.M. Alongi (Eds), Coastal and Estuarine Studies, Tropical Mangrove ecosystems, American Geophysical Union. 41, 101-136.

Soares, M.L.G. 1999. Estrutura vegetal e grau de perturbação dos manguezais da Lagoa da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Revista Brasileira de Biologia. 59(3), 503-515.

Soares, M.L.G., Tognella, M.M.P., Cuevas, E., Medina, E., 2015. Photosynthetic capacity and intrinsic water-use efficiency of *Rhizophora mangle* at its southernmost western Atlantic range. Photosynthetica. 53, 464-470. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0119-0>

Takemura, T., Hanagata, N., Sugihara, K., Baba, S., Karube, I., Dubinsky, Z., 2000. Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorhiza*. Aquatic Botany. 68, 15–28. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(00\)00106-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(00)00106-6)

## CAPÍTULO 2

### Fluxo de elétrons na espécie de mangue *Rhizophora mangle* L. crescendo em condições de campo sob distintas de salinidade

#### RESUMO

*Rhizophora mangle* constitui uma espécie de grande importância ecológica para o ecossistema manguezal e o estudo das suas estratégias fisiológicas para crescer e se desenvolver em um ambiente extremo é de grande interesse. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência fotossintética, pela técnica de análise da fluorescência da clorofila *a* em indivíduos jovens de *R. mangle* crescendo em condições similares de inundação e contrastante de salinidade no Estuário do Rio São Mateus. Os valores da salinidade apresentaram diferença entre as áreas em todas as amostragens sendo sempre maior em HS. Valores da Banda L, fase IP e índice de desempenho ( $PI_{TOTAL}$ ) foram maiores na área LS. Os parâmetros da fluorescência inicial ( $F_0$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ), Ponto J e  $ET_0/RC$  foram maiores em HS. O estudo foi realizado em duas florestas de manguezal na área HS de maior salinidade e na área LS de menor salinidade, conduzidos em abril e setembro de 2016 e março e setembro de 2017. Plantas de *R. mangle* apresentam mecanismos para tolerar o aumento da salinidade, uma vez que as plantas da área HS exibiram mais RCs ativos, maior atividade fotoquímica, assim como melhor conectividade energética entre as antenas e os RCs do FSII e melhor eficiência na transferência de elétrons entre o CEO e o lado aceptor do FSII. Contudo, maiores valores de  $PI_{TOTAL}$  e da fase IP nas plantas de LS indicam melhor eficiência da redução dos aceptores finais do FSI, que sugere maior atividade do FSI. A variação salina ao longo das estações influencia o transporte de elétrons em plantas de *R. mangle* e consequente, prejudicar o desenvolvido estrutural da floresta adulta.

**Palavras-chaves:** Fluorescência da clorofila *a*; Teste JIP; Estresse salino

#### 2.1 INTRODUÇÃO

Fatores externos de estresse, tais como elevada salinidade, podem resultar em estresse oxidativo com o consequente acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS), causando inibição da fotossíntese e danos celulares (Jithesh et al., 2006). Na maioria das espécies de mangue o crescimento é estimulado por níveis moderados de salinidade, enquanto níveis extremos ou a ausência de sal inibem o crescimento e desenvolvimento das plantas (Ball, 1988; Takemura et al., 2000; Parida et al., 2004). Deste modo, as plantas evoluíram sofisticada sinalização e processos metabólicos em

resposta ao sal, incluindo o ajustamento da fotossíntese e mecanismos de exclusão do sal (Tuteja, 2007).

Os manguezais são ecossistemas únicos que crescem na zona intertidal, distribuídos desde o nível médio do mar até os locais onde as marés mais extremas de sizígia atingem (Naidoo, 2010). Seu funcionamento é rígido por forçantes ambientais que exercem uma forte influência sobre o balanço do ganho carbono e na forma de crescimento de espécies de mangue (Barr et al., 2009), sendo a salinidade um dos principais tensores e regulador fundamental do desenvolvimento e da produtividade das florestas de mangue (Medina et al., 1990; Sobrado and Ball, 1999; Watzak and Medina, 2018). A espécie de mangue *Rhizophora mangle* L. eliminam o excesso de sal por um mecanismo de ultrafiltração que ocorre nas membranas das células da raiz (Scholander, 1968). As espécies da família Rhizophoracea desenvolvem-se melhor em condições de salinidade de até 30 psu (Krauss and Allen, 2003; Parida et al., 2003)

A fluorescência da clorofila *a* tem sido utilizada como uma ferramenta eficaz e não destrutiva para elucidar vários aspectos relacionados ao desempenho fotossintético em folhas intactas de plantas superiores (Krause and Weis, 1991; Baker and Rosenqvist, 2004). A técnica envolve mensuração de parâmetros que possibilita verificar se existe redução no transporte de elétrons através do fotossistema II (FSII) (Baker, 2008). Dentro desta perspectiva, pode-se identificar se a redução no transporte de elétrons é devido aos danos no FSII ou uma estratégia utilizada pelas plantas como forma de criar efeito fotoprotetor impedindo que ocorra a foto-oxidação do FSII (Yordanov et al., 2000).

Dentro dos parâmetros utilizados para avaliação da redução do transporte de elétrons destaca-se os transientes da fluorescência da clorofila *a*. A fluorescência da clorofila *a* típica exibe uma sequência de fases a partir do valor da fluorescência inicial ( $F_0$ ) para a máxima ( $F_m$ ). Estes transientes são denominados de ponto O, quando todos os centros de reação (RC) estão abertos, J correspondendo a  $\sim 2$  ms da emissão de luz, I ao intervalo de  $\sim 30$  ms e P que é a etapa igual a  $F_m$  quando todos os RC estão fechados (Strasser et al., 1995, 2004, 2010). Além disso, análises dos transientes OJIP pelo “teste JIP” permitem o cálculo de uma gama de parâmetros estruturais e funcionais que quantificam o comportamento do FSII (Strasser and Strasser 1995; Strasser et al., 2004; Stirbet and Govindjee, 2011). Vários estudos mostram que plantas cultiváveis submetidas a tratamentos de estresse como de temperatura e hídrico (Petkova et al., 2007; Rong-hua et al., 2006; Oukarroum et al., 2009) além de espécies de mangue sob

estresse salino (Panda et al., 2006, Parida et al., 2003, Hoppe-Speer et al., 2011; Naidoo et al., 2011) tiveram o rendimento fotossintético negativamente afetado por meio da redução de  $F_v/F_m$  e  $F_m$  e aumento de  $F_0$ . Resultados que apontam como os componentes do aparato fotossintético podem ser danificados quando submetidos a algum tensor. Além disso, o estresse salino resultou em diminuição na atividade do Complexo de evolução do Oxigênio (CEO) fotossintético e da atividade de transporte de elétrons no FSII, mas aumento na atividade de transporte de elétrons no FSI em cianobactérias (Zhang et al., 2010).

A fase O-J (50  $\mu$ s – 2 ms) refere-se aos primeiros 2 ms da curva e corresponde à fase fotoquímica primária da fotossíntese, que leva a redução do lado acceptor do FII, isto é,  $Q_A$  para  $Q_A^-$  (Strasser et al., 1995; Tóth et al., 2007). A etapa J-I, que vai de 2 ms até 30 ms, corresponde à redução do *pool* de plastoquinonas (PQ) (Tóth et al., 2007). A fase I-P (30ms – 300 ms) refere-se às sequências dos eventos de redução dos aceptores finais do fotossistema I (FI), desde a transferência de elétrons do FSII a partir da plastoquinona reduzida ( $PQH_2$ ) até os aceptores finais de elétrons do FSI (Yusuf et al., 2010). Além do mais, a identificação do comportamento das bandas K (0,3 ms) e L (0,1 ms) é um fato importante, pois estes parâmetros são bons indicadores dos distúrbios fisiológicos que ocorrem nas plantas antes que os danos visuais sejam manifestados (Oukarroum et al., 2009). Desta forma, avaliações da fluorescência da clorofila *a* podem indicar alterações na produção da floresta que seriam respostas às modificações dos fatores que condicionam a fotossíntese, como aquisição de água, aumento de temperatura entre outros.

Por ser uma espécie amplamente distribuída, crescendo em uma gama de níveis de salinidade e por seu processo de exclusão de sal, *R. mangle* constitui uma espécie com grande importância ecológica para o ecossistema manguezal. Desta forma, o estudo das suas estratégias fisiológicas para crescer e se desenvolver em um ambiente extremo, caracterizado por variações diárias nas inundações e salinidades intersticial, em decorrência das marés, altas temperaturas e luminosidade, torna-se importante. Uma vez que *R. mangle* são halófitas facultativas que crescem tipicamente em áreas costeiras salinas de regiões tropicais e subtropicais, embora sejam capazes de crescer bem em água doce (Hao et al., 2009). O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência fotossintética, a partir da técnica de análise da fluorescência da clorofila *a* em plantas jovens de *R. mangle* crescendo em condições similares de inundação e contrastante de salinidade no Estuário do Rio São Mateus.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Área de Estudo

Vide capítulo 1

### 2.2.2 Amostragem

Para as medições de fluorescência da clorofila *a* definiu-se um padrão de amostragem, que consistiu na quantificação dos dados em cinco folhas consideradas como jovens e estando completamente expandidas, sem indícios de senescência. Para atender a este padrão, foram amostradas as folhas do segundo par a partir do ápice para a base do ramo. Estas réplicas foram obtidas em doze indivíduos jovens (amostras) com até dois metros de altura de *R. mangle* selecionados no interior das florestas.

As coletas foram realizadas em abril e setembro de 2016 (denominadas ao longo do trabalho como primeira e segunda amostragem, respectivamente) e março e setembro de 2017 (denominadas ao longo do trabalho como terceira e quarta amostragem, respectivamente). Para a identificação da espécie em cada área (área HS e LS) por amostragem definiu-se as seguintes terminologias: Rh1 refere à primeira amostragem e Rh2 à segunda amostragem, Rh3 à terceira amostragem e Rh4 à quarta amostragem. Todas as coletas foram realizadas em dias de céu claro e sem nuvens. Cada amostragem envolveu dois dias de campo, sendo um dia para cada área. Os dados entre as áreas foram obtidos nos mesmos horários no período da manhã para padronizar e evitar variação de radiação luminosa recebida por cada floresta.

### 2.2.3 Mensuração da Fluorescência da Clorofila *a*

As medidas da fluorescência da clorofila *a* foram obtidas entre 08:00 e 10:00 horas.

Utilizou-se fluorímetro portátil Handy-PEA (Hanstech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK), conforme descrito por Strasser and Strasser (1995). Previamente a realização das medidas de fluorescência, as folhas foram adaptadas ao escuro por 30 minutos (Falqueto et al., 2008) utilizando-se cliques foliares apropriados (Hansatech Instruments Ltd.). O objetivo desta pré-adaptação é produzir a oxidação completa da cadeia de transporte de elétrons (Maxwell and Johnson, 2000). Após este período de obscuridade, a amostra foi submetida a um pulso de luz saturante de  $3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (650 nm) e o transiente da fluorescência OJIP foi registrado pelo equipamento de 10  $\mu\text{s}$

a 1 s. A intensidade de fluorescência em 50  $\mu$  (considerado com  $F_0$ ), 100  $\mu$ s, 300  $\mu$ s, 2 ms ( $F_J$ ), 30 ms ( $F_I$ ) e fluorescência máxima ou  $F_m$  foram coletadas e utilizadas para obter os parâmetros do teste JIP. Neste estudo, os parâmetros do teste JIP utilizados foram os fluxos específicos de energia, por centro de reação ativos: fluxo de absorção por centro de reação (ABS/RC); fluxo de energia capturada por centro de reação ( $TR_0/RC$ ); fluxo de energia transportados por centro de reação ( $ET_0/RC$ ); e dissipação de calor por centro de reação ( $DI_0/RC$ ). Esta avaliação é importante porque fornece informações dos fluxos de energia que passam pelo FS II (Strasser e Strasser, 1995; Strasser et al., 2004). Também foram analisados os índices de desempenho: conservação de energia na redução dos aceptores de elétrons do intersistema ( $PI_{ABS}$ ) e conservação de energia na redução dos aceptores finais do FSI ( $PI_{TOTAL}$ ).

Equações provenientes de parâmetros do teste JIP também foram utilizadas para calcular as bandas L e K, o ponto J e a fase IP (Desotgiu et al., 2013). Banda L:  $V_{OK} = (F_{100\mu s} - F_0) / (F_{300\mu s} - F_0)$  - Fluorescência variável em 100  $\mu$ s (transientes normalizados entre  $F_0$  e  $F_K$ ) (Strasser e Stirbet, 2001). Banda K:  $V_{OJ} = V_{OK} (F_{300\mu s} - F_0) / (F_{2ms} - F_0)$  - Fluorescência variável em 300  $\mu$ s (transientes normalizados entre  $F_0$  e  $F_J$ ) (Sristava et al., 1997). Ponto J =  $(F_{2ms} - F_0) / (F_M - F_0)$  (Strasser et al 2004). Fase IP:  $\Delta V_{IP} = (F_M - F_{30ms}) / (F_M - F_0)$  (Oukarroum et al., 2009).

Para evidenciar as diferenças entre cada ponto da curva OP, OK, OJ, OI e IP, foram calculados as curvas das diferenças cinéticas do transiente da fluorescência, a partir da dupla normalização entre cada ponto anteriormente citado, isto é,  $\Delta V_{OP}$ ,  $\Delta V_{OK}$ ,  $\Delta V_{OJ}$ ,  $\Delta V_{OI}$ ,  $\Delta V_{IP}$ .  $\Delta V$  é calculado a partir de ( $\Delta V$  (controle)) -  $\Delta V$  (tratamento)). Para isso, os dados de *R. mangle* obtidos a partir de plântulas cultivadas em laboratório, sem adição de NaCl, foram usados como controle.

#### 2.2.4 Salinidade

A salinidade da água do solo foi determinada mensalmente ao longo do estudo, em cada área, no mesmo dia, a partir de três réplicas. A coleta da água intersticial foi realizada a partir da perfuração de aproximadamente 30 cm de profundidade no sedimento e neles inseridos canos de cloreto de polivinila (PVC). Os canos de 50 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro, com 20 cm de sua base perfurados em toda sua volta e vedado com tampa de PVC, em contato com o sedimento armazena a água que percola pelo sedimento. A porção superior também foi fechada com tampa de PVC para evitar a

entrada de água da chuva. Essas amostragens permitem o registro da salinidade com maior periodicidade e menor custo.

O registro da salinidade foi realizado com a abertura da tampa superior e coleta da água armazenada no interior do cano de PVC. Após a coleta da água, a leitura da condutividade foi feita com um medidor portátil modelo HQ40D (HACH Company). Desta forma, obteve-se os valores médios mensal, além dos valores mínimos e máximos de salinidade para cada área de estudo.

### **2.2.5 Análise Estatística**

Os valores dos parâmetros da clorofila *a* foram analisados estatisticamente por *Kruskal-Wallis* ANOVA, para determinar diferenças entre áreas (HS x LS) e amostragens. Diferenças entre as medianas também foram avaliadas *Kruskal-Wallis*, em que o valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **2.3 RESULTADOS**

### **2.3.1 Salinidade**

A salinidade diferiu entre as áreas estudadas em todas as amostragens e foi maior em HS (Tabela 2.1). No entanto, a comparação entre as amostragens revelou menores valores de salinidade em Rh3 nas duas áreas estudadas (18,8 e 9,44 para HS e LS, respectivamente). Em HS, o maior valor de salinidade (36,5) foi registrado durante Rh2 enquanto para a área LS os maiores valores foram amostrados em Rh2 e Rh4 (25,5 e 26,01, respectivamente). Em HS, valores intermediários de salinidade foram obtidos durante Rh1 e Rh4 (30,8 e 31,7, respectivamente) enquanto na área LS salinidade intermediária foi observada em Rh1 (17,8).

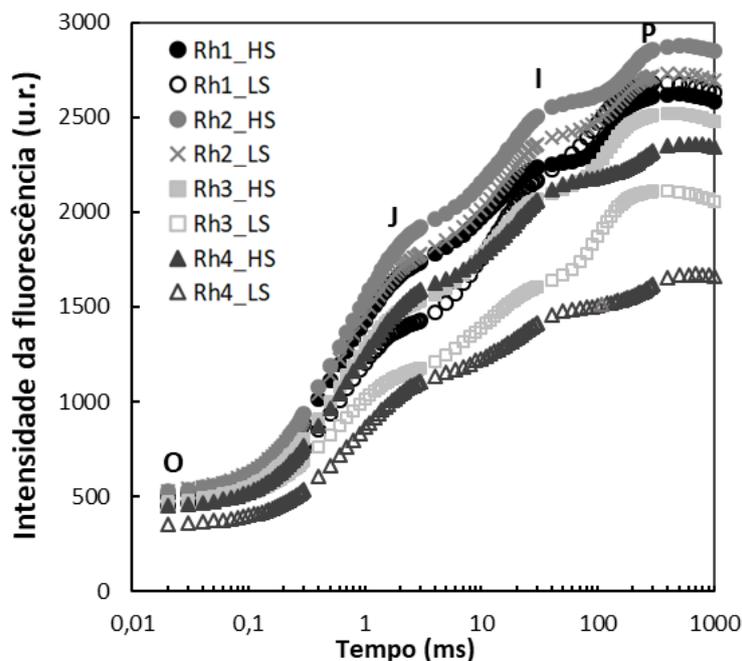
**Tabela 2.1.** Dados mensais de salinidade monitorados entre abril de 2016 a setembro de 2017 nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade). Os dados são apresentados como valores mínimo, máximo e média (n = 4). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre áreas são destacadas por (\*), dados em negrito correspondem aos meses de amostragens da fluorescência e trocas gasosas.

Áreas/Amostragem	LS/2016			HS/2016			LS/2017			HS/2017		
	Min.	Máx.	Média	Min.	Máx.	Média	Min.	Máx.	Média	Min.	Máx.	Média
JAN	-	-	-	-	-	-	5,4	15,2	10,6	8,2	27	14,6
FEV	-	-	-	-	-	-	7,7	15,6	12,2	18,4	23,6	21,9*
MAR (Rh4)	-	-	-	-	-	-	<b>7,3</b>	<b>11,3</b>	<b>9,4</b>	<b>17,7</b>	<b>20</b>	<b>18,8*</b>
ABR (Rh1)	<b>17,2</b>	<b>18,2</b>	<b>17,8</b>	<b>30,3</b>	<b>31,3</b>	<b>30,8</b>	10,1	16,2	13,2	21,2	24,6	23*
MAI	18,4	18,9	18,6	30,1	31,2	30,7	8	9,2	8,5	17,8	19,8	18,5*
JUN	17,8	18,5	18,1	28,6	28,9	28,8*	9,9	11,5	10,8	17,3	23,6	19,4*
JUL	12,5	17,8	15,3	23,3	28,2	26,8*	15,1	22,1	20	25,7	33,5	30*
AGO	24,4	24,9	24,6	27,4	32,4	29,7*	21,3	26,4	24,9	26,7	32,8	29,8
SET (Rh2 e Rh3)	<b>23,9</b>	<b>27</b>	<b>25,5</b>	<b>34,5</b>	<b>38,6</b>	<b>36,5*</b>	<b>24,6</b>	<b>26,6</b>	<b>25,7</b>	<b>29</b>	<b>37</b>	<b>31,7*</b>
OUT	22,8	28,5	25,3	32,3	36,4	34,2*	-	-	-	-	-	-
NOV	3,2	6,8	5,1	9,5	13,7	12*	-	-	-	-	-	-
DEZ	1,6	5,9	3,8	11,6	15,7	13,3*	-	-	-	-	-	-

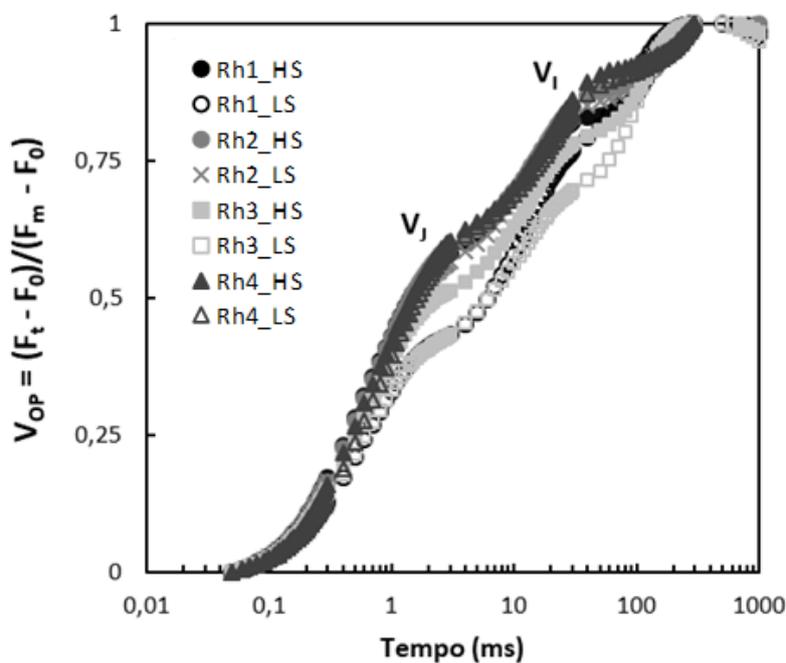
### 2.3.2 Fluorescência da clorofila *a*

Os resultados da fluorescência transiente da clorofila *a* em plantas de *Rhizophora mangle* estão apresentadas em escala logarítmica (Figura 2.1). As medidas entre  $F_0$  (0,05 ms) e  $F_m$  (300 ms) são referentes à intensidade de fluorescência para as duas áreas com salinidades distintas, isto é, menor salinidade (LS) maior salinidade (HS). A maior intensidade de fluorescência foi registrada na área HS (2854 u.r) durante a amostragem Rh2 (2016), seguidos pelos registros na área LS em Rh2 (2715 u.r) e em Rh1 (2677 u.r.), respectivamente, ambas no ano de 2016. As menores intensidades de fluorescência foram registradas na área LS em Rh3 (2107 u.r.) e em Rh4 (1616 u.r.) respectivamente, ambas no ano de 2017. Este último registro foi cerca de 60% menor que a intensidade da fluorescência da área HS em Rh2 (Figura 2.1).

A fluorescência variável ( $V_{OP}$ ) entre a fase O-P (0,05 ms – 300 ms) é exibida na figura 2.2. É nítido que existe diferença entre os pontos J (2 ms) entre as áreas. É possível observar dois grupos, onde as curvas menos positivas são de plantas da área LS em Rh3 e Rh4, respectivamente.

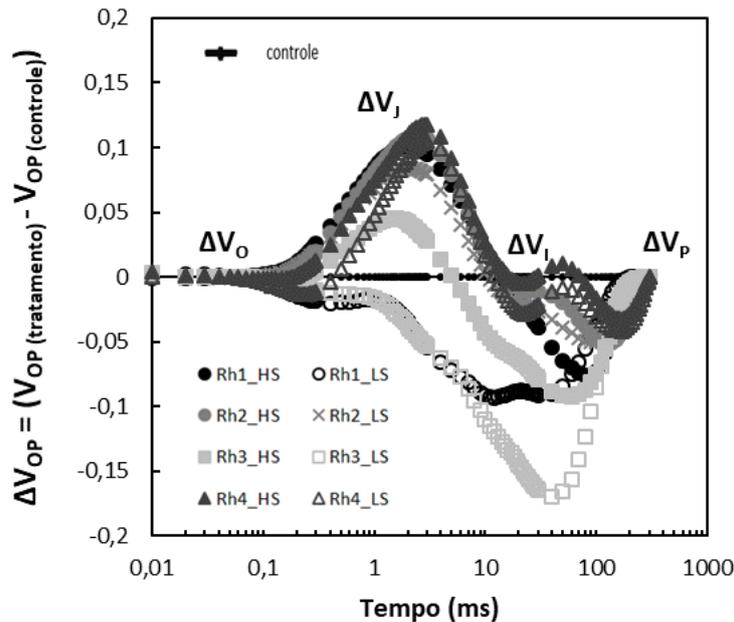


**Figura 2.1.** Curvas da fluorescência transiente da clorofila *a* (escala de tempo log) de *Rhizophora mangle* em duas áreas (HS e LS) com diferença de salinidade mostrando o aumento da fluorescência de  $F_0$  (O) até o máximo,  $F_m$  (P), com etapas intermédias J e I para os anos de 2016 (Rh1 e Rh2) e 2017 (Rh3 e Rh4). As curvas da fluorescência transiente da clorofila *a* exibem intensidade de fluorescência (u.r. - unidade relativa).



**Figura 2.2.** Fluorescência transiente da clorofila *a* de O a P entre  $F_0$  e  $F_P$ . Fluorescência variável relativa [ $V_{OP} = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$ ] de *Rhizophora mangle*, referente à primeira (Rh1), segunda (Rh2), terceira (Rh3) e quarta (Rh4) amostragem, na área HS de maior salinidade e área LS de menor salinidade.

Para evidenciar as diferenças entre cada ponto da curva foram calculadas as curvas das diferenças cinéticas do transiente da fluorescência, relativa ao controle (plântulas cultivadas em laboratório sem adição de sal) (Figura 2.3). Plantas de *R. mangle* da área LS exibiram banda negativa entre O-J e J-I em Rh1 e Rh3. O aparecimento de banda positiva entre os pontos O-J e J-I foram registradas na área HS em Rh2 e em ambas as áreas na amostragem Rh4.

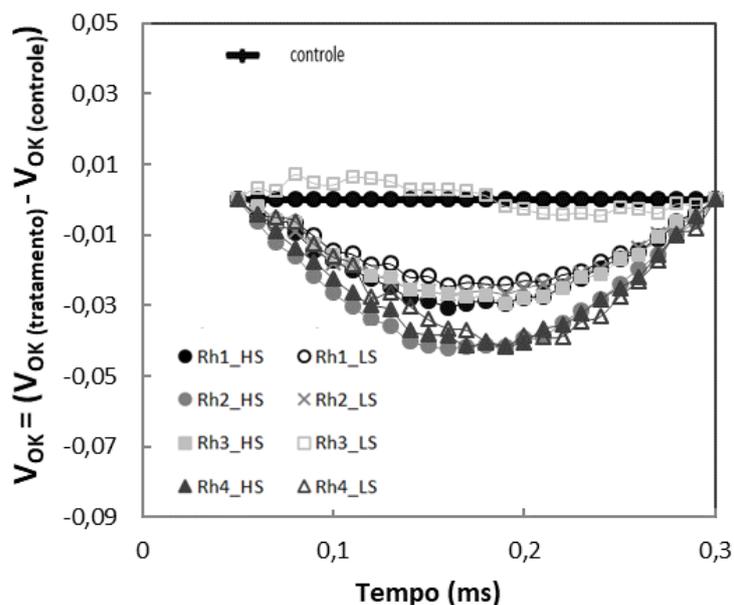


**Figura 2.3.** Fluorescência variável relativa [ $V_{OP} = (F_t - F_0) / (F_M - F_0)$ ] de *Rhizophora mangle*, referente à primeira (Rh1), segunda (Rh2), terceira (Rh3) e quarta (Rh4) amostragem, na área HS de maior salinidade e área LS de menor salinidade.

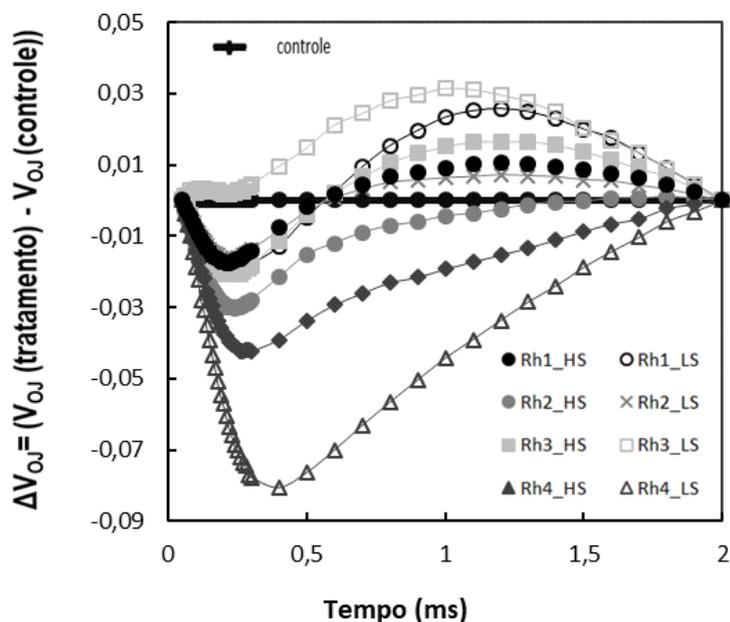
Os dados de fluorescência relativa entre os pontos O-K ( $V_{OK} = [F_t - F_0] / [F_K - F_0]$ ) e O-J ( $V_{OJ} = [F_t - F_0] / [F_J - F_0]$ ) foram normalizados e reportados como sendo a diferença cinética em relação ao controle  $\Delta V_{OK}$  (Banda L) e  $\Delta V_{OJ}$  (Banda K).

Os resultados relativos à banda L, em ambas as áreas e amostragens, exibiram bandas negativas, comparadas ao controle (Figura 2.4). Exceção foi constatada na área LS na amostragem Rh3, onde foi observado o aparecimento da banda L positiva. As bandas negativas tiveram maior amplitude na área HS em Rh2 e em ambas as áreas em Rh4.

A banda K, assim como a banda L, exibiu bandas de amplitude negativa em todas as amostragens e áreas, exceto na área LS em Rh3, que foi positivo (Figura 2.5). Contudo, as maiores amplitudes negativa da banda K foram registradas em Rh4 na área LS, seguido pelas plantas em HS.

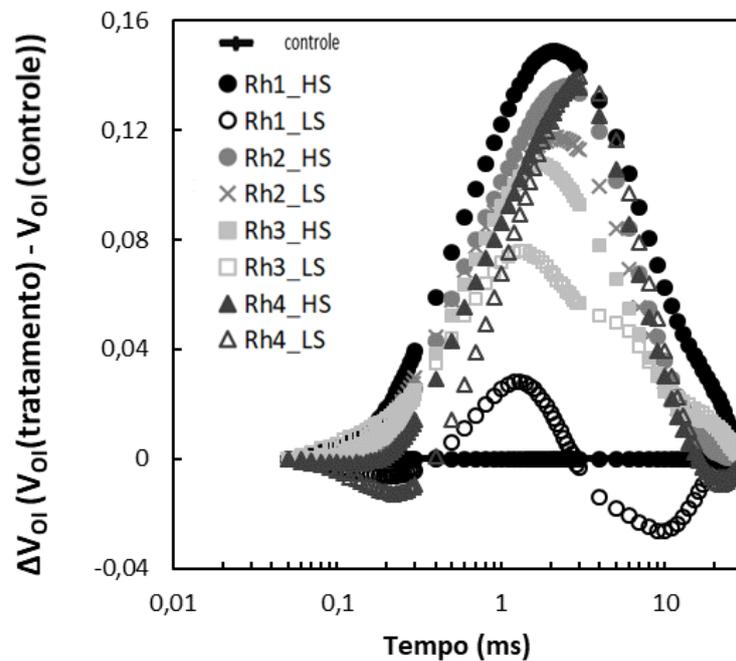


**Figura 2.4.** Fluorescência relativa entre os pontos O (0,05 ms) e K (0,3 ms) apresentados como diferença cinética  $\Delta V_{OK} = [V_{OK}(\text{tratamento}) - V_{OK}(\text{controle})]$  descreve os resultados da banda L para as áreas HS e LS em *Rhizophora mangle* referente à primeira (Rh1), segunda (Rh2), terceira (Rh3) e quarta (Rh4) amostragem, na área HS de maior salinidade e área LS de menor salinidade.



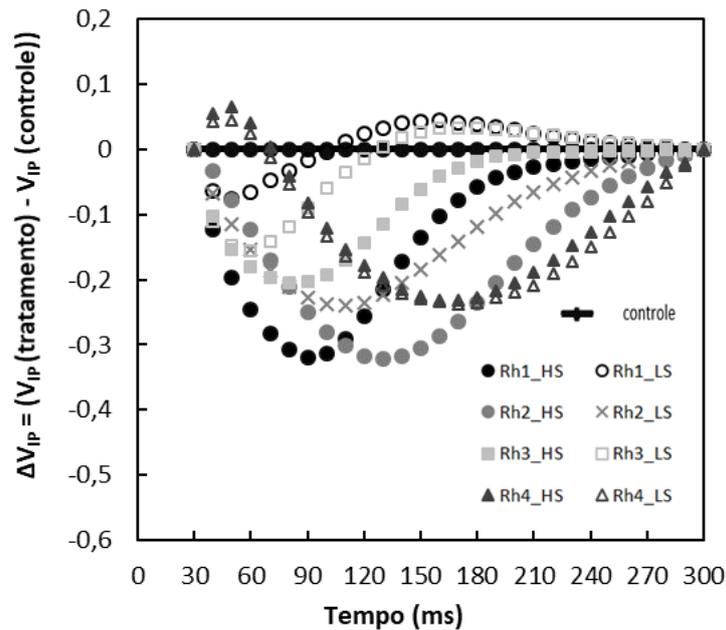
**Figura 2.5.** Fluorescência relativa entre os pontos O (0,05ms) e J (2 ms) apresentados como diferença cinética  $\Delta V_{OJ} = [V_{OJ}(\text{tratamento}) - V_{OJ}(\text{controle})]$  corresponde aos dados da banda K para as áreas HS de maior e LS de maior salinidade, em *Rhizophora mangle* referente à primeira (Rh1), segunda (Rh2), terceira (Rh3) e quarta (Rh4) amostragem, na área HS de maior salinidade e área LS de menor salinidade.

A fluorescência entre os pontos O e I foram normalizados (dados não apresentados) e expostos como a diferença cinética  $\Delta V_{OI}$  (Figura 2.6). Na figura podemos observar que os registros obtidos em todas as amostragens e áreas foram curvas positivas, exceto na área LS em Rh1. Entre as curvas positivas destaca-se a de Rh1\_HS como sendo a mais acentuada. Curva positiva menos acentuada também foi exibida pelas plantas da área LS em Rh3.



**Figura 2.6.** Diferença cinética da fluorescência transiente da clorofila *a* de O (0,05 ms) a I (30 ms)  $\Delta V_{OI} = V_{OI}(\text{tratamento}) - V_{OI}(\text{controle})$  para as áreas HS de maior e LS de maior salinidade, em *Rhizophora mangle* referente à primeira (Rh1), segunda (Rh2), terceira (Rh3) e quarta (Rh4) amostragem, na área HS de maior salinidade e área LS de menor salinidade.

Por fim, para avaliar os pontos I-P (30 ms a 300ms), os dados de fluorescência também foram normalizados e exibidos como uma diferença cinética  $\Delta V_{IP}$  (Figura 2.7). Entre os pontos I-P, *R. mangle* registrou curva positiva, pouco acentuada, apenas na área de menor salinidade (LS) em Rh1 e Rh3. Todas as outras amostragens exibiram curvas negativas, sendo mais acentuada os registros em Rh2\_HS.

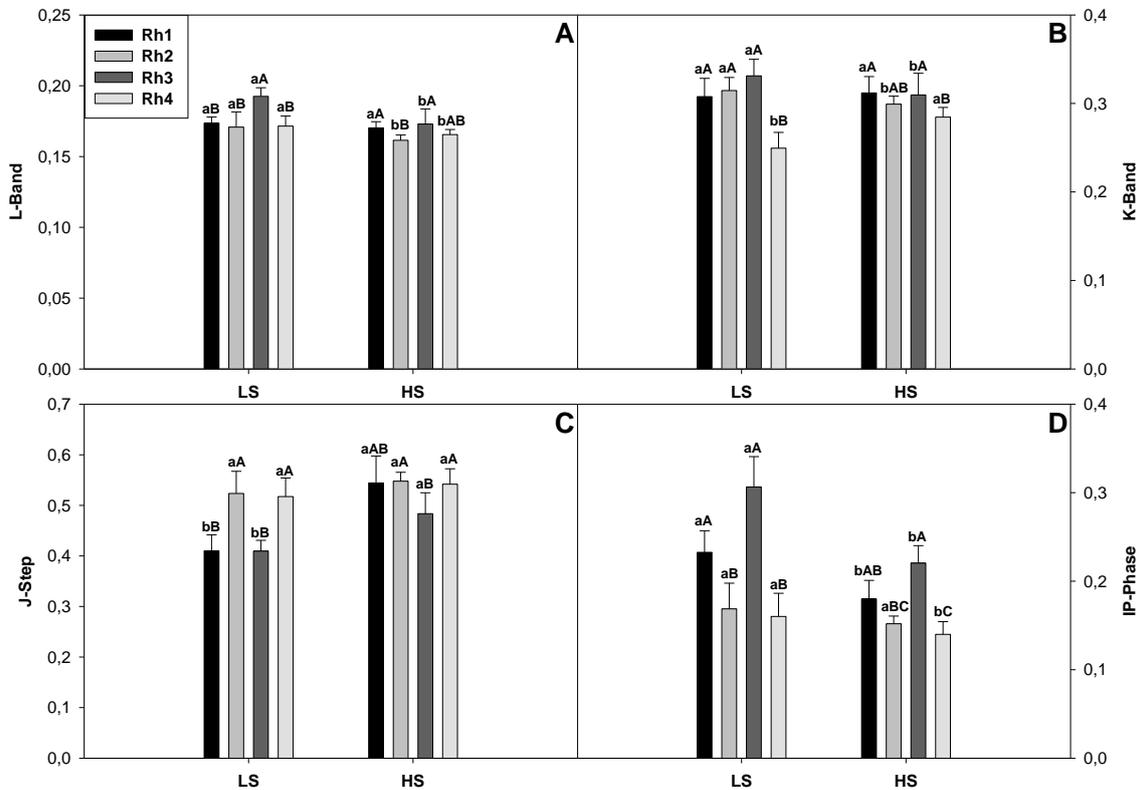


**Figura 2.7.** Diferença cinética da fluorescência transiente da clorofila *a* de I (30 ms) a P (300 ms)  $\Delta V_{IP} = V_{IP}(\text{tratamento}) - V_{IP}(\text{controle})$  para as áreas HS de maior e LS de menor salinidade, em *Rhizophora mangle* referente à primeira (Rh1), segunda (Rh2), terceira (Rh3) e quarta (Rh4) amostragem, na área HS de maior salinidade e área LS de menor salinidade

Outra forma de averiguar o que foi exposto por meio das curvas OJIP é a descrição dos resultados das bandas L, K, do ponto J e da fase IP, apresentados na figura 2.8. Os parâmetros em forma numérica possibilitam a comparação estatística sem a necessidade do controle.

A banda L não diferiu entre as áreas apenas em Rh1 ( $p = 0,05$ ) (Figura 2.8A). Todas as demais amostragens exibiram maior valor de banda L na área LS. Comparações entre as amostragens apontaram maior valor da banda L na área HS em Rh1 e Rh3, respectivamente, e menor valor em Rh2. Na área LS, o maior valor da banda L foi observado em Rh3. A banda K, assim como a banda L, não diferiu entre as áreas HS e LS apenas em Rh1 ( $p = 0,6$ ) (Figura 2.8B). Os maiores valores da banda K foram verificados em Rh2 e Rh3 em LS e em Rh4 em HS. Na área HS, os maiores valores da banda K foram registrados em Rh1 e Rh3 e menor valor em Rh4. Em LS, maior valor de banda K ocorreram em Rh1, Rh2 e Rh3. Valores de ponto J diferiram entre as áreas em Rh1 ( $p = 0,000032$ ) e Rh3 ( $p = 0,0001$ ) e mostrou-se maior em HS (Figura 2.8C). Comparações entre amostragem evidenciaram menor ponto J em HS em Rh3. Em LS, maior valor de ponto J ocorreu em Rh2 e Rh4. A fase IP não diferiu entre as áreas apenas em Rh2. No entanto, valores de fase IP foram maiores em Rh1 ( $p = 0,00027$ ), Rh3 ( $p = 0,000032$ ) e Rh4 ( $p = 0,013$ ) na área LS (Figura 2.8D). Comparações entre

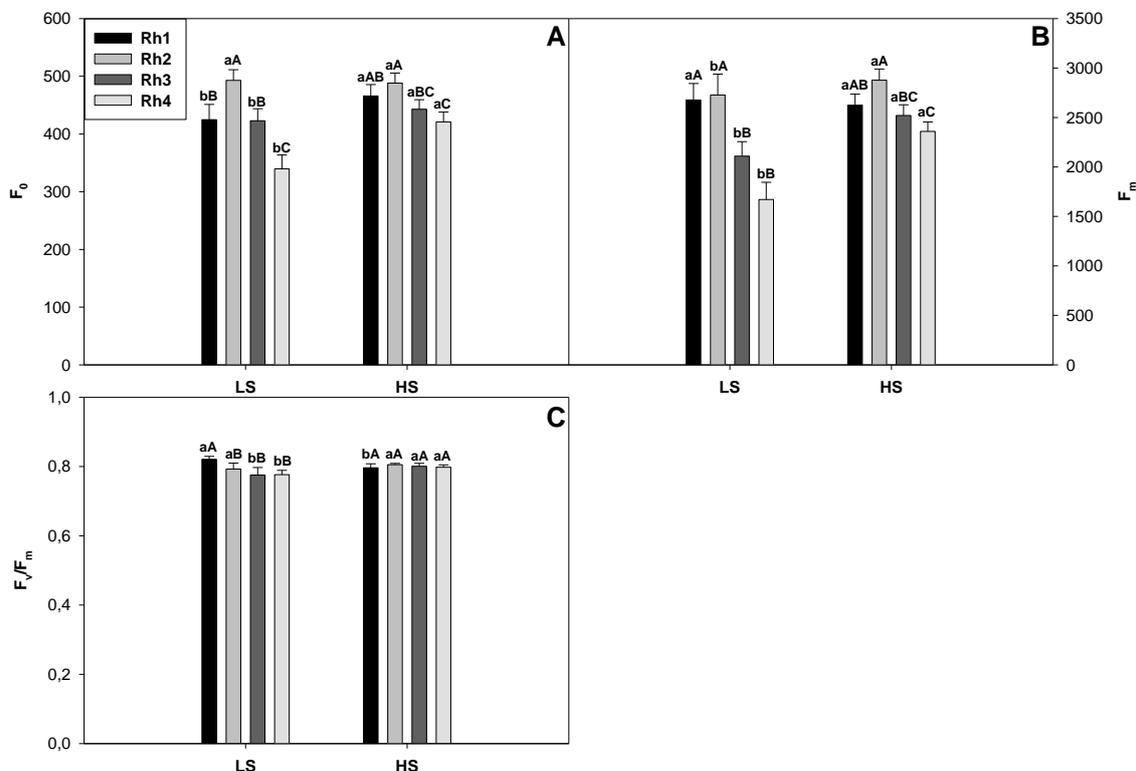
amostragem registrou maiores valores de fase IP na área HS em Rh3 e menores valores em Rh4. Na área LS, maiores valores de fase IP foram reportados em Rh1 e Rh3 enquanto menores valores de fase IP foram observados em Rh2 e Rh4.



**Figura 2.8.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) dos parâmetros calculados a partir do teste JIP ( $N=12$ ) obtidos de plantas de *Rhizophora mangle* (Rh1, Rh2, Rh3 e Rh4) nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade) em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (Rh3) e setembro de 2017 (Rh4). **A)** banda L, **B)** banda K, **C)** ponto J e **D)** fase IP. (\*) Médias diferem estatisticamente pelo teste de *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam comparações entre áreas diferentes (HS e LS). Letras maiúsculas reportam comparações entre amostragem em uma mesma área.

A fluorescência inicial ( $F_0$ ) foi maior em HS, exceto em Rh2 ( $p = 0,47$ ), que não diferiu entre as áreas (Figura 2.9A). Em HS, quando  $F_0$  foi comparado entre amostragens, foi maior em Rh2 e menor em Rh4. Na área LS,  $F_0$  aumentou em Rh2 diminuindo em Rh4. A fluorescência máxima ( $F_m$ ) não diferiu entre as áreas apenas em Rh1 ( $p = 0,45$ ) (Figura 2.9B). No entanto, em todas as outras amostragens, os valores de  $F_m$  foram maiores na área HS. Com relação às variações entre amostragens, valores de  $F_m$  foi maior e menor em Rh2 e Rh4, respectivamente, na área HS. Na área LS, os maiores valores de  $F_m$  foram verificados no ano 2016 (Rh1 e Rh2) e os menores valores em 2017 (Rh3 e Rh4). A razão  $F_v/F_m$  não diferiu entre as áreas apenas em Rh2 ( $p=0,1$ )

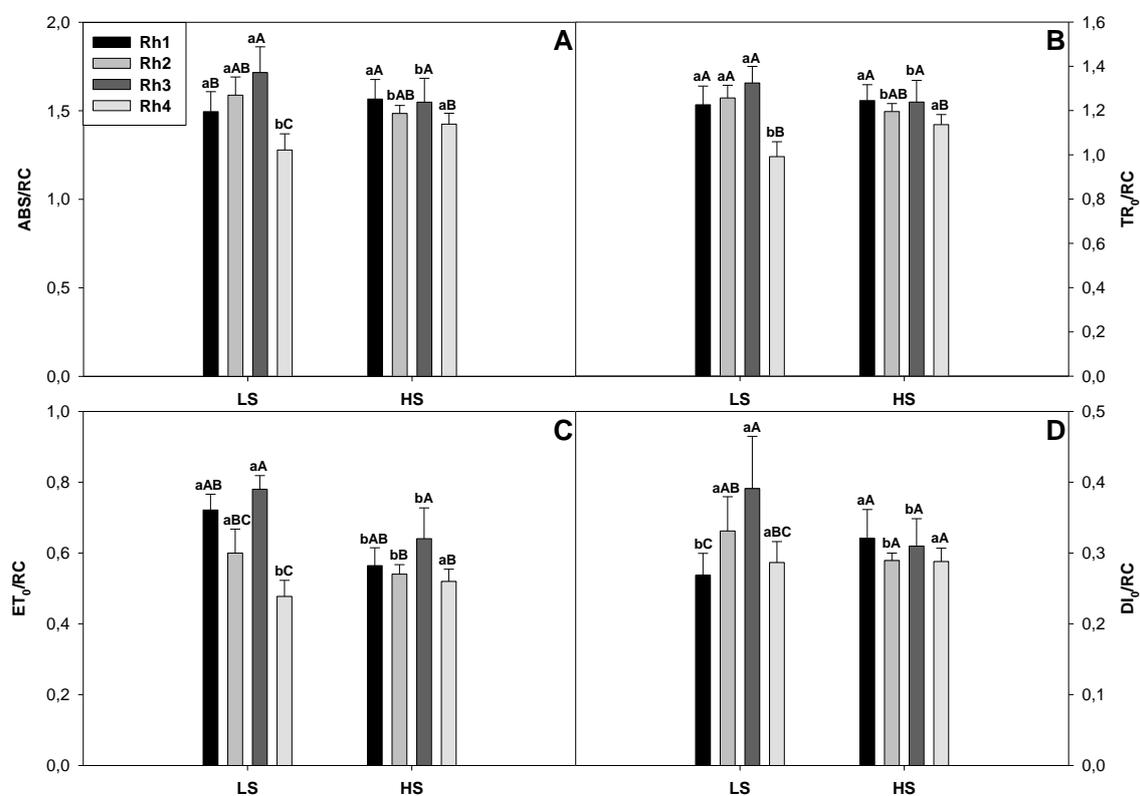
(Figura 2.9C), com maiores valores de  $F_v/F_m$  observado na área LS em Rh1 ( $p=0,000053$ ) e Rh3 ( $p=0,0009$ ) e na área HS em Rh4 ( $p=0,0002$ ). Comparações entre amostragens evidenciaram diferenças apenas em LS, os quais maior valor foram reportados em Rh1.



**Figura 2.9.** Parâmetros médios ( $\pm$  desvio padrão) do teste JIP (N=12) obtidos de plantas de *Rhizophora mangle* (Rh1, Rh2, Rh3 e Rh4) nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade) em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (Rh3) e setembro de 2017 (Rh4). **A)** intensidade de fluorescência inicial ( $F_0$ ), **B)** intensidade máxima de fluorescência ( $F_m$ ), **C)** eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ). Médias diferem estatisticamente pelo teste de *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam comparações entre áreas diferentes (HS e LS). Letras maiúsculas reportam comparações entre amostragem em uma mesma área.

Resultados dos parâmetros relacionados ao fluxo de energia por centros de reação estão expostos na Figura 2.10. Valores de  $ABS/RC$  não diferiram entre as áreas apenas em Rh1 ( $p=0,08$ ). No entanto, valor de  $ABS/RC$  foi maior em Rh2 ( $p=0,013$ ) e Rh3 ( $p=0,0046$ ) para a área HS e em Rh4 ( $p=0,00053$ ) para a área LS (Figura 2.10A). Comparações entre amostragens identificaram maior valor de  $ABS/RC$  para LS em Rh3, seguido por Rh1. Na área HS, maiores valores de  $ABS/RC$  foram verificados em Rh1 e Rh3.  $TR_0/RC$  também não diferiu entre as áreas em Rh1 ( $p=0,6$ ), mas foi maior em Rh2 ( $p=0,013$ ) e Rh3 ( $p=0,028$ ) na área LS e em Rh4 ( $p=0,00013$ ) na área HS

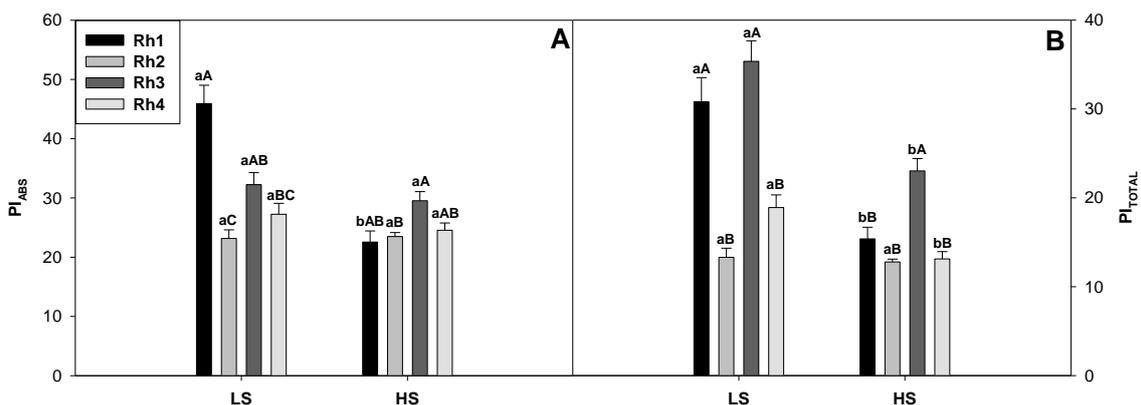
(Figura 2.10B). Na área LS, maiores valores de  $TR_0/RC$  foram registrados em Rh1, Rh2 e Rh3, e na área HS em Rh1 e Rh3.  $ET_0/RC$  diferiu entre as áreas em todas as amostragens, com maiores valores registrados na área HS (Figura 2.10C). Em ambas as áreas, maior valor de  $ET_0/RC$  foi registrado em Rh3. Finalmente, valores de  $DI_0/RC$  não diferiram entre as áreas apenas em Rh4 ( $p=0,9$ ). Contudo, valores de  $DI_0/RC$  foram maiores em Rh1 ( $p=0,003$ ) na área HS e em Rh2 ( $p=0,024$ ) e Rh3 ( $p=0,0018$ ) na área LS (Figura 2.10D). Comparações entre amostragens mostraram diferenças apenas na área LS, com menores valores de  $DI_0/RC$  observados em Rh1, e, a partir desta amostragem, aumentos em valores de  $DI_0/RC$  foram observados até a amostragem Rh3.



**Figura 2.10.** Parâmetros médios ( $\pm$  desvio padrão) do teste JIP descrevendo os fluxos específicos de energia por centro de reação ( $N=12$ ) obtidos de plantas de *Rhizophora mangle* (Rh1, Rh2, Rh3 e Rh4) nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade) em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (Rh3) e setembro de 2017 (Rh4). **A)** Absorção ( $ABS/RC$ ), **B)** Fluxo de energia capturada ( $TR_0/RC$ ), **C)** Fluxo de energia transportados ( $ET_0/RC$ ) e **D)** Dissipação de calor ( $DI_0/RC$ ). Médias diferem estatisticamente pelo teste de *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam comparações entre áreas diferentes (HS e LS). Letras maiúsculas reportam comparações entre amostragem em uma mesma área.

Os parâmetros dos índices de desempenho são apresentados na figura 2.11. Resultados de  $PI_{ABS}$  mostraram que apenas Rh1 diferiu entre as áreas, mostrando-se

maior na área LS (Figura 2.11A). Comparações entre amostragens revelaram maior valor de  $PI_{ABS}$  na área HS em Rh3 e menor valor em Rh2. Na área LS maior valor de  $PI_{ABS}$  foi verificado em Rh1, mas diminuiu em Rh2. Por fim,  $PI_{TOTAL}$  não diferiu entre as áreas apenas em Rh2 (Figura 2.11B). Contudo, em Rh1, Rh3 e Rh4 valores de  $PI_{TOTAL}$  foram maiores na área LS comparado à área HS. Na área LS, maiores valores de  $PI_{TOTAL}$  foram registrados em Rh1 e Rh3 e na área HS em Rh3.



**Figura 2.11.** Parâmetros médios ( $\pm$  desvio padrão) do teste JIP descrevendo os fluxos específicos de energia por centro de reação (N=12) obtidos de plantas de *Rhizophora mangle* (Rh1, Rh2, Rh3 e Rh4) nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade) em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (Rh3) e setembro de 2017 (Rh4). **A**) Índice de desempenho para conservação de energia na redução dos aceptores de elétrons do intersistema ( $PI_{ABS}$ ) e **B**) Índice de desempenho para conservação de energia na redução dos aceptores finais do FSI ( $PI_{TOTAL}$ ). Médias diferem estatisticamente pelo teste de *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam comparações entre áreas diferentes (HS e LS). Letras maiúsculas reportam comparações entre amostragem em uma mesma área.

## 2.4 DISCUSSÃO

Plantas de *R. mangle* apresentaram aumento polifásico OJIP nos sinais de fluorescência desde um nível basal ( $F_0$ ) até um nível máximo ( $F_m$ ), evidenciando o transporte de elétrons fotossintético ao longo da cadeia transportadora (Schanker et al., 2005), em ambas as áreas e amostragens (Figura 1). Esse aumento polifásico dos sinais de fluorescência evidencia que os indivíduos analisados são fotossinteticamente ativos (Yusuf et al., 2010).

A fase O-J (0,05 ms – 2ms) corresponde à fase fotoquímica primária da fotossíntese e representa a redução do lado aceptor do fotossistema II (FSII), isto é, a redução da  $Q_A$  para  $Q_A^-$  (Strasser et al., 1995; Tóth et al., 2007). Os resultados de  $V_{OP}$

(Figura 2) e  $\Delta V_{OP}$  (Figura 2.3) no presente estudo demonstram o transporte de elétrons foi alterado na área de maior salinidade, uma vez que a forma do transiente no ponto J continuou sendo mais positiva, quando comparada ao controle. Este aspecto representa o acúmulo de  $Q_A$  no estado reduzido, comprometendo o transporte de elétrons no lado acceptor do FSII. Neste sentido, uma vez observado aumento pronunciado no ponto J em indivíduos de *R. mangle* analisados em diferentes períodos com situações de sal, temperatura e precipitação distintas, e esse comportamento pode ser característico da espécie naquela área.

Os resultados do ponto J, calculado sem a necessidade de um controle, confirmaram os resultados das curvas apresentados em  $V_{OP}$  (Figura 2) e  $\Delta V_{OP}$  (Figura 2.3). Desta forma, os maiores valores de ponto J observados na área HS em Rh1 e Rh3 (Figura 8C), quando os níveis de salinidade para ambas as áreas eram intermediários e baixo (Tabela 2.1), respectivamente, evidenciam o efeito do ambiente mais salino, uma vez que nesta condição houve maior acúmulo de  $Q_A$  no estado reduzido e com isto menor eficiência no transporte de elétrons além da  $Q_A^-$ . Resultado similar foi observado entre as amostragens em ambas as áreas quando maior eficiência no transporte de elétrons no lado acceptor do PSII foram registradas nas ocasiões em que a salinidade se encontrava entre 18 e 9 (Tabela 2.1). Desta forma, por ser uma halófita facultativa, *R. mangle* mostrou maior eficiência no transporte de elétrons entre as quinonas  $Q_A$  e  $Q_B$  em salinidades consideradas no presente estudo como intermediárias e baixa, apresentando a condição ótima para esta etapa do transporte de elétrons fotossintético.

Os resultados da diferença cinética  $\Delta V_{OK}$  mostraram uma banda L visível de amplitude negativa em ambas as áreas, quando comparadas ao controle (Figura 2.4). Curvas negativas da banda L representam uma alta energia de conectividade entre as unidades dos FSII (Yusuf et al., 2010). A área de menor salinidade exibiu menor energia de conectividade entre as unidades do FSII (maior valor de banda L) em todas as amostragens, quando comparados com as plantas da área HS (Figura 2.8A). Análises por amostragens evidenciaram menor banda L em Rh2 na área HS, para a qual foram registrados os maiores valores de salinidade (36,5). Estes resultados sugerem que a espécie apresenta mecanismos para tolerar salinidade elevada com melhor utilização de energia de excitação dos elétrons e melhor estabilidade do sistema fotossintético. A tolerância desta espécie para se desenvolver em salinidades elevadas e/ou flutuantes é reforçada pelo resultado obtido na área LS entre as amostragens, haja vista que em Rh3, quando se registrou o menor valor de salinidade na área (Tabela 2.1), os indivíduos

apresentaram a menor energia de conectividade quando comparados os resultados obtidos nesta área sob condições de maior salinidade (26). Estes resultados são indicativos de manutenção da estabilidade dos RCs do PSII, uma vez que isto se constitui como parte da estratégia de adaptação ao estresse salino (Strasser et al., 2004; Goussi et al., 2018).

Os resultados das curvas  $\Delta V_{OJ}$  (banda K), assim como os da banda L, mostraram que na maior salinidade a eficiência no transporte de elétrons entre o lado doador de elétrons do FSII é mais eficiente (Figura 2.5). A banda K também foi maior na área LS (Figura 2.8B) quando comparada com HS. A banda K reflete os distúrbios no complexo de evolução do oxigênio (CEO) coincidindo com a limitação do lado doador do FSII (Strasser et al., 2004; Oukarroum et al., 2007; Yusuf et al., 2010). Assim, os maiores valores da banda K obtidas em LS sugerem menor eficiência na transferência de elétrons entre o lado doador e receptor do FSII, devido à inibição na velocidade de transferência de elétrons do CEO para o lado receptor do FSII (Srivastava et al., 1997; Strasser, 1997; Tomek et al., 2001). A maior eficiência na transferência de elétrons entre o lado doador e receptor do FSII das plantas na área de maior salinidade (HS) pode estar ocorrendo por fatores como o acúmulo de osmólitos secundários. Os osmólitos são produzidos em espécies de mangue para manter menor potencial hídrico nos tecidos (Poop et al., 1985), além de atuarem como um mecanismo de proteção ao CEO (Papageorgiou and Murata, 1995; De Ronde et al., 2004). Esta proteção do CEO e atuação dos osmólitos pode ser considerada pelos menores valores da banda K em Rh2 e Rh3, comparada com a área de menor salinidade (LS). Comparações entre amostragens apontaram que em Rh2 na área de maior salinidade (HS), quando ocorreu o maior valor significativo de salinidade (Tabela 2.1), não houve diferença no valor da banda K entre as amostragens, indicando que a estabilidade do CEO foi mantida mesmo em maior salinidade. Entretanto, para a área LS, não foi observado o efeito da salinidade sobre a estabilidade do CEO entre as amostragens Rh1, Rh2 e Rh3, uma vez que não apresentaram diferenças nos valores da banda K e, conseqüentemente, da estabilidade do CEO com a variação da salinidade. Contudo, a amostragem Rh4, apesar dos valores de salinidade não terem diferido daqueles obtidos para Rh2 na área LS, apresentou maior radiação luminosa e isto associado ao efeito da maior salinidade da estação pode ter favorecido o transporte de elétrons entre o CEO e a tirosina (Guha et al., 2013) e, assim, refletido na estabilidade do CEO.

Os resultados da diferença cinética  $\Delta V_{OI}$  exibiram curvas positivas para as duas áreas, isto sugere perturbações na redução do *pool* de plastoquinonas (PQ) (Tóth et al., 2007). A curva positiva mais acentuada na área HS sugere maior acúmulo de formas reduzidas de quinonas ( $Q_A$  e  $Q_B$ ), indicando alguma perturbação na redução das plastoquinonas e, conseqüentemente, comprometimento na redução dos aceptores no FSI (Figura 6).

Diferença cinética  $\Delta V_{IP}$  registrou curvas negativas em ambas as áreas (exceto nas amostragens Rh1 e Rh3 na área HS) (Figura 2.7). A fase I-P (30ms – 200 ms) refere-se desde a transferência de elétrons do FSII, a partir da plastoquinona reduzida ( $PQH_2$ ), até a redução dos aceptores finais do lado acceptor do FSI, isto é, ferredoxina, aceptores intermediários e NADP (Strasser et al., 2000; Tsimilli-Michael e Strasser, 2008; Yusuf et al., 2010, Kalaji et al., 2016). Desta forma, devido a maior amplitude negativa da curva, a redução dos aceptores finais de elétrons no lado acceptor do FSI parece ser menos eficiente na maior salinidade (plantas da área HS). Os maiores valores da IP-phase obtidos nas plantas crescendo na área LS (Figura 2.8D) sugerem maior atividade do FSI. Este aspecto é mantido quando se compara as amostragens e áreas, sendo que o valor da fase IP sempre foi maior na área LS. O aumento da atividade do FSI é uma importante estratégia à condição de estresse, favorecendo a formação do gradiente de prótons e a síntese de ATP, evitando a formação excessiva de  $NADPH_2$  e, conseqüentemente, a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Huang et al., 2012). Este mecanismo fisiológico permite a manutenção da atividade fotossintética em um ambiente de maior salinidade, acentuando a atividade do FSII em detrimento da atividade do FSI. Esta análise é respaldada quando se considera a salinidade, em que na área LS as plantas estão em condições mais amenas e em maior amplitude na variação da salinidade (entre 9 e 26, com média de 19), respondendo as estações secas e chuvosas, diferentemente do que se observa em HS onde a salinidade é mais elevada e com menor amplitude entre os níveis extremos, isto é, entre 18 a 36 com média de 30 (Tabela 2.1).

A fluorescência inicial ( $F_0$ ) representa a emissão de luz pelas moléculas de clorofila *a* excitadas antes da energia ser dissipada para o centro de reação do FSII (Krause and Weis, 1991), podendo ser alterada por estresses que causem alterações estruturais nos pigmentos fotossintéticos. Maiores valores de  $F_0$  obtidos em HS (Figura 2.9A) sugerem danos aos centros de reação do FSII (inativação da reação fotoquímica) ou interrupção da transferência da energia de excitação da antena para os centros de

reação de maneira eficiente. A amostragem Rh2, para a qual os maiores valores de salinidade foram registrados em ambas as áreas,  $F_0$  não diferiu entre as áreas, indicando menor eficiência da transferência de elétrons para os centros de reação com o estresse salino, ou pode estar ocorrendo a transferência reduzida de elétrons da  $Q_A^-$  para a  $Q_B$  pela inativação do fluxo de elétrons (Mathur et al., 2011). Consequentemente, ocorre maior gasto de energia para os indivíduos, resultando em dano à proteína D1, interferência no transporte de elétrons (Aro et al., 1993) e fotoinibição (Zlatev and Yordanov, 2004). Para outras espécies, como *Avicennia officinales* L. e *Heritiera fomes* Buch Ham, maiores valores de  $F_0$  foram obtidos sob influência da maior salinidade (Panda et al., 2006). Contudo, na área HS, apesar da salinidade não diferir estatisticamente (30,8 e 31,7, respectivamente, Rh1 e Rh4),  $F_0$  foi significativamente menor na última amostragem. Este resultado pode ser decorrente do maior tempo de exposição das plantas à salinidade elevada em Rh1 (Tabela 2.1), tanto no período seco quanto no chuvoso (devido à escassez pluviométrica nos anos anteriores, ver Figura 1.2, Capítulo 1).

Os menores valores de  $F_m$  registrados na área LS (Figura 2.9B) são indicativos de acúmulo de centros de reação inativos do PSII, prejudicando a transferência de elétrons para reduzir a  $Q_A^-$  (Kalaji et al., 2011), resultando no acúmulo resultando no acúmulo de  $P_{680}^+$ . Possivelmente estes danos ocorrem devido à redução de aceptores  $Q_A$  que pelo retardo no fluxo de elétrons através do FSII são incapazes de serem completamente reduzidos (Krause and Weis, 1991) como apontado em  $\Delta V_{OI}$  (Figura 2.6). A relação da salinidade entre as amostragens aponta para o acúmulo de centros de reações ativos (RCs) do FSII com o aumento da salinidade (Rh2) para as plantas crescendo na área HS. Na área LS, registros de RCs ativos e aptos para o transporte de elétrons foram maiores nas amostragens com salinidade intermediária e elevada (Rh1 e Rh2, respectivamente), mas, apesar da salinidade registrada para Rh4 não ter diferido da salinidade de Rh2, maior radiação luminosa foi observada em Rh4, que pode estar atuando como um inibidor da ativação do RCs. Contudo, não foram registrados os maiores valores de  $F_0$  concomitante com os registros de menor  $F_m$  nas plantas, fato que poderia levar à fotoinibição crônica e danos à proteína D1 (Aro et al., 1993; Zlatev and Yordanov, 2004), indicando que os possíveis danos provocados ao transporte de elétrons nas plantas de *R. mangle* crescendo em ambiente natural são reversíveis.

Os valores do rendimento quântico máximo do PSII (representado pelos valores da razão  $F_v/F_m$ ) foram alterados entre as áreas (Figura 2.9C). Os menores valores

observados para  $F_v/F_m$  na área LS (Rh3 e Rh4) indicam a ocorrência de retardo no fluxo de elétrons entre  $Q_A^-$  e  $Q_B$  (Oukarroum et al., 2015), resultante de danos e inativação dos RCs ativos associados ao FSII (Basu et al., 1998). Mudanças na relação  $F_v/F_m$  são atribuídas às mudanças na eficiência do ‘quenching’ não fotoquímico e valores entre 0,75 e 0,85 tem sido atribuído para plantas saudáveis (Bolhàr-Nordenkamp and Öquist 1993; Hunt, 2003). Valores abaixo desse intervalo seriam indicadores de estresses ambientais, em especial, de danos fotoinibitórios (Litchenthaler et al., 2005). No entanto estudo com plântulas de algumas espécies de mangue como *A. officinale* e *Heritiera fomes* (Panda et al., 2006) e *Rhizophora mucronata* Lam (Hoppe-Speer et al., 2011) em ausência de estresse apresentaram valores de  $F_v/F_m$  num intervalo entre 0,7 e 0,8, sendo que aqueles indivíduos considerados sob altas condições de estresse apresentaram valores de  $F_v/F_m$  em torno de 0,6. Os valores de  $F_v/F_m$  obtidos no presente estudo ainda estão dentro do intervalo das plantas de mangue fisiologicamente saudáveis, embora o rendimento quântico máximo do FSII tenha sido maior nas plantas da área mais salina. Diferenças entre amostragens foram observadas apenas na área Na área LS, a maior eficiência fotoquímica ocorreu na amostragem com salinidade intermediária (17,8 em Rh1), mas, foram menos eficientes em condições de salinidade baixa e alta. Este resultado sugere que as plantas, apesar de estarem crescendo em menor salinidade, estão mais susceptíveis aos efeitos da salinidade devido sua variação ao longo das estações e em suas amplitudes diárias.

Maiores valores da razão ABS/RC observados nas duas áreas pode ser decorrente do aumento de RCs inativos e do tamanho da antena (Yusuf et al., 2010), reduzindo o fluxo de energia (Figura 2.10A). Estes resultados indicam que a salinidade comprometeu a relação entre os complexos coletores de luz (ABS) e os RCs ativos do PS II (Oukarroum et al., 2015) nas duas áreas. Segundo Gomes et al. (2012), a relação dos RCs ativos estão relacionados com a conectividade energética entre as unidades do PSII (banda L). Os maiores valores da razão ABS/RC registrados na área LS, devido ao aumento no tamanho da antena dos RCs inativos, diminuiu a estabilidade dos RCs do FSII aspecto corroborado pelos resultados referentes a banda L em Rh3, para a qual os maiores valores foram registrados (Figura 2.8A). A redução do tamanho da antena em HS (Rh2 e Rh3) e em LS (Rh4) indicam que os RCs ativos estão aumentados, sendo transformados em centros redutores de  $Q_A^-$  ou o tamanho das antenas que fornece energia para os RCs ativos diminuiu, melhorando a passagem de energia para os RCs ativos (Redillas et al., 2011). Além disso, a presença da banda K pode indicar o

tamanho funcional da antena do FSII (Yusuf et al., 2010) e, no presente estudo, a banda K mais negativa registrada na amostragem Rh2 na área HS (Figura 2.8B) pode sugerir que ocorre a diminuição do tamanho da antena e a melhoria na passagem de energia para os RCs ativos, mesmo sob maior salinidade.

O fluxo de energia aprisionada ( $TR_0/RC$ ) que expressa a taxa pelo qual um éxciton é aprisionado pelo RC, resultando na redução da  $Q_A$  para a  $Q_A^-$  (Strasser et al., 2004; Redillas et al., 2011) foi maior na área LS em Rh2 e Rh3 e na área HS em Rh4 (Figura 2.10B). Este resultado aponta que a espécie apresenta eficiência para o fluxo de energia tanto em alta como em baixa salinidade. Nas plantas da área LS, apesar do aumento da absorção de energia registrado em Rh4 (Figura 2.6A), não houve o aprisionamento dessa energia e a resposta para essa diminuição na razão  $TR_0/RC$  pode ser efeito da maior incidência luminosa registrada nesta amostragem, desta forma a energia pode estar sendo dissipada e não aprisionada, como medida de proteção ao aparato fotossintético.

Maior valor do fluxo de energia transportada, representado por  $ET_0/RC$  observados na área LS durante Rh1, Rh2 e Rh3 e na área HS em Rh4 (Figura 2.10C) indicam maior eficiência no transporte de elétrons e uso eficiente da energia absorvida pelos RCs ativos, capazes de reduzir  $Q_A$  e promover o transporte de elétrons além da  $Q_A^-$  (Strasser et al., 2004). Diferenças no fluxo de energia para o transporte de elétrons também foram registrados entre as amostragens nas duas áreas. Melhores taxas de  $ET_0/RC$  foram observadas em Rh3 (salinidade baixa) em ambas as áreas (Figura 2.10C). Já as menores taxas de  $ET_0/RC$  foram obtidas nas coletas que apresentaram as salinidades mais elevadas ou as intermediárias, mostrando a influência da mesma no fluxo energético para o transporte de elétrons para redução da  $Q_A$  em ambas as áreas. Esta redução da taxa de  $ET_0/RC$ , particularmente sob alta salinidade, pode acionar processos de dissipação do excesso de energia luminosa a fim de reduzir o fotodano (Guha et al., 2013).

Maior valor de  $DI_0/RC$  nas plantas crescendo na área LS em Rh2 e Rh3 (Figura 2.10D) pode ser atribuído ao mecanismo de proteção da eficiência de absorção de energia do FSII e energia absorvida excessiva (Zushi and Matsuzoe, 2017). Estes resultados podem ser um indicador da capacidade da prevenção de danos ao aparato fotossintético (Öquist et al., 1992). No entanto, este aumento de  $DI_0/RC$  também pode estar associado ao acúmulo de RCs inativos (Kalaji et al., 2011) que não capturaram a energia absorvida em excesso o que resulta em aumentos na dissipação não fotoquímica

(calor) e redução do transporte de elétrons de maneira eficiente. Os valores de  $DI_0/RC$  foram constantes entre as amostragens na área HS. Porém, diferenças entre amostragens na área LS indicam menor  $DI_0/RC$  em Rh1, sugerindo maior eficiência de transporte de elétrons no FSII, uma vez que no mesmo período também foi registrado RCs ativos. No entanto, nesta área houve menor fluxo de energia de dissipação de calor ( $DI_0/RC$ ) sem o aumento da assimilação de  $CO_2$  (apresentado em maior detalhe no Capítulo 3), em relação à área HS no mesmo período. Este resultado sugere que a salinidade está comprometendo tanto a parte fotoquímica quanto a etapa química do ciclo de Calvin nos indivíduos amostrados na área LH.

$PI_{ABS}$  relaciona a eficiência de absorção, da captura e transferência de energia pelo FSII, proporcionando uma visão maior do efeito do estresse sobre a eficiência fotossintética das plantas (Gonçalves and Santos Jr, 2005). Entre as áreas LS e HS este parâmetro pouco variou, apresentando diferença apenas em Rh1, apontando melhor desempenho para as plantas em LS (Figura 2.11A). Comparações entre amostragens mostraram que em HS as plantas exibiram melhores desempenhos em salinidade baixa e menor desempenho em salinidade elevada. Em LS as plantas exibiram melhores desempenhos em salinidade intermediária e menor desempenho em salinidade elevada. Nota-se que o efeito da maior salinidade foi danoso em ambas as áreas, no entanto, salinidade entre 17,8 e 18,8 - consideradas aqui como intermediária para a área LS e baixa para a área HS (Tabela 2.1) - possibilitaram melhores condições de  $PI_{ABS}$ . Entretanto, redução do  $PI_{ABS}$  aliado ao menor valor de  $F_v/F_m$  (registrado em Rh2\_HS) indicam efeito de fotoinibição (Tach et al., 2007) e tais mudanças podem levar à perda de eficiência fotoquímica.

O parâmetro  $PI_{TOTAL}$ , por medir o desempenho fotoquímico desde os fótons absorvidos pelo FSII até a redução dos aceptores finais do FSI (Oukarroum et al., 2015), é considerado como um dos parâmetros mais sensíveis para medir a eficiência quântica do FSII (Smit et al., 2009). Além disso, está intimamente relacionado com o resultado final da atividade produtiva da planta, como crescimento ou sobrevivência em condições de estresse (Yusuf et al., 2010). Os resultados obtidos neste estudo mostraram que as plantas da área LS (Figura 2.11B) apresentaram maior  $PI_{TOTAL}$ , apesar de terem apresentado diminuição de RCs ativos, atividade fotoquímica e maiores valores de banda K e L (Figuras 2.8A e 2.8B). Neste caso, o aumento do índice de desempenho total (que mede a vitalidade da planta) representa o incremento da eficiência da redução dos aceptores finais do FSI, corroborando com o resultado da fase I-P (Figura 2.8D),

mostrando que nas plantas da área de menor salinidade (LS) há uma maior atividade do FSI. Comparações entre amostragens exibiram melhores desempenhos para as plantas avaliadas em salinidade baixa ou intermediária, em ambas as áreas. Em contraste, menor  $PI_{TOTAL}$  foi registrado nas amostragens de maior salinidade, fator que pode levar à ineficiência na formação de ATP e NAPH como aceptores finais na fase fotoquímica da fotossíntese, uma vez que a atividade lenta da redução dos aceptores finais do FSI é considerado como consequência de um menor requisito de redutores, possivelmente ligado à diminuição da assimilação de  $CO_2$ .

## 2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados aqui apresentados podemos concluir que o transporte de elétrons em plantas de *Rhizophora mangle* é influenciado pela salinidade.

Ficou evidente que estas plantas apresentam mecanismos para tolerar o aumento da salinidade, uma vez que as plantas da área de maior salinidade exibiram mais RCs ativos, maior atividade fotoquímica, assim como melhor conectividade energética entre as antenas e os RCs do FSII (banda L) e eficiência na transferência de elétrons entre o CEO e o lado acceptor do FSII (banda K).

Contudo, os resultados obtidos para  $PI_{ABS}$  e  $PI_{TOTAL}$  evidenciam menor índice de desempenho para as plantas na maior salinidade comprometendo a redução dos aceptores no FSI e a produção de NADPH e ATP, necessários à fase fotoquímica. Os maiores valores de  $PI_{TOTAL}$  e da fase IP nas plantas da área de menor salinidade indicam melhor eficiência da redução dos aceptores finais do FSI, sugerindo maior atividade do FSI, uma importante estratégia à condição de estresse.

Assim, os resultados mostraram que apesar das plantas estarem crescendo em uma área de menor salinidade, a maior variação salina ao longo das estações seca e chuvosa na área LS, também acarretou estresse fotoquímico com relação ao transporte de elétrons no lado acceptor do FSII.

## 2.6 REFERÊNCIAS

Aro, E.M., Virgin, I., Andersson, B., 1993. Photoinhibition of photo system II. Inactivation Protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1143, 113-134.

Baker, N.R., 2008. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. Annual Review of Plant Biology. 59, 89–113. [10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759)

Baker, N.R., Rosenqvist, E., 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. Journal of Experimental Botany. 55, 1607-1621.

Ball, M.C., 1988. Ecophysiology of mangroves. Trees. 2, 129-142.

Barr, J.G., Fuentes, J.D., Engel, V., Zieman, J.C., 2009. Physiological responses of red mangroves to the climate in the Florida Everglades. Journal of Geophysical Research. 114, 1-13.

Basu, P.S., Sharma, A., Sukumaran, N.P., 1998. Changes in net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in potato leaves induced by water stress. Photosynthetica 35, 13–19.

Bolhàr-Nordenkampf, H.R., Öquist, G.O., 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. – In: Hall D.O., Scurlock J.M.O., Bolhàr-Nordenkampf H.R. *et al.* (ed.): Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual Pp. 193-206. Chapman e Hall, London 1993.

De Ronde, J.A.; Cress, W.A.; Krüger, G.H.J.; Strasser, R.J.; Van Staden, J., 2004. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* *P5CR* gene, during heat and drought stress. Journal of Plant Physiology, 161,1211–1224.

Desotgiu, R., Pollastrini, M., Cascio, C., Gerosa, G., Marzuoli, R., Bussotti, F., 2013. Responses to ozone on Populus “Oxford” clone in an open top chamber experiment assessed before sunrise and in full sunlight. Photosynthetica. 51, 267–280. <https://doi.org/10.1007/s11099-012-0074-y>

Falqueto, A.R., Silva, D.M., Fontes, R.V., 2008. Photosynthetic performance of mangroves *Rhizophora mangle* and *Laguncularia racemosa* under field conditions. Revista Árvore. 32(3), 577-582.

Gomes, M.T.G., Luz, A.C., Santos, M.R., Batitucci, M.C.P., Silva, D.M., Falqueto, A.R., 2012. Drought tolerance of passion fruit plants assessed by the OJIP chlorophyll *a* fluorescence transient. Scientia Horticulturae. 142, 49–56.

Gonçalves, J.F.C., Santos JR., U.M., 2005. Utilization of the chlorophyll *a* fluorescence technique as a tool for selecting tolerant species to environments of high irradiance. Brazilian Journal Plant Physiology. 17, 307-313.

Goussi, R, Manaa, A., Derbali, W., Cantamessa, S., Abdelly, C., Barbato, R., 2018. Comparative analysis of salt stress, duration and intensity, on the chloroplast ultrastructure and photosynthetic apparatus in *Theilingiella salsuginea*. [J Photochem Photobiol B](#). 183, 275-287. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.04.047. Epub 2018 May 2.

Guha, A., Sengupta, D., Reddy, A.R., 2013. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence kinetics and leaf protein analyses to track dynamics of photosynthetic performance in mulberry during progressive drought. *J Photochem Photobiol B*. 119, 71–83

Hao, G., Jones, T.J., Luton, C., Zhang, Y.J., Manzane, E., Scholz, F.G., Bucci, S.J., Cao, K.F., Goldstein, G., 2009. Hydraulic redistribution in dwarf *Rhizophora mangle* trees driven by interstitial soil water salinity gradients: impacts on hydraulic architecture and gas exchange. *Tree Physiol.* 29, 697–705. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpp005>

Hoppe-Speer, C.L., Adams, J.B., Rajkaran, A., Bailey, D., 2011. The response of the red mangrove *Rhizophora mucronata* Lam. to salinity and inundation in South Africa. *Aquatic Botany*. 95, 71-76.

Huang, W., Yang, S-J., Zhang, S-B., Zhang, J-L., Cao, K-F., 2012. Cyclic electron flow plays an important role in photoprotection for the resurrection plant *Paraboea rufescens* under drought stress. *Planta*. 235 (4), 819-828. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1544-3>

Hunt, S., 2003. Measurements of photosynthesis and respiration in plants. *Physiologia Plantarum*. 117, 314–325. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00055.x>

Jithesh, M.N., Prashanth, S.R., Sivaprakash, K.R. et al., 2006. Monitoring expression profiles of antioxidant genes to salinity, iron, oxidative, light and hyperosmotic stresses in the highly salt tolerant grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. by mRNA analysis. *Plant Cell Rep.* 25(4), 865–876. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0127-4>

Kalaji, H.M., Govindjee, Bosa, K., Koscielniak, J., Zuk-Golaszewskae, K., 2011. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO<sub>2</sub> assimilation of two Syrian barley landraces. *Environmental and Experimental Botany*. 73, 64–72.

Kalaji, H.M., Jajoo, A., Oukarroum, Marian Brestic, M., Marek Zivcak. M., Izabela A. SamborskHS, I.A., et al., 2016. Chlorophyll *a* fluorescence as a tool to

monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*. 38, 102. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2113-y>

Krause, G.H., Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42, 313–349.

Krauss, K.W., Allen, J.A., 2003. Influence of salinity and shade on seedling photosynthesis and growth of two mangrove species *Rhizophora mangle* and *Bruguiera sexangula*, introduced to Hawaii. *Aquatic Botany*. 77(4), 311–324.

Lichtenthaler, H.K., Langsdorf, G., Lenk, S., Buschmann, C., 2005. Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system. *Photosynthetica*. 43, 355-369. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0060-8>

Mathur, S., Mehta, P., Jajoo, A., Bharti, S., 2011. Analysis of elevated temperature induced inhibition of Photosystem II using Chl a fluorescence induction kinetics. *Plant Biology*. 13, 1–6.

Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51(345), 659 – 668.

Medina, E., García, V., Cuevas, E., 1990. Sclerophylly and oligotrophic environments: relationships between leaf structure, mineral nutrient content and drought resistance in tropical rain forests of the upper Rio Negro Region. *Biotropica*. 22, 51–64.

Naidoo, G., 2010. Ecophysiological differences between fringe and dwarf *Avicennia marina* mangroves. *Trees*. 24, 667-673.

Naidoo, G., Hiralal, O., Naidoo, Y., 2011. Hypersalinity effects on leaf ultrastructure and physiology in the mangrove *Avicennia marina*. *Flora*. 206, 814-820.

Öquist, G., Chow, W.S., Anderson, J.M., 1992. Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of photosystem II. *Planta*. 186, 450-460.

Oukarroum, A., Bussotti, F., Goltsev, V., Kalaji, H.M., 2015. Correlation between reactive oxygen species production and photochemistry of photosystems I and II in *Lemna gibba* L. plants under salt stress. *Environ Exp Bot*. 109, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.08.005>

Oukarroum, A., Madidi, S.E.L, Schansker, G., Strasser, R.J. 2007. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany*. 60, 438–446.

Oukarroum, A., Schansker, G., Strasser, R.J., 2009. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiology Plant.* 137, 188-199.

Panda, D., Dash, P.K., Dhal, N.K., Rout, N.C., 2006. Chlorophyll fluorescence parameters and chlorophyll content in mangrove species grown in different salinity. *General and Applied Plant Physiology.* 32(3-4), 175-180.

Papageorgiou, G.C., Murata, N., 1995. The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving Photosystem II complex. *Photosynthesis Research.* 44, 243–252.

Parida, A.K., Das, A.B., Mitra, B., 2003. Effects of NaCl stress on the structure, pigment complex, composition, and photosynthetic activity of mangrove *Bruguiera parviflora* chloroplasts. *Photosynthetica.* 41(2) 191-200.

Parida, A.K., Das, A.B., Mohanty, P., 2004. Investigations on the antioxidative defence responses to NaCl stress in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential regulations of isoforms of some antioxidative enzymes. *Plant Growth Regul.* 42, 213–226. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000026508.63288.39>

Petkova, V., Denev, I.D., Cholakov, D., Porjazov, I. 2007. Field screening for heat tolerant common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) by measuring of chlorophyll fluorescence induction parameters. *Sci. Hortic.* 111, 101-106.

Popp, M., Larher, F., Weigel, P., 1985. Osmotic adaptation in Australian mangroves. *Vegetatio.* 61, 247–253.

Redillas, M.C.F.R., Strasser, R.J., Jeong, J.S., Youn Shic Kim, Y.S., Kim, J-K., 2011. The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing *OsNAC10*. *Plant Biotechnol Rep.* 5, 169-175. <https://doi.org/10.1007/s11816-011-0170-7>

Rong-Hua, L., Pei-guo, G., Baum, M., Grando, S., Ceccarelli, S., 2006. Evaluation of Chlorophyll Content and Fluorescence Parameters as Indicators of Drought Tolerance in Barley. *Agric. Sci. Chin.* 5, 751–757. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(06\)60120-X](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(06)60120-X)

Schansker, G., Tóth, S.Z., Strasser, R.J., 2005. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1706, 250– 261.

Scholander, P.F., 1968. How mangrove desalinated water. *Physiol Plant*. 21, 251-261. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1968.tb07248.x>

Smit, M.F., Van Heerden, P.D.R., Pienaar, J.J., Weissflog, L., Strasser, R.J., Krüger, G.H.J., 2009. Effect of trifluoroacetate, a persistent degradation product of fluorinated hydrocarbons, on *Phaseolus vulgaris* and *Zea mays*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47, 623-634.

Sobrado, M.A., Ball, M.C., 1999. Light use in relation to carbon gain in the mangrove, *Avicennia marina*, under hypersaline conditions. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26, 245– 251.

Srivastava, A., Guissé, B., Greppin, H., Strasser, R.J. 1997. Regulation of antenna structure and electron transport in photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probe by fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1320, 95-106.

Stirbet, A., Govindjee, 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and PhotoBiology*. 104 (1-2), 236-257. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010>

Strasser, A., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A., 2004. Analysis of the fluorescence transient, in: Papageorgiou, G. C.; Govindjee (eds.), *Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis*. *Advances in Photosynthesis and Respiration Series*. Springer, Dordrecht, 32-362.

Strasser, B., 1997. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. *Photosynthesis Research*. 52, 147-155.

Strasser, R.J., Srivasatava, A., Govindjee, 1995. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*. 61, 32-34.

Strasser, R.J., Stirbet, A.D., 2001. Estimation of the energetic connectivity of PS II centres in plants using the fluorescence rise O-J-I-P. Fitting of experimental data to three diferente PS II models. *Mathematics and Computers in Simulation*. 56, 451–461.

Strasser, R.J., Strasser, B.J., 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test. In: Mathis, P. (Ed.), *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, V. Kluwer Academic Publishers, Dordreche, NL, 977–980.

Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M., 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples.

M. Yunus, U. Pathre, P. Mohanty (Eds.), Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation, Taylor & Francis Publishers, London, pp. 445-483

Takemura, T., Hanagata, N., Sugihara, K., Baba, S., Karube, I., Dubinsky, Z. 2000. Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorhiza*. *Aquatic Botany*. 68, 15–28.

Thach, L.B., Shapcott, A., Schmidt, S., Critchley, C., 2007. The OJIP fast fluorescence rise characterizes Graptophyllum species and their stress responses. *Photosynthesis Research*. 94, 423-436.

Tomek, P., Lazár, D., Ilík, P., Naus, J., 2001. On intermediate steps between the O and P steps in chlorophyll a fluorescence rise measure at different intensities of exciting light. *Australian Journal Plant Physiology*. 28, 115-1160.

Tóth, S.Z., Schansker, G., Strasser, R.J., 2007. A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient. *Photosynthesis Research*. 93, 193–203.

Tsimilli-Michael, M., Strasser, R.J., 2008. In vivo assessment of plants' vitality: applications in detecting and evaluating the impact of Mycorrhization on host plants. In: Varma A (ed), *Mycorrhiza*, pp. 679-703. Springer, Berlin Heidelberg.

Tuteja, N., 2007. Chapter twenty-four-mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol*. 428, 419–438. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28024-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28024-3)

Watzka, M., Medina, E., 2018. Mangroves in Contrasting Osmotic Environments: Photosynthetic Costs of High Salinity Tolerance, *Photosynthesis*, Juan Cristóbal García Cañedo and Gema Lorena López Lizárraga, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.74750. Disponible en <https://www.intechopen.com/books/photosynthesis-from-its-evolution-to-future-improvements-in-photosynthetic-efficiency-using-nanomaterials/mangroves-in-contrasting-osmotic-environments-photosynthetic-costs-of-high-salinity-tolerance>

Yordanov, I., Velikova, V., Tsonev, T., 2000. Plant Responses to Drought, Acclimation, and Stress Tolerance. *Photosynthetica*. 38, 171-186. <https://doi.org/10.1023/A:1007201411474>

Yusuf, M.A., Kumar, D., Rajwanshi, R., Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Govindjee, Sarin, N.B., 2010. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and

chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1797, 1428–1438.

Zhang, T, Gong, H., Wen, X., Lu, C., 2010. Salt stress induces a decrease in excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but an increase to photosystem I in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J Plant Physiol*. 167(12), 951-958. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.12.020>

Zlatev, Z.S., Yordanov, I.T., 2004. Effects of soil drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in bean plants. *Bulg. Journal of Plant Physiology*. 30 (3-4), p. 3-18.

Zushi, K., Matsuzoe, N., 2017. Using of chlorophyll a fluorescence OJIP transients for sensing salt stress in the leaves and fruits of tomato. *Scientia Horticulturae*. 219, 216-221.

## CAPÍTULO 3

### TROCAS GASOSAS EM PLANTAS JOVENS DE *Rhizophora mangle* (L.) SOB DIFERENTE SALINIDADE EM CONDIÇÕES DE CAMPO

#### RESUMO

Este trabalho buscou avaliar a eficiência fotossintética, a partir da determinação das trocas gasosas e índice de clorofila *a* em indivíduos jovens de mangue *Rhizophora mangle* L. crescendo em condições similares de inundação e contrastante de salinidade no Estuário do Rio São Mateus. O estudo foi realizado em duas florestas de manguezal na área HS de maior salinidade e na área LS de menor salinidade, conduzidos em abril e setembro de 2016 e março e setembro de 2017. As quantificações dos dados foram realizadas em cinco folhas de indivíduos jovens e as coletas foram. Os valores da salinidade apresentaram diferença entre as áreas em todas as amostragens sendo sempre maior em HS. A taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (*A*), condutância estomática (*gs*), transpiração foliar (*E*), eficiência intrínseca do uso da água (*A/gs*) e clorofila *a* foram maiores na área LS. Na área de maior salinidade HS as plantas registraram os maiores valores de eficiência instantânea do uso da água (*A/E*). Na área de maior salinidade (HS) na segunda amostragem foi registrado menor *A* e *gs*, de tal modo, a menor taxa de *gs* limitou o influxo de CO<sub>2</sub>, conseqüentemente reduzindo as taxas de assimilação. Contudo, os resultados apontaram diminuição na eficiência fotossintética para plantas de *R. mangle* da área LS sob aumento da salinidade. Os índices de clorofila não foram interferidos pela salinidade, uma vez que não foram observadas relação efetiva entre a salinidade e os resultados de clorofila *a* e clorofila *b*, seja entre áreas ou amostragens. Caso os níveis de salinidade sejam alterados, plantas de *R. mangle* poderão sentir os efeitos do aumento da salinidade no estuário do rio São Mateus e seja assim refletido na floresta adulta.

**Palavras-chaves:** Índice de clorofila, uso da água, manguezal

#### 3.1 INTRODUÇÃO

O ecossistema manguezal forma uma comunidade única distribuída ao longo das linhas costeiras e planícies de maré, crescendo em condições de salinidade muito variadas, desde água doce até acima da salinidade da água do mar. (Takemura et al, 2000; Sobrado, 2005; Naidoo, 2010; Chen and Ye, 2014). De acordo com Giri et al. (2010), em todo o mundo as florestas de mangue ocupam 137,760 km<sup>2</sup>, e estão entre os ecossistemas mais produtivos. Uma das características ecológicas mais importantes dos manguezais é o seu papel na proteção da linha de costa à erosão de te provocada por ondas e tempestades (Alongi, 2014; Barbier, 2016). Além disso, são considerados importantes componentes das cadeias alimentares detriticas, habitats e viveiro de

alimentação para uma grande diversidade de invertebrados e espécies de peixes. (Takemura et al, 2000; Nagelkerken and Velde, 2004, Duke et al., 2005).

O funcionamento dos manguezais é regido por forçantes ambientais que exercem uma forte influência sobre o balanço de carbono e na forma de crescimento de espécies de mangue (Barr et al., 2009), sendo a salinidade o principal estressor e regulador de seu desenvolvimento e produtividade. (Medina et al., 1990; Sobrado and Ball, 1999). Zhu et al. (2014|), reportou que na planta de mangue da família Rhizophoracea *Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Lam. a expressão da proteína ribulose-1 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) foi regulada partir da concentração de sal concentração de sal entre os tratamentos. Vários estudos de campo e em condições controladas mostraram que no geral a variação da salinidade reduziz a taxa fotossintética (*A*) em *Rhizophora mangle* L. (Hao et al., 2009; Bompuy et al., 2014), *Rhizophora mucronata* Lam. (Hoppe-Speer et al., 2011), *B. gymnorrhiza* (Zhu et al., 2012) bem como em *Excoecaria agalocha* L. (Chen and Ye, 2014), em paralelo com a taxa de transpiração foliar (*E*) (Chen and Ye 2014) e condutância estomática em (*gs*) (Hao et al., 2009; Chen and Ye 2014). Além disso, mudanças na salinidade podem resultar em estresse oxidativo com consequente acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) causando inibição da fotossíntese (ou fotoinibição), declínio da fixação de CO<sub>2</sub> e danos celulares, uma vez que o aumento da exposição ao estresse de NaCl causou declínio nos níveis de expressão dos genes antioxidantes *Cat11* (*catalase*) e *Fer1* (*ferritin*), com reportado por Jithesh et al. (2006) para a espécie de mangue *A. marina*. Porém, para a maioria das espécies de mangue, o crescimento é estimulado por níveis moderados de sal ( $\approx 8,7$  a  $17,5$ ) ao passo que níveis altos (a cima de 35) ou a ausência de sal o inibem (Ball, 1988; Takemura et al., 2000; Parida et al., 2004).

As condições de salinidade constante tendem a ser fisiologicamente menos exigentes do que à exposição flutuante do sal, devido ao alto custo energético (Krauss et al., 2008) exigido pelos mecanismos de ajustes osmóticos e iônicos. Flutuações da salinidade do solo ocorrem devido à inundação das marés ao longo do dia, à precipitação ao longo do ano, e a temperatura que leva à evaporação da água da superfície do solo (Hutchings and Saenger, 1987; Dassanayake et al., 2009; Lovelock et al., 2017). No entanto, para lidar com as variações de salinidade, as plantas evoluíram uma sofisticada sinalização e processos metabólicos de resposta ao sal, incluindo o ajustamento da fotossíntese e mecanismos de exclusão do sal (Tuteja, 2007) bem como mecanismos morfológicos e fisiológicos para a absorção de água sob baixo potencial

hídrico do solo (Naidoo et al., 2002). Estes ajustes fisiológicos vão refletir no maior desenvolvimento vegetal e eficiência do uso da água (WUE). Em *R. mangle* o WUE melhorou a tolerância ao sal, no entanto diminuindo sua capacidade fotossintética, que assim pode refletir no desempenho ecofisiológico sob aumento salino (Lin and Sternberg 1992; Hao et al. 2009). Avaliar estes processos elucidam a tolerância das espécies de mangue em resposta à salinidade, haja vista que estudos em diferentes condições salinas já indicaram que estas plantas tiveram alterações em suas performances fotossintéticas (Sobrado and Ball, 1999; Lovelock and Feller, 2003; Li et al., 2008; Naidoo et al., 2011; Dangremond et al., 2015). Além disso, a exposição prolongada a condições de estresse como salinidade e luminosidade pode resultar na foto-oxidação das clorofilas, que pode levar a morte do indivíduo. Uma vez que esses pigmentos são responsáveis pela conversão da energia luminosa em energia química, na forma de ATP e NADPH, e estão vinculadas à eficiência fotossintética, que é refletido no seu crescimento (Taiz and Zeiger, 2009). Desta forma, a determinação da concentração dos pigmentos representa importante ferramenta para estudos ecofisiológicos (Lambers et al., 1998).

*Rhizophora mangle* cresce em zonas costeiras salinas do Leste do Pacífico e Atlântico (Duke, 1992) apesar de se desenvolver bem em água doce (Hao et al., 2009). A espécie se destaca na linha de costa brasileira (Schaeffer-Novelli et al., 1990) assim como ao longo da linha de costa do Espírito Santo (Brasil) (Silva et al., 2005; Petri et al., 2011) em áreas sob influência marinha e água doce. Esta espécie exclui sal por ultrafiltração, que ocorre nas membranas das células da raiz (Scholander, 1968). Em consideração ao seu papel ecológico no ecossistema, estudos sobre as estratégias fisiológicas apresentadas por *R. mangle* para manter o crescimento e o desenvolvimento em um ambiente extremo, caracterizado pela variação diária na salinidade, a partir da flutuação diária da maré, altas temperaturas, luminosidade e precipitação são necessários para uma melhor compreensão da ecofisiologia dos manguezais. Tais informações sobre as respostas específicas da espécie à salinidade seriam úteis para entender os fatores que influenciam a dominância dos manguezais de *R. mangle* ao longo da costa ES.

Desta forma, o presente estudo aborda a seguinte questão: Como a variação da salinidade alteram os processos fotossintéticos em *R. mangle* crescendo em condições de campo? Para responder esta questão foi avaliada a eficiência fotossintética, pela técnica de trocas gasosas e conteúdo de clorofila em plantas de *Rhizophora mangle*

crescendo em condições similares de inundação e distintas de salinidade no Estuário do Rio São Mateus. Assim, este estudo in situ, envolvendo os processos transporte de elétrons e assimilação de CO<sub>2</sub> em diferentes salinidades, permitirá melhor compreensão dos mecanismos fotossintéticos que influenciam a dominância da espécie *R. mangle* ao longo da costa do Espírito Santo.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Área de Estudo**

Vide capítulo 2

### **3.2.2 Amostragem**

Para as medições de trocas gasosas e índice de clorofila definiu-se um padrão de amostragem, consistindo na quantificação dos dados em cinco folhas completamente expandidas, sem indícios de senescência. Para atender a este padrão, foram amostradas as folhas do segundo par a partir do ápice para a base do ramo ao acaso. Estas réplicas foram obtidas em doze indivíduos jovens (amostras) com até 2 metros de altura de *R. mangle* selecionados no interior das florestas.

As coletas foram conduzidas em abril e setembro de 2016 (denominadas ao longo do trabalho como primeira e segunda amostragem, respectivamente) e março e setembro de 2017 (denominadas ao longo do trabalho como terceira e quarta amostragem, respectivamente). Para a identificação da espécie em cada área (área LS de menor salinidade e área HS de maior salinidade) por amostragem definiu-se as seguintes terminologias: Rh1 referem-se à primeira amostragem e Rh2 à segunda amostragem, Rh3 à terceira amostragem e Rh4 à quarta amostragem. Todas as coletas foram realizadas em dias de céu claro sem nuvens. Cada amostragem envolveu dois dias de campo, sendo um dia para cada área. Os dados entre as áreas foram obtidos nos mesmos horários no período da manhã para padronizar e evitar que houvesse variação de radiação luminosa recebida por cada floresta.

### **3.2.3 Trocas Gasosas**

Para esta etapa da avaliação de produção primária foi utilizado medidor portátil de fotossíntese (IRGA) modelo LCi (ADC, Bio Scientific Ltd. Hoddesdon, England). As medições foram realizadas em folhas de *R. mangle* (Amostragem). Os seguintes

parâmetros foram analisados: Assimilação de CO<sub>2</sub> (A) em  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; Condutância estomática (gs) em  $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; Transpiração foliar (E) em  $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; Temperatura foliar (T) em °C; Concentração interna de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) em  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; Intensidade luminosa incidente sobre a superfície foliar (Q<sub>leaf</sub>) em  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ . A estimativa da eficiência do uso da água (WUE  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$ ) foi calculada e determinada como: eficiência intrínseca do uso da água – WUE int (A/gs) (Sobrado, 2005) e eficiência instantânea do uso da água – WUE ins (A/E) (Krauss et al., 2006).

As medições de trocas gasosas foram realizadas no período entre 08:00 e 11:00 horas.

### 3.2.4 Índice de clorofila

Inicialmente, as medidas do índice de clorofila foram feitas com medidor eletrônico portátil, no período entre 08:00 e 11:00 horas. (ClorofiLOG, modelo CFL 1030, Falker). Para isso, em cada folha de *R. mangle* (conforme descrito em amostragem) foram realizadas três leituras na lâmina foliar, em áreas diferentes. O equipamento fornece o índice de clorofila *a*, *b* e totais. Posteriormente, foram calculadas a média das três leituras por folha e a razão clorofila *a/b*.

### 3.2.5 Salinidade

Vide capítulo 2

### 3.2.6 Análise Estatística

Os valores de salinidade, parâmetros das trocas gasosas e índice da clorofila foram analisados estatisticamente por Kruskal-Wallis ANOVA, para determinar diferenças entre áreas (HS x LS) e amostragens. Diferenças entre as medianas também foram avaliadas segundo Kruskal-Wallis, em que o valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 3.3 RESULTADOS

### 3.3.1 Salinidade

A salinidade diferiu entre as áreas estudadas em todas as amostragens e foi maior em HS (Tabela 3.1). No entanto, a comparação entre as amostragens revelou menores valores de salinidade em Rh3 nas duas áreas estudadas (18,8 e 9,44 para HS e

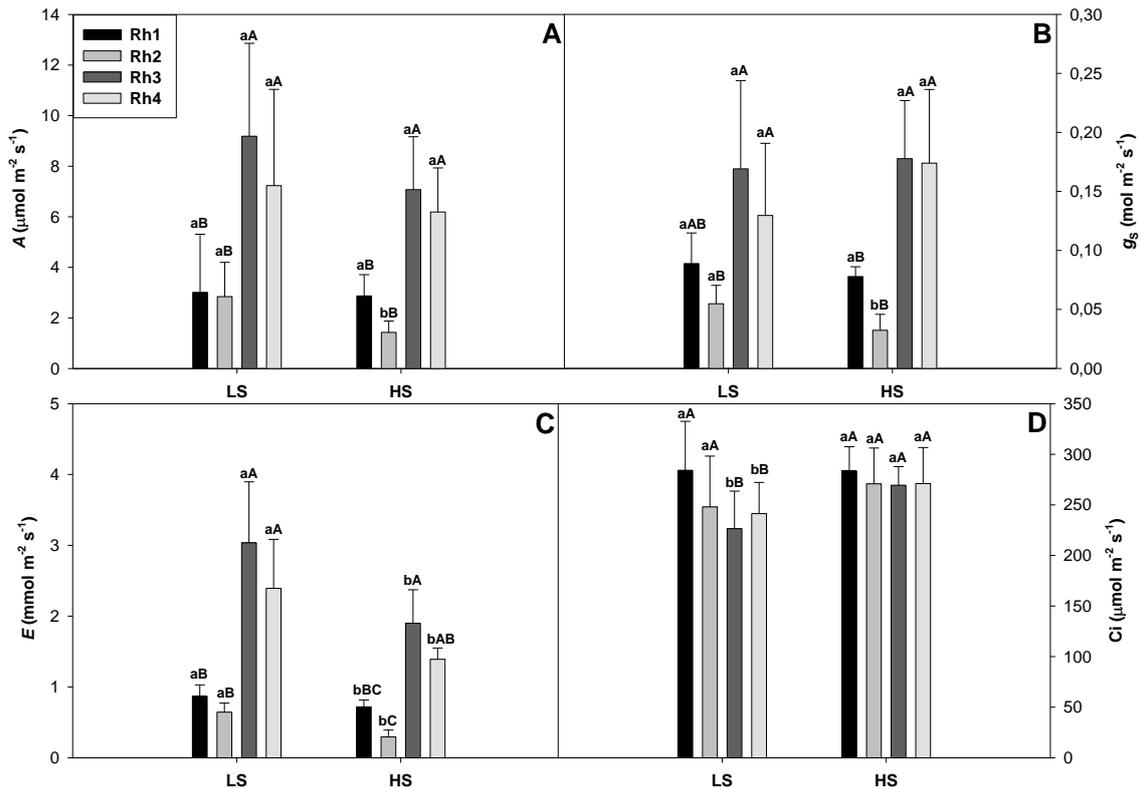
LS, respectivamente). Em HS, o maior valor de salinidade (36,5) foi registrado durante Rh2 enquanto para a área LS os maiores valores foram amostrados em Rh2 e Rh4 (25,5 e 26,01, respectivamente). Em HS, valores intermediários de salinidade foram obtidos durante Rh1 e Rh4 (30,8 e 31,7, respectivamente) enquanto na área LS salinidade intermediária foi observada em Rh1 (17,8).

**Tabela 3.1.** Dados mensais de salinidade monitorados entre abril de 2016 a setembro de 2017 nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade). Os dados são apresentados como valores mínimo, máximo e média ( $n = 4$ ). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre áreas são destacadas por (\*), dados em negrito correspondem aos meses de amostragens da fluorescência e trocas gasosas.

Áreas/Amostragem	LS/2016			HS/2016			LS/2017			HS/2017		
	Min.	Máx.	Média	Min.	Máx.	Média	Min.	Máx.	Média	Min.	Máx.	Média
JAN	-	-	-	-	-	-	5,4	15,2	10,6	8,2	27	14,6
FEV	-	-	-	-	-	-	7,7	15,6	12,2	18,4	23,6	21,9*
MAR (Rh4)	-	-	-	-	-	-	<b>7,3</b>	<b>11,3</b>	<b>9,4</b>	<b>17,7</b>	<b>20</b>	<b>18,8*</b>
ABR (Rh1)	<b>17,2</b>	<b>18,2</b>	<b>17,8</b>	<b>30,3</b>	<b>31,3</b>	<b>30,8</b>	10,1	16,2	13,2	21,2	24,6	23*
MAI	18,4	18,9	18,6	30,1	31,2	30,7	8	9,2	8,5	17,8	19,8	18,5*
JUN	17,8	18,5	18,1	28,6	28,9	28,8*	9,9	11,5	10,8	17,3	23,6	19,4*
JUL	12,5	17,8	15,3	23,3	28,2	26,8*	15,1	22,1	20	25,7	33,5	30*
AGO	24,4	24,9	24,6	27,4	32,4	29,7*	21,3	26,4	24,9	26,7	32,8	29,8
SET (Rh2 e Rh3)	<b>23,9</b>	<b>27</b>	<b>25,5</b>	<b>34,5</b>	<b>38,6</b>	<b>36,5*</b>	<b>24,6</b>	<b>26,6</b>	<b>25,7</b>	<b>29</b>	<b>37</b>	<b>31,7*</b>
OUT	22,8	28,5	25,3	32,3	36,4	34,2*	-	-	-	-	-	-
NOV	3,2	6,8	5,1	9,5	13,7	12*	-	-	-	-	-	-
DEZ	1,6	5,9	3,8	11,6	15,7	13,3*	-	-	-	-	-	-

### 3.3.2 Trocas Gasosas

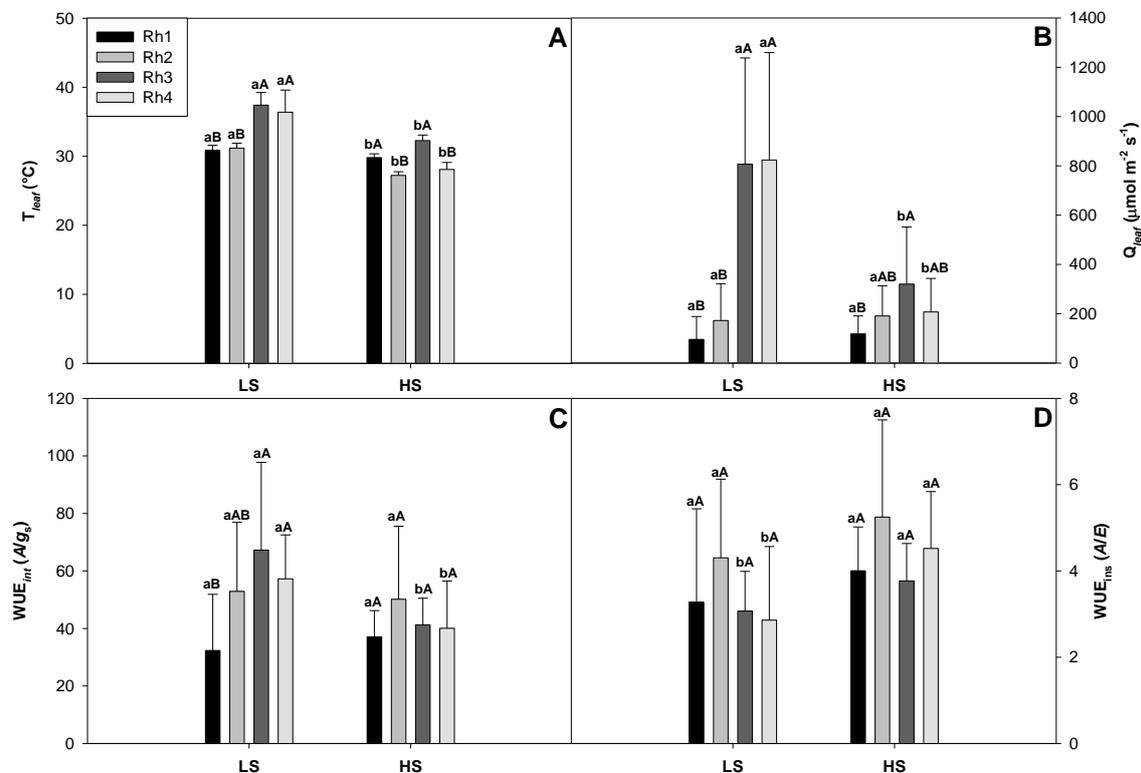
A taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ) diferiram entre áreas apenas em Rh2, com maiores valores obtidos em LS ( $p = 0,013$ ) (Figura 3.1A- B). Maiores valores de  $A$  e  $g_s$  ocorreram em Rh3 e Rh4. Por outro lado, os valores de  $g_s$  obtidos em Rh1 na área LS não diferiu significativamente de Rh2, Rh3 e Rh4 (Figura 3.1B). A transpiração foliar ( $E$ ) diferiu entre as áreas em todas as amostragens, e, similarmente aos resultados obtidos para  $A$  e  $g_s$ , foram maiores em LS (Figura 1C) principalmente para Rh3 ( $p = 0,001$ ) e Rh4 ( $p = 0,0002$ ). Para a área HS, os maiores valores de  $E$  ocorreram em Rh3 e Rh2. A concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) diferiu entre as áreas durante as amostragens Rh3 ( $p = 0,004$ ) e Rh4 ( $p = 0,04$ ), sendo maiores em HS (Figura 3.1D). Comparações entre amostragens diferiram apenas em LS, onde os maiores valores foram registrados em Rh1 e Rh2.



**Figura 3.1.** Parâmetros médios ( $\pm$  desvio padrão) das trocas gasosas (N = 12) obtidos de plantas de *Rhizophora mangle* (Rh1, Rh2, Rh3 e Rh4) nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade) em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (Rh3) e setembro de 2017 (Rh4). **A**) Assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) em  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , **B**) condutância estomática ( $g_s$ ) em  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , **C**) Transpiração ( $E$ ) em  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , **D**) Concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) em  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Médias diferem estatisticamente pelo teste de *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam comparações entre áreas diferentes (HS e LS). Letras maiúsculas reportam comparações entre amostragem em uma mesma área.

A temperatura foliar ( $T_{\text{leaf}}$ ), assim como  $E$ , diferiu significativamente entre as áreas em todas as amostragens, com os maiores valores obtidos LS (Figura 3.2A). A intensidade luminosa incidente sobre a superfície foliar ( $Q_{\text{leaf}}$ ) foi maior em LS e diferiu entre as áreas em Rh3 ( $p = 0,001$ ) e Rh4 ( $p = 0,001$ ) (Figura 3.2B). Comparações entre amostragens distinguiram maior valor de  $Q_{\text{leaf}}$  em Rh3 e Rh4 e menor valor em Rh1 em ambas as áreas. Rh2 não diferiu entre as amostragens em HS, mas foi menor entre as amostras em LS. A eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ) também diferiu entre as áreas em Rh3 ( $p = 0,004$ ) e Rh4 ( $p = 0,02$ ), permanecendo maior em LS (Figura 3.2C). Comparações entre amostragens mostram diferenças apenas em LS, registrando maiores valores de  $A/g_s$  em Rh3 e Rh4 e menor em Rh1. Por outro lado, os valores da eficiência instantânea do uso da água ( $A/E$ ) foram diferentes entre as áreas em Rh3 ( $p = 0,02$ ) e

Rh4 ( $p = 0,01$ ), assim como  $A/g_s$  mas foram maiores em HS (Figura 3.2D). As amostragens não diferiam entre si em ambas as áreas.



**Figura 3.2.** Parâmetros médios ( $\pm$  desvio padrão) das trocas gasosas e uso da água ( $N = 12$ ) obtidos de plantas de *Rhizophora mangle* (Rh1, Rh2, Rh3 e Rh4) nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade) em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (Rh3) e setembro de 2017 (Rh4). **A)** temperatura foliar ( $T_{folha}$ ), **B)** intensidade luminosa incidente sobre a superfície foliar ( $Q_{leaf}$ ), **C)** Eficiência do uso da água intrínseco ( $WUE_{int}$ ), **D)** Eficiência do uso da água instantâneo ( $WUE_{ins}$ ) ( $WUE$  em  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$ ). Médias diferem estatisticamente pelo teste de *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam comparações entre áreas diferentes (LS e HS). Letras maiúsculas reportam comparações entre amostragem em uma mesma área.

### 3.3.3. Índice de Clorofila

O teor de clorofila *a* diferiu entre as áreas apenas em Rh1 ( $p = 0,000032$ ) e foi maior na área LS (Tabela 3.2). Em HS, o maior valor de clorofila *a* foi obtido em Rh2 e na área LS os maiores valores foram observados em Rh1 e R2. O teor de clorofila *b* diferiu entre as áreas em Rh1 ( $p = 0,002$ ) e Rh3 ( $p = 0,01$ ), com maiores valores reportados na área LS e HS, respectivamente (Tabela 3.2). Em HS, a comparação entre amostragens revelou maiores valores de clorofila *b* em Rh2 e menores valores em Rh1 e Rh3. Em LS, os maiores valores do índice de clorofila *b* foram verificados em Rh1 e Rh2. O índice de clorofila total ( $a+b$ ) diferiu entre Rh1 ( $p = 0,0003$ ) e Rh3 ( $p = 0,007$ ) e foi maior em LS e HS, respectivamente (Tabela 3.2). Na área HS, o maior valor de

clorofila  $a+b$  foi observado em Rh2 enquanto o menor valor foi obtido em Rh1. Na área LS maior valor de clorofila total foi registrado em Rh1 e o menor valor em Rh3. A razão clorofila  $a/b$  distinguiu-se entre as áreas em Rh1 ( $p = 0,04$ ) com maior valor obtido para a área HS e em Rh3 ( $p = 0,002$ ) na área LS (Tabela 3.2). Na área LS, a razão clorofila  $a/b$  foi maior na amostragem Rh3 e diferiu das outras áreas. Nenhuma diferença na razão clorofila  $a/b$  foi observada entre as coletas na área HS.

**Tabela 3.2.** Parâmetros médios ( $\pm$  desvio padrão) dos índices de clorofila  $a$ ,  $b$  e totais ( $a+b$ ) e da razão clorofila  $a/b$  ( $N=12$ ) obtidos de plantas de *Rhizophora mangle* (Rh1, Rh2, Rh3 e Rh4) nas áreas LS (menor salinidade) e HS (maior salinidade) em abril de 2016 (Rh1), setembro de 2016 (Rh2), março de 2017 (Rh3) e setembro de 2017 (Rh4). Médias diferem estatisticamente pelo teste de *Kruskal-Wallis*,  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam comparações entre áreas diferentes (HS e LS). Letras maiúsculas reportam comparações entre amostragem em uma mesma área.

	Rh1 (abril/2016)		Rh2 (setembro/2016)	
	LS	HS	LS	HS
<i>Chl a</i>	45,915 $\pm$ 1,01 <sup>aA</sup>	38,323 $\pm$ 3,12 <sup>bB</sup>	44,891 $\pm$ 1,12 <sup>aA</sup>	44,433 $\pm$ 1,09 <sup>aA</sup>
<i>Chl b</i>	25,807 $\pm$ 5,44 <sup>aA</sup>	18,264 $\pm$ 5,39 <sup>bB</sup>	25,402 $\pm$ 5,02 <sup>aA</sup>	24,527 $\pm$ 5,43 <sup>aA</sup>
<i>Chl a+b</i>	71,722 $\pm$ 6,18 <sup>aA</sup>	56,588 $\pm$ 7,66 <sup>bB</sup>	70,63 $\pm$ 5,93 <sup>aAB</sup>	68,961 $\pm$ 6,36 <sup>aA</sup>
<i>Chl a/b</i>	1,8807 $\pm$ 0,38 <sup>bB</sup>	2,3408 $\pm$ 0,60 <sup>aA</sup>	1,874 $\pm$ 0,3534 <sup>aB</sup>	1,981 $\pm$ 0,446 <sup>aA</sup>
	Rh3 (março/2017)		Rh4 (setembro/2017)	
	LS	HS	LS	HS
<i>Chl a</i>	40,10 $\pm$ 2,05 <sup>aB</sup>	40,862 $\pm$ 0,90 <sup>aB</sup>	40,505 $\pm$ 1,47 <sup>aB</sup>	40,728 $\pm$ 1,11 <sup>aB</sup>
<i>Chl b</i>	15,142 $\pm$ 5,27 <sup>bB</sup>	19,246 $\pm$ 4,58 <sup>aB</sup>	20,637 $\pm$ 3,51 <sup>aAB</sup>	21,396 $\pm$ 1,94 <sup>aAB</sup>
<i>Chl a+b</i>	55,242 $\pm$ 7,08 <sup>bC</sup>	67,997 $\pm$ 18,11 <sup>aAB</sup>	61,142 $\pm$ 4,83 <sup>aBC</sup>	62,124 $\pm$ 2,74 <sup>aAB</sup>
<i>Chl a/b</i>	3,061 $\pm$ 0,639 <sup>aA</sup>	2,271 $\pm$ 0,481 <sup>bA</sup>	2,043 $\pm$ 0,322 <sup>aB</sup>	2,015 $\pm$ 0,285 <sup>aA</sup>

### 3.4 DISCUSSÃO

#### 3.4.1 Trocas gasosas e uso da água são influenciados pela salinidade

O crescimento da maioria das espécies de mangue é estimulado por níveis moderados de sal. No entanto, elevadas salinidades impedem o seu desenvolvimento

pleno (Takemura et al., 2000; Parida et al., 2004). Devido aos efeitos causados pelas flutuações da salinidade da água do solo, as espécies de mangue exibem normalmente reduzidas taxas de assimilação de CO<sub>2</sub> (*A*) e condutância estomática (*g<sub>s</sub>*) quando comparadas com outras espécies C3 (Ball, 1988) e estas respostas são mais acentuadas à medida que se aumentam as concentrações salinas (Martin et al., 2010; Reef and Lovelock, 2015). No presente estudo, foram observados valores reduzidos de *A* e *g<sub>s</sub>* (Figura 3.1 A-B) apenas na amostragem Rh2 na área de maior salinidade (HS) quando se compara as áreas por coleta. De acordo com Sobrado (2004), menor *g<sub>s</sub>* limita o influxo de CO<sub>2</sub> influenciando nas taxas de assimilação, haja vista que a condutância estomática é muito sensível às mudanças da umidade do ar e da salinidade da água intersticial. Neste estudo, a amostragem Rh2 ocorreu na ocasião que se registraram as maiores salinidades na área HS (Tabela 3.1).

Houve redução acentuada nos valores médios de assimilação nas plantas da área de maior salinidade no ano de 2016 (Rh1 e Rh2), média de 2,18 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, comparados aos registros de 5,14 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> em 2013 (Lopes, 2014) e 8,21 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> em 2017 (Rh3, Rh4) referentes aos valores médios das duas amostragens em cada ano. Esta redução na assimilação de CO<sub>2</sub> pode ser reflexo do aumento da salinidade que ocorreu no estuário do Rio São Mateus, devido diminuição da precipitação a partir do final de 2013. Uma vez que em 2013 (até o mês de setembro) a área HS registrava valores de salinidade situados entre 20-30 (Lopes, 2014) e no ano de 2016 essa variável continuou entre 30-40. A área de menor salinidade (LS) que em 2013 registrava valores de salinidade entre 5-10 (Lopes, 2014), em 2016 registrou valores entre 17-26. Ao longo do presente estudo, registraram-se maior assimilação de CO<sub>2</sub> nas salinidades entre 18 e 31 para a área HS e entre 9 e 26 para a área LS (Figura 3.1A e Tabela 3.1). A manutenção da atividade fotossintética nas plantas na área HS foi apoiada pelo aumento da expressão de genes envolvidos nos processos fotossintéticos, defesa antioxidante e sequestro de Na<sup>+</sup> (apresentado em detalhes no Capítulo 4). Resultados similares foram observados por López-Hoffman et al. (2006). Os autores relataram maior assimilação de CO<sub>2</sub> em plântulas de *R. mangle*, crescendo em condição de campo sob maior salinidade (25) comparado com a área de menor salinidade (abaixo de 10). Maior desempenho fotossintético sob alto teor de sal é uma característica das espécies da família Rhizophoraceae. Vários estudos reportam melhor desenvolvimento de *R. mangle* em condições de salinidade de até 30 (Krauss and Allen, 2003; Parida et al., 2003).

Assim, as plantas de *R. mangle* registraram os melhores resultados para assimilação de CO<sub>2</sub> nas salinidades entre 18 -31 em HS e entre 9 – 26 em LS. Igualmente, López-Hoffman et al. (2006) notaram que plântulas *R. mangle*, também em condição de campo, exibiram melhor assimilação na área de maior salinidade (25) do que na área de menor salinidade (inferior a 10 psu). Resultado similar ao encontrado para plantas jovens de *R. mangle* nas mesmas áreas do presente estudo (HS e LS) em 2013 (Lopes, 2014), uma vez que as espécies da família Rhizophoracea exibem melhor desenvolvimento em condições de salinidade até 30 psu (Krauss and Allen, 2003; Parida et al., 2003).

Os resultados deste estudo reforçam estas influências da salinidade sobre a assimilação de CO<sub>2</sub> em *R. mangle*, uma vez que houve diferença significativa entre as amostragens e identificam que os menores valores de *A* (Figura 3.1A) ocorreram em salinidades intermediárias ou altas (nas amostragens Rh1 e Rh2, respectivamente, em ambas as áreas – ver Tabela 3.1). Todavia, durante a amostragem Rh4, quando ocorreu salinidade intermediária na área HS e alta na área LS, valores de assimilação de CO<sub>2</sub> comparáveis àqueles obtidos para Rh3 (Figura 3.1A) foram registrados, quando a salinidade foi baixa para ambas as áreas. Estes resultados, principalmente aqueles obtidos para a área de menor salinidade, podem ser explicados pelo aumento da incidência luminosa, uma vez que maior luminosidade pode melhorar a fotossíntese. Dangremond et al. (2015) observaram aumento na assimilação de CO<sub>2</sub> em plântulas de *R. mangle* com o incremento da salinidade e luminosidade (salinidade máxima de 35 sob 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de densidade de fluxo de fótons fotossintéticos) num período de 12 semanas. Segundo as autoras, espécies de mangue comumente saturam a taxa fotossintética em baixas intensidades luminosas e a exposição diretamente à luz solar podem resultar em excesso de energia de excitação e aumento da temperatura foliar. No presente estudo, as plantas crescendo na área LS, a partir das amostragens Rh3 e Rh4 (Figura 3.2A) foram submetidas à maior exposição à luz solar devido à queda de árvores maiores do dossel causada por ventos com velocidade elevada, refletindo, conseqüentemente, em maior taxa de transpiração foliar. De acordo com Larcher (2000), maior transpiração foliar é um mecanismo de proteção contra a elevação da temperatura. No estudo de Dangremond et al. (2015), o efeito da salinidade e da luz sobre os processos fotossintéticos de plântulas de *R. mangle* não influenciou a altura final, biomassa, ou taxa de crescimento, mas resultou em menor mortalidade sob alta luminosidade em salinidade moderada. Por outro lado, López-Hoffman et al., (2006)

observaram que em menor luminosidade as taxas de sobrevivência das plântulas de *R. mangle* foram maiores em maior salinidade (25). Assim, o gênero *Rhizophora* pode habitar locais com alta luminosidade (Kitao et al., 2003) desde que o teor de salinidade seja moderado.

O menor nível de luminosidade na área HS, devido à maior cobertura do dossel, não foi prejudicial para as plantas, como foi possível observar a partir dos valores de assimilação registrados para ambas as áreas nas duas últimas amostragens (Rh3 e Rh4). No entanto, muito embora a área LS tenha apresentado condições propícias para o pleno desenvolvimento de seus indivíduos (maior luminosidade e salinidade moderada), isto não resultou em melhores taxas médias de assimilação de carbono (Figura 3.1A). Contudo, este fato pode ser indicativo que os indivíduos da área HS apresentam uma série de ajustes fisiológicos, que lhes permite minimizar os efeitos da salinidade e desenvolver-se, mesmo à custa de maior gasto energético.

A eficiência intrínseca no uso da água não diferiu nas plantas da área HS uma vez que para todas as amostragens valores similares de  $WUE_{int}$  (A/gS) foram obtidos (Figura 3.2C). Comparações entre áreas mostraram melhor uso da água para as plantas em LS nas duas últimas amostragens Rh3 e Rh4. Contudo, em Rh2, quando a salinidade foi alta para ambas as áreas (Tabela 3.1), valores de  $WUE_{int}$  foram similares, indicando a influência da alta salinidade para as plantas independente da área de crescimento. Soares et al. (2015) também não observaram diferenças no uso intrínseco da água comparando florestas com diferentes salinidades para plantas de *R. mangle*. Por outro lado, registraram diferenças nas assinaturas isotópicas (C14), que avaliam a eficiência no uso da água em longo prazo, na floresta com maior salinidade.

A invariabilidade de  $WUE_{ins}$  entre as quatro amostragens em ambas as áreas, sugere manutenção da eficiência do uso da água, independente da salinidade, indicando adaptação dos indivíduos às condições locais. No entanto, diferenças entre as áreas mostraram melhor uso da água para as plantas da área HS nas duas últimas amostragens (Rh3 e Rh4) (Figura 3.2D). É importante ressaltar a ocorrência de maior luminosidade em LS (como mencionado acima) que resultou em maior temperatura e transpiração foliar, sem aumentos evidentes da assimilação de carbono. Conseqüente, as plantas da área LS mostram maior restrição do uso da água do que as plantas da área HS (Figura 3.2C). No entanto, também podemos inferir que, apesar de estarem crescendo em um ambiente mais salino, as plantas em HS podem estar tendo mais acesso a águas subterrâneas, uma vez que esta área apresenta topografia menos elevada que a área LS.

Visto que Lovelock et al. (2017), ao analisarem as assinaturas isotópicas das fontes de águas de *Rhizophora stylosa* Griff., observaram que as águas subterrâneas estavam menos disponíveis para as plantas que cresciam na área de maior elevação. Porém, em Rh2, muito embora não tenha sido registrada diferença estatística entre as áreas em  $WUE_{int}$ , os menores valores de temperatura e transpiração foliares na área HS pode ser um indicativo de restrição à água, uma vez que as radiações luminosas entre as áreas foram similares. Entretanto, na área LS a assimilação foi maior (Figura 3.1C). Limitações do uso da água, decorrentes do maior custo de aquisição da água com o aumento da salinidade contribui para a redução do transporte de elétrons fotossintéticos e conseqüentemente nas etapas subsequentes de redução do carbono. Chen and Ye (2014) observaram que plântulas de *Excoecaria agallocha* L., espécie de mangue não vivípara, não estão aptas em manter alta eficiência no uso da água ( $A/E$ ) em condições de salinidade elevada (25), apesar da acentuada redução da transpiração foliar.

### 3.4.2 Índices de clorofila não foram interferidos pela salinidade

Geralmente, o aumento da salinidade vem acompanhado pela redução na concentração de clorofila *a*, em consequência da fotoinibição crônica. Conseqüente, redução da capacidade fotossintética ocorre (Naidoo et al., 2002) ao contrário do que foi evidenciado nas plantas de *R. mangle* no presente estudo. Diferença no índice de clorofila *a* entre as áreas ocorreu somente em Rh1 na área LS, para a qual maior índice de clorofila *a* foi registrado (Tabela 3.2). No entanto, maior índice de clorofila *a* não foi seguido pelo aumento na assimilação de CO<sub>2</sub>, que foi similar entre as áreas (Figura 3.1A). Assim como na amostragem Rh2 na área LS, que apesar da maior taxa de assimilação não foi observado diferenças entre os índices de clorofilas *a* em ambas as áreas. Na área HS, ao comparar as diferenças entre as amostragens, também foi observado maior índice de clorofila *a* no período de maior salinidade (Rh2) comparado com as amostragens com menor salinidade (Tabela 3.1 e 3.2), sem interferência na assimilação de carbono. Goussi et al., (2018) reportaram aumentos no conteúdo de clorofila *a* na halófito *Thellungiella salsuginea* (Pall.) O.E.Schulz com o incremento da salinidade de 200 a 400 mM. Contudo, o aumento no conteúdo de clorofila *a* foi negativamente correlacionado com o crescimento. Em plântulas de *Kandelia candel* (L.) Druce, a alta salinidade resultou em maior concentração de clorofila *a* (Wang et al. 2105). Os resultados obtidos na área LS indicam que as amostragens que apresentaram as maiores taxas de *A* também exibiram os menores índices de clorofila *a* (Figuras 3.2A

e). No entanto, em Rh3, quando houve maior taxa de assimilação na área LS, foi o período de baixa salinidade (Tabela 3.1).

O conteúdo de clorofila total ( $a + b$ ) está relacionado à melhoria da eficiência na taxa de transferência de energia luminosa e na produção de energia química. Como resultado, aumentos na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> ocorrem. Contudo, este fato não foi observado entre as áreas, uma vez que não houve diferença entre as taxas de  $A$ , mesmo com maior índice de Clor  $a+b$  ocorrendo na amostragem Rh1 para a área LS e em Rh3 para a área HS. A redução do conteúdo de pigmentos nas plantas em ambas as áreas, representado pelo menor valor do índice de clorofila total, pode ser consequência da destruição dos complexos de pigmentos protéicos dos tilacóides nos centros de reação (RCs) fotossintéticos (Chang et al., 2012) e diminuição dos centros de reação ativos.

Por fim, a razão clorofila  $a/b$  é considerada um índice da capacidade dos complexos coletores de luz (LHC) e estes são regulados por meio da atividade do ciclo da clorofila (Das et al., 2002; Tanaka and Tanaka, 2007). A menor razão Clorofila  $a/b$  obtida nas plantas da área de menor salinidade (LS) está relacionada ao aumento de clorofilas associadas aos complexos coletores de luz (LHC) do que com os centros de reação, evidenciado pelo maior valor de clorofila  $b$  (Lambers, 2008), uma vez que a clorofila  $b$  é essencial para a elaboração e funcionamento da maioria dos LHCs (Chen, 2014). O aumento de clorofilas associadas ao LHC junto com a redução de centros de reação ativos diminui a transferência de energia e eleva a sua dissipação na forma de calor ou fluorescência (Kalaji et al., 2011) como um mecanismo de fotoproteção. No entanto, na área de menor salinidade, na primeira amostragem, houve menor dissipação de calor ( $DI_0/RC$ ) sem o aumento da assimilação, em relação à área HS, fato que leva a entender que a salinidade está comprometendo tanto a parte fotoquímica quanto a etapa química do ciclo de Calvin nos indivíduos amostrados. Muito embora nenhuma diferença significativa foi obtida para a taxa de assimilação entre as áreas estudadas, nota-se que estes fatores prejudicaram os processos fotossintéticos das plantas crescendo sob maior salinidade em ambas as áreas.

### 3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Plantas de *Rhizophora mangle* de ambas as áreas foram influenciadas pelo aumento da salinidade, seja na área HS ou área LS, como foi observado pela modificação de alguns parâmetros entre as amostras.

Resultados apontaram diminuição na eficiência fotossintética para plantas de *R. mangle* da área de menor salinidade sob aumento da salinidade. Efeitos do sal acarreta maior gasto energético e ineficiência no transporte de elétrons, podendo ser o reflexo da baixa assimilação fotossintética mesmo em menor salinidade.

Os índices de clorofila não foram interferidos pela salinidade, uma vez que não foram observadas relação efetiva entre a salinidade e os resultados de clorofila *a* e clorofila *b*, seja entre áreas ou amostragens.

Finalmente, os resultados obtidos neste estudo contribuem para o entendimento do comportamento fotossintético de *R. mangle* em situações de salinidade similar ou próxima à água do mar com pequenas amplitudes de variação entre as concentrações mínimas e máximas, bem como, seu funcionamento em condições similares, climáticas e oceanográficas, mas com salinidades menos elevadas e abaixo daquela da água do mar com maior amplitude de variação entre os valores mínimos e máximos.

### 3.6 REFERÊNCIAS

Alongi, D.M., 2014. Carbon cycling and storage in mangrove forests. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 6, 195-219.

Ball, M.C., 1988. Ecophysiology of mangroves. *Trees*. 2, 129-142. <https://doi.org/10.1007/BF00196018>

Barbier, E.B., 2016. The protective service of mangrove ecosystems: A review of valuation methods. *Mar. Pollut. Bull.* 109, 676–681.

Barr, J.G., Fuentes, J.D., Engel, V., Zieman, J.C., 2009. Physiological responses of red mangroves to the climate in the Florida Everglades. *Journal of Geophysical Research*. 114, 1-13.

Bompy, F., Lequeue, G., Imbert, D., Dulormne, M., 2014. Increasing fluctuations of soil salinity affect seedling growth performances and physiology in three

Neotropical mangrove species. *Plant Soil*. 380- 399. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2100-2>

Chang, I.H., Cheng, K.T., Huang, P.C., Lin, Y.Y., Cheng, L.J., Cheng, T.S., 2012. Oxidative stress in greater duckweed (*Spirodela polyrhiza*) caused by long-term NaCl exposure. *Acta Physiol. Plant*. 34, 1165–1176.

Chen, M., 2014. Chlorophyll Modifications and Their Spectral Extension in Oxygenic Photosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 317-340. <http://doi.org/10.1146/annurev-biochen-072711-162943>

Chen, Y., Ye, Y., 2014. Effects of Salinity and Nutrient Addition on Mangrove *Excoecaria agallocha*. *PLoS ONE*. 9(4): e93337. doi: 10.1371/journal.pone.0093337

Dangremond E.M., Feller I.C., Sousa W.P., 2015. Environmental tolerances of rare and common mangroves along light and salinity gradients. *Oecologia*. 179,1187–1198. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3408-1>

Das, A.B., Parida, E.U.C., Das, E.P., 2002. Studies on pigments, proteins and photosynthetic rates in some mangroves and mangrove associates from Bhitarkanika, Orissa. *Marine Biology*. 141, 415–422.

Dassanayake, M., Haas, J.S., Bohnert, H.J., Cheeseman, J.M., 2009. Shedding light on an extremophile lifestyle through transcriptomics. *New Phytologist*. 183, 764-775. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02913.x>

Duke, N.C., 1992. Mangrove Floristics and Biogeography. – In: Robertson, A.I, Alongi, D.M. (ed.): *Tropical Mangrove Ecosystems* Pp. 63-100. Coastal and Estuarine Studies.

Duke, N.C., Bell, A.M., Pederson, D.K. *et al.*: 2005. Herbicides implicated as the cause of severe mangrove dieback in the Mackay region, NE Australia: consequences for marine plant habitats of the GBR World Heritage area. – *Marine Pollution Bulletin*. 51, 308–324.

Giri C., Ochieng E., Tieszen L.L. *et al.*: 2010. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. – *Global Ecology and Biogeography*. 20,154–159.

Goussi, R., Manaa, A., Derbali, W., Cantamessa, S., Abdelly, C., Barbato, R., 2018. Comparative analysis of salt stress, duration and intensity, on the chloroplast ultrastructure and photosynthetic apparatus in *Thellungiella salsuginea*. *J Photochem Photobiol B*. 183, 275-287. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.04.047

Hao, G., Jones, T.J., Luton, C., Zhang, Y.J., Manzane, E., Scholz, F.G., Bucci, S.J., Cao, K.F., Goldstein, G., 2009. Hydraulic redistribution in dwarf *Rhizophora mangle* trees driven by interstitial soil water salinity gradients: impacts on hydraulic architecture and gas exchange. *Tree Physiol.* 29, 697–705. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpp005>

Hoppe-Speer, C.L., Adams, J.B., Rajkaran, A., Bailey, D., 2011. The response of the red mangrove *Rhizophora mucronata* Lam. to salinity and inundation in South Africa. *Aquatic Botany.* 95, 71-76.

Hutchings P., Saenger P.: Ecology of mangroves. Pp 388. University of Queensland Press, Queensland, 1987.

Jithesh, M.N., Prashanth, S.R., Sivaprakash, K.R. et al., 2006. Monitoring expression profiles of antioxidant genes to salinity, iron, oxidative, light and hyperosmotic stresses in the highly salt tolerant grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. by mRNA analysis. *Plant Cell Rep.* 25(4), 865–876. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0127-4>

Kalaji, H.M., Govindjee, Bosa, K., Koscielniak, J., Zuk-Gofaszewskae, K., 2011. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO<sub>2</sub> assimilation of two Syrian barley landraces. *Environmental and Experimental Botany.* 73, 64–72.

Kitao, M., Utsugi, H., Kuramoto, S., Tabuchi, R., Fujimoto, K., Lihpai, S., 2003. Light-dependent photosynthetic characteristics indicated by chlorophyll fluorescence in five mangrove species native to Pohnpei Island, Micronesia. *Physiol Plant.* 117, 376–382. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00042.x>

Krauss, K.W., Allen, J.A., 2003. Influence of salinity and shade on seedling photosynthesis and growth of two mangrove species *Rhizophora mangle* and *Bruguiera sexangula*, introduced to Hawaii. *Aquatic Botany.* 77(4), 311–324.

Krauss, K.W., Lovelock, C.E., Mckee, K.L., López-Hoffman, L., Ewe, S.M.L., Sousa, W.P., 2008. Environmental drivers in mangrove establishment and early development: a review. *Aquatic Botany.* 89, 105–127.

Krauss, K.W., Twilley, R.R., Thomas, W., Doyle, T.W., Gardiner, E.S., 2006. Leaf gas exchange characteristics of three neotropical mangrove species in response to varying hydroperiod. *Tree Physiol.* 26, 959–968. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.7.959>

Lambers, J., Chapin, F.S., Pons, T.L., *Plant Physiological Ecology.* New York: - Verlag, 540p. 1998.

Lambers, J., Chapin, F.S., Pons, T.L., Plant Physiological Ecology. New York: Springer, 2 ed. 604p. 2008.

Larcher, W. Ecofisiologia vegetal. Pp 531. RiMa, São Carlos 2000.

Li, N., Chen, S., Zhou, X., Li, C., Shao, J., Wang, R., Fritz, E., Hüttermann, A., Polle, A., 2008. Effect of NaCl on photosynthesis, salt accumulation and ion compartmentation in two mangrove species, *Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*. Aquatic Botany. 88, 303–310.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.12.003>

Lin, G., Sternberg, L.S.L., 1992. Effect of Growth Form, Salinity, Nutrient and Sulfide on Photosynthesis, Carbon Isotope Discrimination and Growth of Red Mangrove (*Rhizophora mangle* L.). Australian Journal of Plant Physiology. 19, 509-517. <http://dx.doi.org/10.1071/PP9920509>

Lopes, D.M.S., Relação da Estrutura e Fotossíntese em Espécies de Manguê no Rio São Mateus. Dissertação (Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2014.

López-Hoffman, L., DeNoyer, J.L., Monroe, I.E., Shaftel, R., Anten, N.P.R., Martínez-Ramos, M., David, D., Ackerly, D.D., 2006. Mangrove Seedling Net Photosynthesis, Growth, and Survivorship are Interactively Affected by Salinity and Light. Biotropica. 38(5), 606–616. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2006.00189.x>

Lovelock, C.E., Feller, I.C., 2003. Photosynthetic performance and resource utilization of two mangrove species coexisting in a hypersaline scrub forest. Oecologia. 134, 455-46. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-1118-y>

Lovelock, C.E., Reef, R., Ball, M.C., 2017. Isotopic signatures of stem water reveal differences in water sources accessed by mangrove tree species. Hydrobiologia. 803, 133–145. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3149-8>

Martin, K.C., Bruhn, D., Lovelock, C.E., Feller, I.C., Evans, J.R., Ball, M.C., 2010. Nitrogen fertilization enhances water-use efficiency in a saline environment. Plant, Cell and Environment. 33, 344-357.

Medina, E., García, V., Cuevas, E., 1990. Sclerophylly and oligotrophic environments: relationships between leaf structure, mineral nutrient content and drought resistance in tropical rain forests of the upper Rio Negro Region. Biotropica. 22, 51–64.

Nagelkerken, I., van der Velde G., 2004. Are Caribbean mangroves important feeding grounds for juvenile reef fish from adjacent seagrass beds? – Marine Ecology Progress Series. 274, 143-151.

Naidoo G., 2010. Ecophysiological differences between fringe and dwarf *Avicennia marina* mangroves. *Trees*. 24, 667-673, 2010.

Naidoo, G., Hiralal, O., Naidoo, Y., 2011. Hypersalinity effects on leaf ultrastructure and physiology in the mangrove *Avicennia marina*. *Flora*. 206, 814-820. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2011.04.009>

Naidoo, G., Tuffers, A.V., von Willert, D.J., 2002. Changes in gas exchange and chlorophyll fluorescence characteristics of two mangroves and a mangrove associate in response to salinity in the natural environment. *Trees*. 16, 140-146. <https://doi.org/10.1007/s00468-001-0134-6>

Parida, A.K., Das, A.B., Mitra, B., 2003. Effects of NaCl stress on the structure, pigment complex composition and photosynthetic activity of mangrove *Bruguiera parviflora* chloroplasts. *Photosynthetica*. 41, 191–200.

Parida, A.K., Das, A.B., Mohanty, P., 2004. Investigations on the antioxidative defence responses to NaCl stress in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential regulations of isoforms of some antioxidative enzymes. *Plant Growth Regul.* 42, 213–226. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000026508.63288.39>

Petri, D.J.C., Bernini, E., Souza, L.M., 2011. Distribuição das espécies e estrutura do manguezal do rio Benevente, Anchieta, ES. – *Biota Neotropica*. 11(3), 107-116.

Reef, R., Lovelock, C.E., 2015. Regulation of water balance in mangroves. *Annals of Botany*. 115, 385–395.

Schaeffer-Novelli, Y., Cintrón-Molero, G., Adaime, R.R., 1990. Variability of mangrove ecosystems along the brazilian coast. *Estuaries*. 13(2), 204-218.

Scholander, P.F., 1968. How mangrove desalinated water. – *Physiol. Plant*. 21, 251-261.

Silva, M.A.B., Bernini, E., Carmo, T.M.S., 2005. Características estruturais de bosques de mangue do estuário do rio São Mateus, ES, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*. 19(3), 465-471.

Soares, M.L.G., Tognella, M.M.P., Cuevas, E., Medina, E., 2015. Photosynthetic capacity and intrinsic water-use efficiency of *Rhizophora mangle* at its southernmost western Atlantic range. *Photosynthetica*. 53, 464-470. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0119-0>

Sobrado, M.A., 2004. Influence of external salinity on the osmolality of xylem sap, leaf tissue and leaf gland secretion of the mangrove *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. *Trees*. 18, 422-427.

Sobrado, M.A., 2005. Leaf characteristics and gas exchange of the mangrove *Laguncularia racemosa* as affected by salinity. *Photosynthetica*. 43, 217-221. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0036-8>

Sobrado, M.A., Ball, M.C., 1999. Light use in relation to carbon gain in the mangrove, *Avicennia marina*, under hypersaline conditions. *Australian Journal of Plant Physiol.* 26, 245– 251. <https://doi.org/10.1071/PP98075>

Taiz, L., Zeiger, E., 2009. *Fisiologia vegetal*. São Paulo: Artmed, 4 ed. 2009. 848 p.

Takemura, T., Hanagata, N., Sugihara, K., Baba, S., Karube, I., Dubinsky, Z., 2000. Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorhiza*. *Aquatic Botany*. 68,15–28. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(00\)00106-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(00)00106-6)

Tanaka, R., Tanaka, A., 2007. Tetrapyrrole Biosynthesis in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 321–46. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105448

Tuteja, N., 2007. Chapter twenty-four-mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol.* 428, 419–438. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28024-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28024-3)

Wang, L., Pan, D., Li, F., Hoffmann-Benning, S., Liang, W., Chen, W., 2015. Proteomic analysis of changes in the *Kandelia candel* chloroplast proteins reveals pathways associated with salt tolerance. *Plant Sci.* 231, 159-172. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.11.013>

Zhu, Z., Chen, J., Zheng, H.L., 2012. Physiological and proteomic characterization of salt tolerance in a mangrove plant, *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lam. *Tree Physiology*. 32, 1378–1388. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps097>

## CAPÍTULO 4

### ANÁLISES FOTOSSINTÉTICAS E EXPRESSÃO DE GENES EM PLANTAS DE *Rhizophora mangle* L. QUE CRESCEM SOB CONDIÇÕES DE CAMPO PROPORCIONAM COMPREENSÕES SOBRE ADAPTAÇÕES AO AO SAL

#### RESUMO

*Rhizophora mangle* é uma espécie de mangue distribuída na região da costeira do Atlântico e leste do Pacífico. Está adaptado a uma ampla gama de salinidade e tem grande importância ecológica para os ecossistemas de mangue. No entanto, pouco se sabe sobre a base genética subjacente aos mecanismos de tolerância a sal desta espécie. Portanto, investigamos aqui as bases fisiológicas e moleculares da tolerância ao sal em *R. mangle* em condições de campo, com base em análises de trocas gasosas, teores de clorofila, fluorescência da clorofila *a* e expressão gênica por qRT-PCR. Os dados de troca gasosa mostraram que as plantas que crescem em ambas as áreas apresentam comparáveis taxas de assimilação de CO<sub>2</sub> e condutância estomática. A manutenção fotossintética sob condições de alta salinidade foi sustentada por uma atividade melhorada do fotossistema II (FSII), conforme indicado pelos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e razão de clorofila *a/b*, incluindo o aumento dos centros de reação ativa (RCs) e complexos de evolução do oxigênio (CEOs). Além disso, os genes *psbA* (proteína D1 do RC) e *PSBO2* (subunidade do OEC) foram positivamente regulados sob alta salinidade, o que pode estar relacionado ao aumento da eficiência no reparo de lesões no RC e COE através da síntese de novas subunidades, melhorando a atividade do FSII. Além disso, a expressão de outros cinco genes envolvidos na síntese de ATP, ativação de RubisCO, sequestro de espécies reativas de oxigênio (EROs), síntese de GABA e sequestro de Na<sup>+</sup> vacuolar foram regulados positivamente sob alta salinidade. Desse modo, o balanço de energia e a prevenção de estresse oxidativo e toxicidade iônica também foram induzidos sob essa condição. Nossos dados lançam luz sobre o mecanismo de tolerância ao sal e fornecem genes específicos regulados pelo sal em *R. mangle* sob condições de campo.

**Palavras-chaves:** Genes regulados pelo sal; Fluorescência da clorofila *a*; Halófitas

#### 4.1 INTRODUÇÃO

Florestas de mangue crescem ao longo de costas protegidas sob forte influência dos regimes das marés e são caracterizadas pelo desenvolvimento em solo inundado, hipóxico e salino (Dangremond et al., 2015; Lovelock et al., 2017). O ecossistema de mangue é altamente produtivo e é considerado um dos ecossistemas mais valiosos, pois pode minimizar o efeito das tempestades nas áreas costeiras, entre outros serviços ecológicos essenciais e únicos (Barbier, 2016). Uma característica típica da maioria das plantas de mangue é o seu estilo de vida halófito, uma vez que são necessárias concentrações salinas moderadas para um crescimento e desenvolvimento completos

(Ball, 1988). Assim, essas plantas desenvolveram mecanismos eficientes de tolerância ao sal para lidar com ambientes salinos, evitando ou mitigando os efeitos do sal, como toxicidade iônica, estresse osmótico e dano oxidativo (Takemura et al., 2000; Parida et al., 2004; Flowers and Colmer, 2008; Parida and Jha, 2010). O processo hidrológico e de maré pode alterar o efeito do sal no desenvolvimento destas plantas, mas também pode ter um efeito sinérgico ou antagonista, aumentando as condições hipóxicas no sedimento de manguezal. Estudos sobre a dinâmica das inundações são escassos (Bompy et al., 2014), dificultando a avaliação do comportamento das plantas de mangue em diferentes condições ambientais e principalmente ex situ e relacionadas com o tempo de inundação (Luzhen et al., 2005; Chen and Yen, 2014). Nesse contexto, Lara and Cohen (2006) desenvolveram um modelo com dados de previsão de salinidade da água para avaliar o efeito da salinidade intersticial da água no desenvolvimento de manguezais e obtiveram uma forte correlação entre a salinidade e a altura do dossel. Estes estudos mostram os efeitos em escala local sobre o comportamento das espécies de mangue sob diferentes condições e recursos, entretanto, há pouco entendimento sobre quais fatores fisiológicos estão envolvidos e como a expressão gênica ocorre entre indivíduos da mesma população.

Estudos fisiológicos relacionados ao desempenho fotossintético de manguezais sob diferentes condições de sal indicam um papel essencial do ajuste funcional do mecanismo fotossintético (Ball, 1996; Sobrado and Ball, 1999; Lovelock and Feller, 2003; Sobrado, 2005; Li et al., 2008; Naidoo et al., 2011), e um uso eficiente da água para melhorar a tolerância ao sal (Tuteja, 2007; Dangremond et al., 2015; Lovelock et al., 2017). Esforços para entender a base genética subjacente aos mecanismos de tolerância ao sal das espécies de manguezais foram concentrados em análises funcionais genéticas, transcriptoma e proteoma, que se concentraram principalmente em duas espécies de mangue, *Kandelia candel* (L.) Druce e *Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Lam (Dassanayake et al., 2009; Yamanaka et al., 2009; Zhu et al., 2012; Jing et al., 2015; Yang et al., 2015; Wang et al., 2014, 2015; Guo et al., 2017). Esses estudos forneceram resultados importantes relacionados a genes putativos, envolvidos no mecanismo de tolerância ao sal, que incluem genes que atuam na fotossíntese, defesa antioxidante e transporte de sal.

*Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) é uma espécie de mangue pouco estudada quanto ao seu mecanismo de tolerância ao sal em níveis moleculares e fisiológicos. Esta espécie é distribuída ao longo das costas do Pacífico e Atlântico, que

incluem o istmo americano e as costas de ambos os lados do Atlântico (Duke and Allen, 2002). Nas Américas Tropicais e Subtropicais, *R. mangle* ocorre do norte da Flórida ao sul do Brasil, na costa leste do Atlântico (Soares et al., 2012; Dangremond et al., 2015). Além do estilo de vida halofítico, *R. mangle* também se desenvolve bem sob água doce (López-Hoffman et al., 2006). Esse aspecto é interessante porque favorece sua distribuição austral, já que seu desempenho fotossintético é mais eficiente em áreas com alta oferta de água doce a baixa temperatura (Soares et al., 2015). Dada a sua plasticidade ambiental, *R. mangle* tem grande importância ecológica para os ecossistemas de manguezais, onde é encontrada sob uma ampla gama de solos contendo sal. Como *R. mangle* não produz glândulas salinas, o mecanismo evoluído para tolerar ambientes salinos envolve a exclusão de sal pela ultrafiltração da raiz (Scholander, 1968) restringindo o influxo de sal para as folhas, mantendo baixa a concentração de sal vacuolar na raiz (Werner and Stelzer, 1990). Além disso, para evitar a toxicidade iônica devido aos altos níveis de  $\text{Na}^+$  que atingem as células, o sal transportado para as folhas é armazenado nos vacúolos. Além disso, para evitar a toxicidade iônica devido aos altos níveis de  $\text{Na}^+$  que atingem as células, o sal transportado para as folhas é armazenado nos vacúolos (Naidoo et al., 2002).

Este estudo compara dados sobre a fisiologia de *R. mangle* em dois manguezais, contribuindo para o entendimento de aspectos ecológicos que favorecerão o domínio das espécies na floresta, uma vez que outros fatores correlacionados com as escalas ambientais podem influenciar a diversidade específica e estrutural da floresta nos manguezais (Zamprognio et al., 2016; Lima et al., 2017). Estudos *in situ* contribuirão para avaliar o comportamento das espécies que servem de referência para a modelagem de ecossistemas em relação às mudanças climáticas e conseqüentemente ao aumento do nível médio relativo do mar, considerando que os manguezais são bastante sensíveis a variações na concentração de  $\text{CO}_2$ , temperatura e salinidade (Farnsworth et al., 1996; Woodroffe, 1992). Análises de parâmetros fisiológicos e expressão gênica nos permitem identificar quais parâmetros nas diferentes escalas hierárquicas estão influenciando o desenvolvimento e o domínio das espécies de mangue em escala local. Entender o comportamento ecológico baseado em ferramentas fisiológicas e moleculares em um contexto espacial é um aspecto fundamental para melhorar as estratégias de manejo para a conservação de manguezais em todo o mundo.

Abordamos especificamente as duas questões seguintes: (i) Em primeiro lugar, como são os padrões de expressão gênica de genes supostamente regulados pelo sal em

folhas de plantas de *R. mangle* crescendo em diferentes florestas de mangue? Para responder a essa questão, investigamos a expressão gênica de vários genes envolvidos na fotossíntese, defesa antioxidante e sequestro de Na<sup>+</sup> vacuolar por qRT-PCR. (ii) Em segundo lugar, existe uma relação entre a expressão gênica dos genes putativos regulados por sais e as respostas fotossintéticas nas plantas de *R. mangle* que lhes permitem prosperar na salinidade? Para resolver essa questão, realizamos análises de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e índice de clorofila. Finalmente, os dados aqui apresentados irão lançar luz sobre os principais aspectos dos mecanismos de tolerância ao sal em *R. mangle* em níveis moleculares e fisiológicos que crescem em condições de campo nos locais de diferentes comportamentos de salinidade.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Área de estudo

Dois locais de estudo foram delimitados no ecossistema manguezal, pertencente ao estuário do rio São Mateus (Conceição da Barra, ES), para garantir os mesmos padrões ambientais recomendados por Twilley et al. (1999) e avaliar a diferença de habitat para a mesma espécie. O primeiro local (habitat menos salino) foi definido longe da foz do rio (7,5 km a montante), que tem um solo com baixa salinidade (cerca de 15 ppu), a área LS. O outro local de estudo (habitat mais salino) foi delimitado próximo à foz do rio (2,8 Km), onde a salinidade do solo é maior (cerca de 25 ppu), na área HS. Os detalhes da localização das áreas LS e HS são mostrados na Figura 1.1 (ver capítulo 1). Ambos os locais estão sofrendo taxas de inundação semelhantes, que foram monitoradas durante o ciclo da maré (marés de sizígia e quadratura) usando o registrador de dados de nível de água HOB0 U20 (Onset) e possuem o mesmo hidroperíodo (por exemplo, frequência e duração do evento de inundação). Portanto, no contexto macro do ambiente de habitat, consideramos que o nível de salinidade foi a principal variável entre esses dois locais. O nível de salinidade nos dois locais foi monitorado usando o multímetro portátil HQ40D (Hach) e os dados foram expressos como unidade de salinidade prática (psu). As medições foram realizadas mensalmente de setembro de 2016 a abril de 2017, para este estudo, mas os locais estão sendo monitorados para uma salinidade de longo prazo. Bernini et al. (2006) avaliaram a concentração de macronutrientes (N, Ca, K, Mg, S e P) ao longo do estuário do rio São

Mateus e não encontraram diferenças significativas para as folhas de *R. mangle*. Nossas áreas de estudo estão próximas aos seus 1 e 3 sites.

Embora existam diferenças de salinidade entre sites, entendemos que esse não é o único parâmetro que é distinto entre os dois sites. Mesmo que houvesse aumento do esforço amostral entre as áreas, fatores secundários como potencial redox, sulfeto, micro e macronutrientes e pH podem influenciar nas respostas fisiológicas de *R. mangle*. No entanto, entendemos que as estratégias fisiológicas desta espécie fazem dela um importante elemento a ser avaliado em condições de campo, embora não pudéssemos cobrir todos os interferentes como o fariam em situações de laboratório.

#### 4.2.2 Amostra vegetal

Para as medições de trocas gasosas, índice de clorofila e fluorescência da clorofila *a* definiu-se um padrão de amostragem quantificando os dados em cinco folhas consideradas jovens, completamente expandidas e sem indícios de senescência. Para atender este padrão, foram amostradas as folhas do segundo par a partir do ápice para a base do ramo. Estas réplicas foram obtidas de doze indivíduos jovens (amostras) de *Rhizophora mangle* selecionados aleatoriamente. Cada amostragem envolveu dois dias de campos, uma área por dia, realizadas em março de 2017.

A seleção das folhas para o estudo de expressão gênica seguiu o mesmo padrão de amostragem definidos anteriormente, com modificação apenas do número amostral, isto é, quatro indivíduos jovens de *R. mangle* escolhidos aleatoriamente. Imediatamente após a coleta, as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e conservadas à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  em ultrafreezer portátil (Shuttle™ Model ULT-25NE) até o processamento. Amostras foliares foram coletadas no período da manhã, entre 9:00 e 11:00 horas, no mês de abril de 2017.

#### 4.2.3 Fluorescência da clorofila *a*

A emissão da fluorescência da clorofila *a* foi registrada utilizando-se um fluorímetro portátil Handy PEA (Hansatech, UK), entre 08:00 e 10:00 horas em folhas previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos (Falqueto et al., 2008) utilizando-se cliques foliares apropriados (Hansatech Instruments Ltd.). A intensidade luminosa sob a folha foi de  $3000 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , que é suficiente para o registro da fluorescência máxima para todos os tratamentos. As intensidades da fluorescência em  $50\mu\text{s}$  (considerado como  $F_0$ ),  $100\mu\text{s}$ ,  $300\mu\text{s}$ ,  $2\text{ms}$  ( $F_J$ ),  $30\text{ms}$  ( $F_I$ ) e fluorescência máxima ou  $F_m$

foram coletadas e usadas para obter os parâmetros a partir do teste (Strasser and Strasser, 1995).

Equações provenientes dos parâmetros do teste JIP também foram utilizadas para calcular: L-band  $V_{OK} = (F_{100\mu s} - F_0) / (F_{300\mu s} - F_0)$  – Fluorescência variável em 100  $\mu s$  (Strasser and Stirbet, 2001); K-band  $V_{OJ} = V_{OK} (F_{300\mu s} - F_0) / (F_{2ms} - F_0)$  - Fluorescência variável em 300  $\mu s$  (Sristava et al., 1997) ; J-step 1 –  $[(F_{2ms} - F_0) / (F_m - F_0)]$  (Strasser et al., 2004); e, IP-phase  $\Delta V_{IP} = (F_m - F_{30ms}) / (F_m - F_0)$  (Oukarroum et al., 2009).

#### 4.2.4 Trocas Gasosas e Índice de Clorofila

Determinação das trocas gasosas foram feitas a partir dos parâmetros de assimilação de  $CO_2$  ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e transpiração ( $E$ ). Para esta etapa da avaliação de produção primária foi utilizado medidor portátil de fotossíntese (IRGA) modelo L*Ci* (ADC, Bio Scientific Ltd. Hoddesdon, England).

A estimativa da eficiência do uso da água ( $WUE \mu mol CO_2 / mmol H_2O$ ) foi determinada como: eficiência intrínseca no uso da água –  $WUE_{int} (A/g_s)$  (Sobrado, 2005, Hao et al., 2009) e eficiência instantânea no uso da água –  $WUE_{ins} (A/E)$  (Krauss et al., 2006).

As medidas de clorofila foram obtidas com medidor portátil eletrônico de índice da clorofila (ClorofiLOG, modelo CFL 1030, Falker). Para isso, em cada folha de *R. mangle* (conforme descrito em material vegetal) foram realizadas três leituras na lâmina foliar e posteriormente calculadas a média das três leituras por folha. O equipamento utiliza fotodiodos emissores em três comprimentos de onda, dois emitem dentro da banda do vermelho, próximos aos picos de cada tipo de clorofila (635nm e 660nm) e um outro no infravermelho próximo (880nm) e um sensor inferior recebe a radiação transmitida através da estrutura foliar (Falker, 2008). Desta forma, o aparelho fornece valores chamados Índice de Clorofila Falker (ICF) proporcionais à absorbância das clorofilas.

As medições de trocas gasosas e índice de clorofila, foram feitas sob condições de luminosidade no período entre 08:00 e 11:00 horas.

#### 4.2.5 Seleção de genes

Foram selecionados cinco genes relacionados ao processo da fotossíntese, quatro genes responsáveis pela detoxificação de espécies reativas de oxigênio e dois genes

implicados no transporte e armazenamento de  $\text{Na}^+$  nos vacúolos (Tabela 4.1). Para serem avaliados os níveis de transcritos em plantas de *R. mangle* crescendo em duas áreas com diferentes níveis de salinidade.

**Tabela 4.1.** Genes selecionados para avaliação da expressão por PCR em tempo real em plantas de *Rhizophora mangle*.

Função	Gene	Descrição
Fotossíntese	<i>psbA</i>	Photosystem II protein D1
	<i>PSBO1</i>	Oxygen evolving enhancer protein 1
	<i>atpA</i>	ATP synthase CF1 alpha subunit
	<i>PGK1</i>	Phosphoglycerate kinase 1
	<i>RCA</i>	Rubisco activase
Defesa antioxidante	<i>DHAR3</i>	Dehydroascorbate reductase 1
	<i>FSD3</i>	Fe superoxide dismutase 3
	<i>CSD2</i>	Cu/Zn superoxide dismutase
Transporte de $\text{Na}^+$	<i>AVA-P4</i>	Vacuolar $\text{H}^+$ -pumping ATPase 16 kDa proteolipid subunit 4
	<i>NHX1</i>	Vacuolar $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiporter

As sequências dos genes selecionados foram extraídas do banco de dados de transcritos de *R. mangle* (<http://mangrove.illinois.edu/transcriptome>) produzido por Dassanayake et al. (2009). As funções previstas para as sequências selecionadas foram confirmadas por meio da busca por genes com alta similaridade de sequências de nucleotídeo no banco de dados do NCBI usando a ferramenta Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### 4.2.6 Seleção e desenho dos primers

Os genes selecionados para este estudo e seus respectivos pares de primers são apresentados na Tabela 4.2. As sequências de nucleotídeos dos genes selecionados foram extraídas do banco de dados de transcritos de *R. mangle* (<http://mangrove.illinois.edu/transcriptome>) produzido por Dassanayake et al. (2009; 2010). As funções previstas para as sequências selecionadas foram confirmadas por meio de busca no banco de dados do NCBI, usando a ferramenta Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), por genes homólogos cujas funções já tenham sido experimentalmente analisadas. Para o desenho dos primers foram utilizados os programas PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e Oligocalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Todos os primers

desenhados para este experimento foram validados quanto à eficiência de amplificação (90-110%).

Na condução dos experimentos de avaliação da expressão dos genes selecionados foi usada a técnica da PCR em tempo real. Para tanto, foram desenhados pares de primers para a amplificação de cada gene de modo a alcançar a temperatura de anelamento de 60°C e fornecer produtos de amplificação em torno de 100pb (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2.** Lista de genes selecionados e primers projetados para a análise da expressão gênica. As seqüências utilizadas foram extraídas do Mangrove Transcriptome Database (The Illinois Mangrove Project) e o número de identificação (ID) é mostrado na tabela.

Symbol	Description	ID	Primer sequence (5'=>3')
<b>Photosynthesis</b>			
<i>psbA</i>	Photosystem II protein D1	844802	(F) CCGAATACACCAGCTACGCC (R) CCTCTAGGAATCTCTGGCACT
<i>PSBO2</i>	Photosystem II subunit O-2; oxygen evolving/ poly(U) binding	824246	(F) GCTAGTGGCAACAGGCAAGC (R) GTTGATCCACCCCGTCCCTT
<i>atpA</i>	ATP synthase CF1 alpha subunit	844790	(F) ACAGCAGTAGCCACAGATAACAATT (R) ACCTGAGCCACAGAAGATGCT
<i>RCA</i>	Rubisco activase	818558	(F) GTCCCCATCATCGTCACTGG (R) TGTCTTCCCTGGTAGGAGCC
<i>PGK1</i>	Phosphoglycerate kinase 1	820461	(F) AGGAGCAAACCTGTCTGCAATTAC (R) CCTGGCAACATCGCTACCTG
<b>Antioxidant defense</b>			
<i>DHAR3</i>	Dehydroascorbate reductase 1	831532	(F) CCTGAAGGCAAAGTACCTGTG (R) TCCCAATGGTGGATCTGGAAAC
<i>FSD3</i>	Iron superoxide dismutase 3	832395	(F) GGAATCAAAATCCTTTTCAATCTGC (R) CTGCTCAGGTCTGGAATCATG
<i>CSD2</i>	Copper/zinc superoxide dismutase 2	817365	(F) GGATGCATTTCAACAGGAGCAC (R) TGTTTCCCAGGTCACCCGC
<i>GAD</i>	Glutamate decarboxylase	831599	(F) GAGCATCAATGTCAGCGGGC (R) ATATGGAAGATGAGTTCTTCAGGC
<b>Vacuolar Na<sup>+</sup> sequestration</b>			
<i>AVA-P4</i>	AVA-P4 vacuolar H <sup>+</sup> -pumping ATPase 16 kDa proteolipid subunit 4	843898	(F) ATGGTTATGCACATCTCTCTTCTG (R) GCATTAGCTCTGACACCAGCAT
<i>NHX1</i>	Na <sup>+</sup> transmembrane transporter/ Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger 1)	832773	(F) GTGGCTTTGATGATACTCATGGC (R) AATCCCGCAGAAGAACAACACTGTG
<b>Reference gene</b>			
<i>EF1α</i>	Elongation factor 1-alpha	836161	(F) AGATGGATGCCACCACCCCA (R) CTTATCCGGGTTGTAACCAACC

A expressão relativa dos genes alvos foi calculada pelo método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), usando dois genes de referência para a normalização e parâmetros (Baseline, Threshold e Threshold cycle) definidos pelo software StepOne v.2.3. A seleção dos genes de

referência mais adequados, ou seja, com os níveis de expressão mais constantes através das amostras, foi feita usando o NormFinder a partir de quatro genes candidatos: *rpl2* (ribosomal protein L2); *TUBG1* (tubulin gamma-1 chain); *TUA4* (tubulin alpha-4 chain); EF-1 $\alpha$  (elongation factor 1-alpha). Esses genes candidatos foram selecionados a partir de trabalhos de expressão gênica em outras espécies, incluindo espécies de mangue (Jing et al., 2015; Peng et al., 2015).

#### **4.2.7 Extração de RNA total de *Rhizophora mangle***

Uma extração de RNA de ótima qualidade é uma etapa essencial para a condução da análise de expressão gênica por PCR em tempo real. Dessa forma, visando obter amostras de RNA total em quantidade e qualidade compatíveis com a técnica da PCR em tempo real, dois métodos de extração de RNA total foram testados usando amostras foliares de *R. mangle* crescendo no bosque de menor salinidade (LS). Foram testados o método Trizol (Life Technologies) e o método CTAB (Doyle e Doyle, 1990) com modificações. A seguir o protocolo utilizado para a extração de RNA total pelo método CTAB é descrito.

##### Método CTAB:

Amostras foliares de *R. mangle* foram maceradas em nitrogênio líquido e para cada 100 mg de amostra macerada adicionou-se 1 ml de tampão CTAB (CTAB 2 %; NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2 %) contendo 4 % de Polivinilpirrodona (PVP). As amostras contendo tampão foram homogeneizadas em vórtex e incubadas à temperatura de 65 °C por 30 min em Thermomixer (Eppendorf) a 450 rpm. Após, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 13000 rpm, sendo em seguida o sobrenadante coletado e submetido a duas séries de 0,6 ml de Clorofórmio e centrifugação a 13000 rpm por 20 min para a retirada de contaminantes protéicos e lipossolúveis. A fase aquosa coletada na etapa anterior foi então submetida à precipitação dos ácidos nucleicos pela adição de Isopropanol na proporção de 1:1 e incubação por 12 horas a -20 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 20 min a 4 °C e o pellet resultante foi lavado em 1 mL de etanol 70% e novamente centrifugado e por fim ressuspendido em 20  $\mu$ l de água MilliQ autoclavada e tratada com DEPC para a inativação das nucleases. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e a qualidade da extração foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5 %.

O método CTAB (Doyle e Doyle, 1990) com modificações mostrou-se o melhor protocolo para a extração do RNA total de folhas de *R. mangle* conforme imagem do gel 1,5% de agarose após eletroforese de 40 min a 80 volts (Figura 4.1). Que permitiu a condução da análise de expressão gênica por PCR em tempo real.



**Figura 4.1.** Resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Para cada metodologia testada, duas repetições foram feitas (R1 e R2).

#### 4.2.8 Análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real

As amostras foliares coletadas foram maceradas em nitrogênio líquido e submetidas à extração de RNA total através do método CTAB (Doyle and Doyle, 1990), acrescido de PVP 4% (m/v) e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2% (v/v). Após a extração, o RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen) de acordo com recomendações do fabricante e quantificado utilizando o kit Qubit RNA BR (Life Technologies). A qualidade e pureza do RNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 2% e também pelas razões de absorvância 260/280 nm e 260/230 nm. A partir de 2  $\mu$ g de RNA, procedeu-se à síntese do cDNA usando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) segundo recomendações do fabricante.

As reações do PCR em tempo real foram montadas usando o sistema Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e realizadas no instrumento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Todos os primers utilizados nesta análise foram sintetizados para a temperatura de anelamento de 60°C e para produzir amplicons em torno de 100pb. O programa de reação utilizado foi o Fast (desnaturação inicial de 15 s a 95°C seguido por 40 ciclos de 3 s a 95°C e 30 s a 60°C e uma desnaturação final de 20 s a 95°C) com a adição do estágio da curva de desnaturação

para verificar a especificidade dos primers. Para cada área em estudo (HS e LS), foram realizadas 4 repetições biológicas acrescidas de replicata técnica. Os níveis relativos de transcritos dos genes alvos foram calculados usando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak and Schmittgen, 2001).

#### **4.2.9 Salinidade**

Vide capítulo 2.

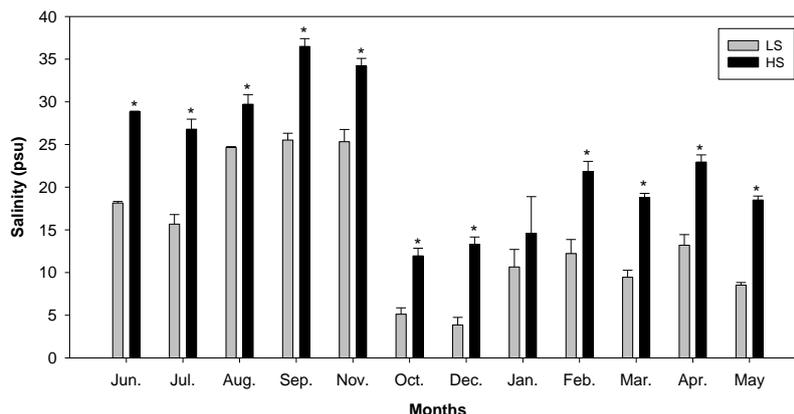
#### **4.2.10 Análise estatística**

Os valores dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* e índice de clorofila e foram analisados estatisticamente por Mann-Whitney U test, para determinar diferenças entre grupos (HS x LS). Para averiguar diferenças entre os valores dos níveis de expressão gênica foi realizado a análise de variância ANOVA (one way), seguido pelo teste de Tukey. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### **4.3 RESULTADOS**

#### **4.3.1 Salinidade**

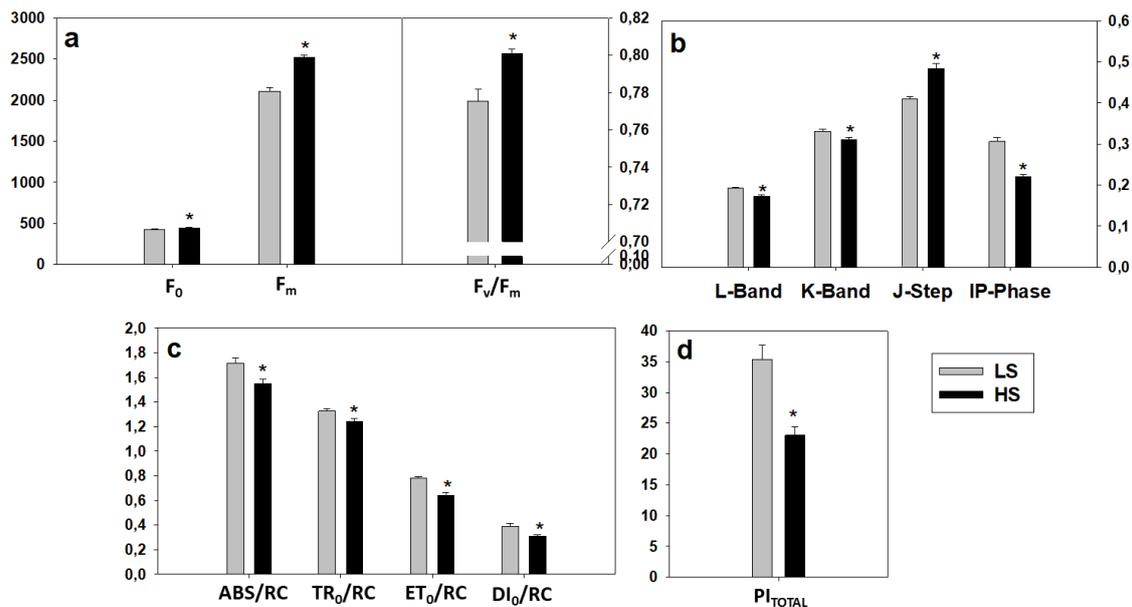
Os níveis de salinidade das áreas de LS e HS foram monitorados mensalmente (Figura 4.2). A salinidade da área de LS variou de 3,8 a 25,3 psu na estação chuvosa (de outubro a março), atingindo uma salinidade máxima de 26,6 psu durante a estação seca (de abril a setembro). A salinidade da área de HS variou de 12 a 34,2 psu na estação chuvosa, atingindo uma salinidade máxima de 36,5 psu durante a estação seca. Assim, a salinidade foi realmente maior na área de HS em comparação com a área de LS durante todo o período de tempo, exceto em janeiro.



**Figura 4.2.** Os níveis de salinidade da área de baixa salinidade (LS) e alta salinidade (HS) monitorados mensalmente. A estação chuvosa (de outubro a março) e a estação seca (de abril a setembro) são exibidas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são destacadas por (\*).

#### 4.3.2 Fluorescência da clorofila *a*

Variações nos parâmetros de intensidade da fluorescência da clorofila *a* entre as áreas de maior e menor salinidade foram analisadas e apresentadas na Figura 4.3. De todos os parâmetros analisados, apenas  $PI_{ABS}$  não diferiu estatisticamente ( $p = 0,248$ ) entre as áreas avaliadas (Figura 4.3D). Os valores de  $F_0$  ( $442,93 \pm 16,42$  SD),  $F_m$  ( $2520,5 \pm 107,4$  SD),  $F_v/F_m$  ( $0,80 \pm 0,008$  SD) assim como os valores de ponto J ( $0,331 \pm 0,01$  SD) foram significativamente maiores na área de maior salinidade, HS (Figura 4.3A). Os valores obtidos para as bandas L ( $0,306 \pm 0,03$  SD) e banda K ( $0,589 \pm 0,02$  SD) e fase IP ( $0,192 \pm 0,006$  SD) (Figura 4.3B) foram significativamente maiores nos indivíduos crescendo na área de menor salinidade (LS). Além disso, plantas da área LS exibiram os maiores valores dos parâmetros de fluxos de energia (Figura 4.3C),  $ABS/RC$  ( $1,71 \pm 0,14$  SD),  $TR_0/RC$  ( $1,32 \pm 0,07$  SD),  $ET_0/RC$  ( $0,78 \pm 0,03$  SD),  $DI_0/RC$  ( $0,39 \pm 0,07$  SD) e do índice de desempenho registrado por  $PI_{TOTAL}$  ( $35,35 \pm 8,00$  SD) (Figura 4.3D).



**Figura 4.3.** Parâmetros derivados do JIP test de transientes da fluorescência da clorofila *a* em folhas adaptadas ao escuro de plantas jovens de *Rhizophora mangle* crescendo em ambiente com salinidade contrastante. (A) Valores descrevem a intensidade de fluorescência inicial ( $F_0$ ), intensidade máxima de fluorescência ( $F_m$ ) e eficiência fotoquímica máxima do PSII. (B) Valores descrevendo as bandas K e L, ponto J e fase IP. (C) Fluxos específicos de energia por centros de reação ativos. (D) Índice de desempenho. Valores são representados como médias  $\pm$  desvio padrão ( $n = 12$ ). Asterisco acima das barras indicam diferença significativa,  $p < 0.05$ .

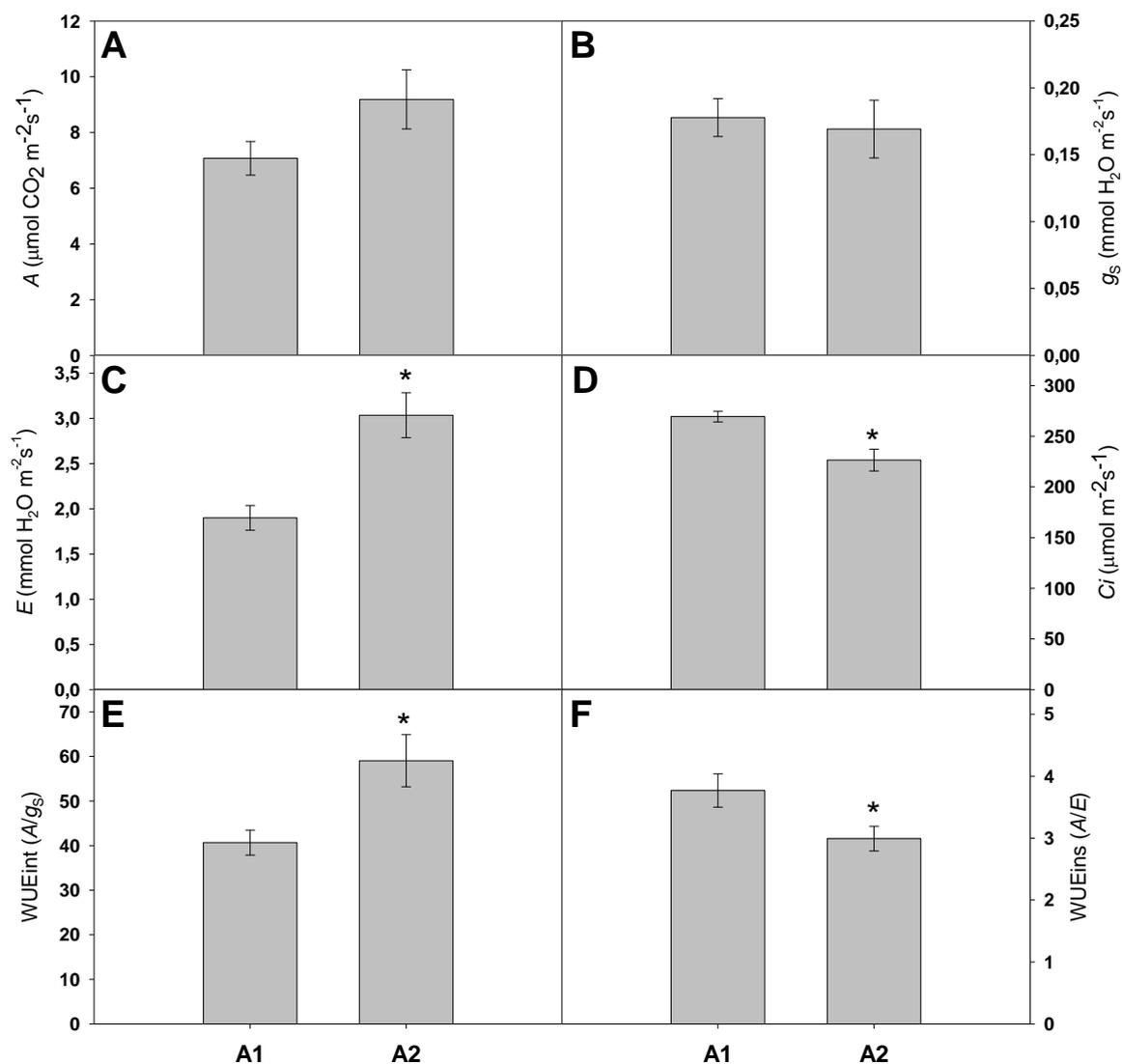
### 4.3.3 Trocas gasosas e Índice de Clorofila

Não houve diferença em  $A$  ( $p = 0,148$ ) e  $g_s$  ( $p = 0,839$ ) entre as áreas de maior e menor salinidade (Figuras 4.4A-B), mas vale ressaltar que a variabilidade entre os parâmetros foi maior nos indivíduos da área de menor salinidade (LS). Nesta área, os valores de  $A$  ( $4,01 - 15,82$ , mínima e máxima, respectivamente) foram muito superiores àqueles registrados nos indivíduos da área HS ( $4,47 - 10,86$ , mínima e máxima respectivamente).

$E$ ,  $C_i$ ,  $WUE_{int}$ ,  $WUE_{ins}$  (Figuras 4.4C-F) diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) entre as áreas avaliadas. Maiores valores de  $E$  ( $3,03 \pm 0,86$  SD) e  $WUE_{int}$  ( $59,03 \pm 20,27$  SD) foram verificados na área LS (Figuras 4.4C-D). Na área de maior salinidade (HS), os parâmetros  $C_i$  e  $WUE_{ins}$  foram significativamente maiores (Figuras 4.4D-F).

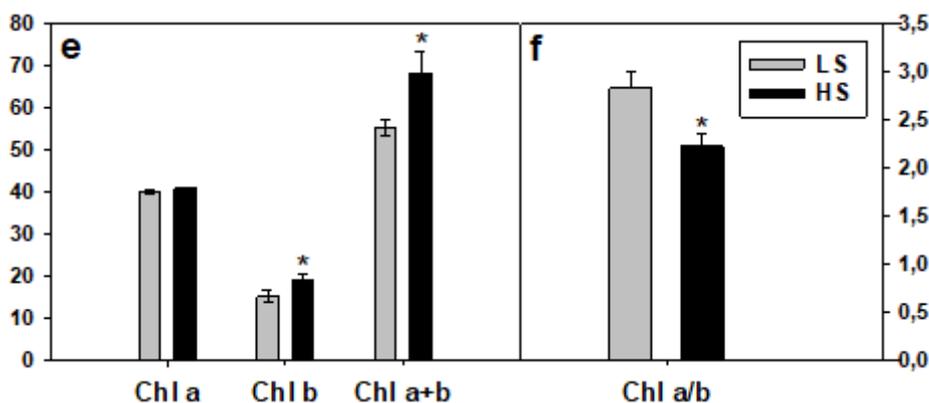
A intensidade luminosa incidente sobre a superfície foliar foi maior nas plantas da área de menor salinidade ( $p < 0,001$ ) com média de  $806 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  ( $\pm 431$  SD) mostrando diferença estatística das médias registradas nos indivíduos crescendo na área de maior salinidade ( $320 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2} \pm 231$  SD). A maior incidência luminosa

registrada em LS refletiu em aumento da temperatura da superfície foliar, cujos valores foram maiores nas plantas desta área ( $39,9\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,83\text{ SD}$ ) comparados com os registrados nas plantas da área de maior salinidade ( $32,2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,79\text{ SD}$ ).



**Figura 4.4.** Trocas gasosas e uso da água de obtidas de plantas jovens de *Rhizophora mangle* em ambientes de maior de menor salinidade. (A) Assimilação de CO<sub>2</sub> (A); (B) Condutância estomática (g<sub>s</sub>); (C) Transpiração (E); (D) Concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>). Valores são representados como médias  $\pm$  desvio padrão (n = 12). Asterisco acima das barras indicam diferença significante,  $p < 0.05$

Os resultados do índice de clorofila mostraram diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) em Chl *b* e Chl (*a+b*) entre as áreas avaliadas (Figura 4.5). Estes índices foram maiores na área de maior salinidade. Por outro lado, a razão Chl (*a/b*) foi maior na área de menor salinidade diferindo estatisticamente dos indivíduos crescendo na área de maior salinidade ( $p < 0,01$ ).



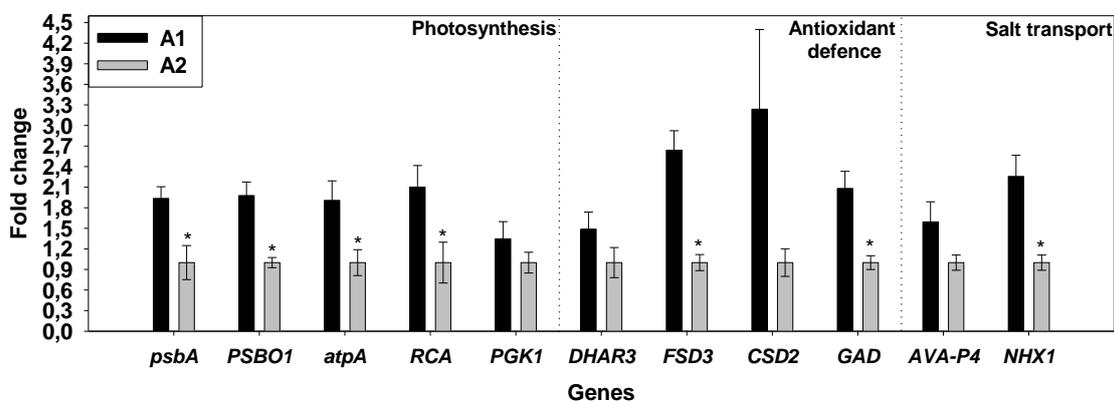
**Figura 4.5.** Valores do índice de clorofila e razão Chl a/b de plantas jovens de *Rhizophora mangle* crescendo em ambiente natural sob maior e menor salinidade. Valores são representados como médias  $\pm$  desvio padrão ( $n = 12$ ). Asterisco acima das barras indicam diferença significativa,  $p < 0.05$ .

#### 4.3.4 Expressão de genes relacionados à fotossíntese, defesa oxidante e transporte de sal

A análise por PCR quantitativa indica que existem diferenças nos níveis desses transcritos quando plantas da área de maior salinidade (HS) são comparadas com aquelas crescendo na área de menor salinidade (LS) (Figura 4.6). Na área HS observa-se maior nível de transcritos de genes essenciais para a formação e função do PSII, tal como a subunidade D1 (codificada pelo gene plastidial *psbA*) e um componente do complexo de evolução de oxigênio (codificado pelo gene nuclear *PSBO2*). O gene *atpA*, que codifica um componente essencial do complexo da ATP sintase plastidial, também teve maior expressão nas plantas crescendo em área de maior salinidade. Além de maior expressão de genes relacionados à etapa fotoquímica da fotossíntese, também encontramos níveis aumentados de transcritos do gene *RCA*, o qual codifica a rubisco ativase que atua como um importante modulador da atividade da rubisco e, conseqüentemente, da etapa de assimilação de carbono. Dos genes relacionados à fotossíntese apenas o gene *PGK1* apresentou níveis equivalentes de transcritos entre as áreas de menor maior salinidade.

Em relação à defesa antioxidante, o nível de transcritos dos genes *FSD3*, que codifica a enzima dissipadora de ROS Fe-superoxide dismutase, foi significativamente maior na área de maior salinidade. Similarmente, encontramos maior expressão do gene *GAD* (codifica a glutamato descarboxilase), o que sugere uma maior síntese de  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) nas plantas crescendo em maior salinidade. Os genes *CSD2* (codifica a Cu-superoxide dismutase) e *DHAR3* (codifica a dehydroascorbate reductase)

não apresentaram diferenças significativas entre as áreas HS e LS, embora as médias dos níveis de transcritos sejam maiores na área mais salina.



**Figura 4.6.** Análise quantitativa em tempo real por PCR de genes relacionados à fotossíntese, defesa antioxidante e sequestro de Na<sup>+</sup> vacuolar em plantas jovens de *Rhizophora mangle* crescendo nas áreas de menor e maior salinidade. A expressão gênica relativa é dada como *fold expression change* usando a equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (EF1 $\alpha$  como gene de referência). Os dados são apresentados como média  $\pm$  SE (n = 4). As diferenças significativas (p < 0,05) são destacadas por (\*).

Em relação aos genes envolvidos no transporte de sal, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de transcritos que codificam a bomba de prótons vacuolar (gene *AVA-P4*), importante para o acúmulo ativo de prótons no vacúolo, o qual é essencial para o transporte ativo secundário de solutos para o interior dos vacúolos, incluindo íons de sódio. Contudo, a expressão do transportador de Na<sup>+</sup> (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger), codificado pelo gene *NHX1*, foi significativamente maior nas plantas da área de maior salinidade.

## 4.4 DISCUSSÃO

### 4.4.1 Melhoria do fotossistema II é induzida em plantas de *R. mangle* como mecanismo de tolerância ao sal

Os dados aqui obtidos, relacionados às trocas gasosas, mostram que as plantas de *R. mangle* crescendo em ambas as áreas de manguezal, de alta e baixa salinidade, apresentam taxas de assimilação de CO<sub>2</sub> e de condutância estomática comparáveis. Resultados semelhantes foram relatados por Naidoo et al. (2002) na espécie relacionada *B. gymnorrhiza* (Rhizophoraceae) crescendo em áreas de mangue com diferentes níveis de salinidade. Ambos os resultados sugerem que estas espécies de mangue da família Rhizophoraceae são capazes de manter um desenvolvimento similar e acumulação de

biomassa numa ampla gama de salinidade. Sabe-se que a alta concentração de sal pode causar vários efeitos nocivos nas plantas, como toxicidade iônica, estresse osmótico e oxidativo (Yang and Guo 2018). Portanto, a manutenção da habilidade em plantas de *R. mangle* sob diferentes condições de sal, sugere a ocorrência de um mecanismo eficiente de tolerância ao sal nesta espécie.

A assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> é diretamente influenciada pelos níveis de NADPH e ATP, que são fornecidos pela cadeia de transporte de elétrons (CTE) nos cloroplastos e ATP-sintase (Heldt and Piechulla, 2011). A CTE inclui alguns complexos de proteínas de membrana que são suscetíveis ao dano oxidativo e à regulação redox, como o fotossistema II (FSII) (Järvi et al., 2015). A análise da fluorescência da clorofila *a* aqui exposta indica um ajuste do desempenho do FSII nas plantas de *R. mangle* crescendo na área de maior salinidade (HS). A melhoria da função do FSII é sugerida pelo valor mais alto de Fv/Fm, que estimam a máxima eficiência quântica do FSII (Baker and Oxborough, 2004). Isto indica um aumento na fração de centros reação ativos (RCs) do FSII nas plantas que crescem sob alta salinidade. Que é corroborado pelos valores significativamente menores de L-Band e K-Band que também sugeriram um melhor desempenho do FSII sob alta salinidade. A banda L estima a conectividade entre as unidades FSII e uma diminuição de seu valor indica estabilidade e conectividade de unidades PSII (Lin et al. 2009; Yusuf et al. 2010). Por outro lado, a banda K está relacionada à inativação do complexo de evolução do oxigênio (CEO) do FSII (Strasser et al. 2004), e os valores reduzidos de K-band encontrados aqui nas plantas sob alta salinidade também estão associados com a melhoria da estabilidade do CEO. Em conjunto, estes resultados destacam a atividade do FSII como um importante alvo de regulação da tolerância ao sal em plantas de *R. mangle*.

O FSII é um complexo composto por pelo menos vinte subunidades diferentes codificadas pelos genomas nucleares e plastidiais (Heldt and Piechulla, 2011). A proteína D1, codificada pelo gene *psbA* no genoma do plastídio, é uma subunidade essencial do RC e o principal alvo do dano oxidativo (Järvi et al., 2015). Assim, uma renovação eficiente da proteína D1 danificada contribui significativamente para a estabilidade do FSII, manutenção de RCs ativos e tolerância ao estresse oxidativo (Nixon et al., 2010; Suo et al., 2017). Com base em nossos dados de análise qRT-PCR, o nível de transcritos de *psbA* nas plantas de *R. mangle* sob alta salinidade apresentou um aumento de duas vezes em comparação com a expressão sob baixa salinidade. Isto sugere um papel importante da regulação transcricional do gene *psbA* para aumentar a

disponibilidade do pool de transcrito *psbA* para a renovação da proteína D1 sob alta salinidade. O estado redox do *pool* de PQ é o principal sinal de regulação para a expressão do gene *psbA*, uma vez que se a maior parte da fração do pool PQ é oxidada, a transcrição do gene *psbA* é induzida (Allen and Pfannschmidt, 2000). Portanto, é possível que um aumento na oxidação da CTE possa ocorrer em plantas de *R. mangle* sob alta salinidade, induzindo a expressão do gene *psbA*. Consequentemente, espera-se também que um maior dreno de poder redutor ocorra nos cloroplastos de plantas de *R. mangle* sob alta salinidade, o que é suportado pela manutenção da assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> e o aumento de vias antioxidantes (discutido em detalhes abaixo).

Além do papel essencial da regulação do gene *psbA* para a estabilidade do PSII sob alta salinidade, o CEO também é um alvo para a regulação, como indicado pelos valores de K-Band. No CEO ocorre a oxidação da água, e seu funcionamento adequado é essencial para evitar a formação de radicais de oxigênio (Suorsa and Aro, 2007; Liu et al., 2007; Heldt and Piechulla, 2011). Foi constatado que a regulação positiva de subunidades do CEO ocorre em espécies de mangue sob estresse salino moderado (Tada and Kashimura, 2009; Wang et al., 2014, 2015). No entanto, a regulação negativa é observada em plantas que crescem sob estresse salino severo (Sugihara et al. 2000; Wang et al., 2014). No presente estudo foi relatado uma tendência para a estabilização do CEO em plantas de *R. mangle* crescendo sob alta salinidade (menor K-Band). A melhoria no CEO, aqui observada, pode ser resultado de uma capacidade eficiente de reparar lesões através da síntese *de novo* de novas subunidades, que mantêm eficientemente a reação de evolução de oxigênio (Tada and Kashimura, 2009; Wang et al., 2014). Com base em nossa análise gênica de expressão, a expressão do gene *PSBO2*, que codifica uma subunidade do OEC, aumentou significativamente em plantas de *R. mangle* sob alta salinidade. Assim, a indução transcricional de subunidades de CEO parece ter um papel importante na sua capacidade de rotatividade e consequentemente na aptidão das plantas de suportar condições de alta salinidade.

A melhoria do FSII em *R. mangle* sob alta salinidade também é sugerida pelos dados observados de fluxos de energia. Todos os fluxos específicos de energia por RC (Strasser et al., 2004), incluindo a absorção de fótons, energia aprisionada (a energia canalizada para o RC), transporte de elétrons e fluxos de energia dissipada (ABS/RC, TR<sub>0</sub>/RC, ET<sub>0</sub>/RC, e DI<sub>0</sub>/RC, respectivamente), diminuíram sob alta salinidade em plantas de *R. mangle*. O aumento do número de RCs ativos parece ser a melhor explicação para esses resultados (Strasser et al., 2004; Mehta et al., 2010; Oukarroum et

al., 2015), já que todos os fluxos de energia diminuíram em uma taxa similar (0,8-0,9). Além disso, o aumento dos valores de  $DI_0/RC$  sob baixa salinidade pode ser explicado devido ao aumento do *quenching* não-fotoquímico (Kalaji et al., 2011) como resposta à alta irradiância na área de menor salinidade HS, enquanto as plantas analisadas da área de maior salinidade LS foram mais adaptadas à sombra. Da mesma forma, a temperatura da folha foi maior sob baixa salinidade (como resposta à alta irradiância), o que resultou em uma maior taxa de transpiração e diminuição da *WUE*. Nossos dados corroboram com outros resultados previamente reportados para plantas de *R. mangle* no sul do Brasil (Soares et al., 2015). Além disso, outros relatórios mostraram uma melhor adaptação das plantas de mangue à alta salinidade sob baixa irradiância (Kitao et al., 2003; López-Hoffman et al., 2006). Pelo menos parte dessa preferência por áreas sombreadas pode estar relacionada ao aumento do *WUE*, que é um importante fator de tolerância ao sal nas plantas de mangue (Ball, 1996; Sobrado, 2005), e a diminuição do fotodano no FSII.

Curiosamente, embora as plantas de *R. mangle* pareçam ter um FSII melhorado sob alta salinidade, quando o desempenho da CTE total (de PSII para PSI) é inferido com base nos dados de  $PI_{TOTAL}$  (Oukarroum et al., 2015), o desempenho das plantas é diminuído se comparado com plantas de *R. mangle* sob baixa salinidade. A diminuição do  $PI_{TOTAL}$  pode ser explicada pela redução da atividade FSI sob estresse salino. Além disso, plantas de *R. mangle* sob alta salinidade apresentaram maior valor de J-Step, que estima a taxa de redução do lado acceptor no PSII (Chen et al., 2014; Zhang et al., 2015), e menor IP- Fase, que estima a taxa de redução do acceptor final no PSI (Cascio et al., 2010; Desotgiu et al., 2013), que, juntos, pode ser um indicativo de diminuição na atividade do PSI. Ainda, plantas de *R. mangle* diminuíram os valores da relação clorofila a/b sob alta salinidade, o que é relatado como relacionado à diminuição de unidades do FSI em comparação com o número de unidades do FSII (Fan et al., 2007). Assim, a diminuição da atividade do FSI sob alta salinidade pode ser explicada, pelo menos parcialmente, pela regulação negativa das transcrições das subunidades FSI. Esta regulação negativa tem sido relatada como induzida pelo aumento na oxidação da CTE, que, em contrapartida, induz a regulação positiva do FSII, especialmente o gene *psbA* (Allen and Pfannschmidt, 2000; nossos dados relacionados à expressão de *psbA* discutida acima).

Finalmente, com base nos dados coletados e aqui discutidos, a alta salinidade induz em plantas de *R. mangle* a melhora da atividade do FSII, incluindo uma eficiente

renovação de subunidades essenciais do RC e do CEO. Assim, uma melhora do FSII pode suportar uma produção adequada de NADPH e ATP, possibilitando a assimilação de CO<sub>2</sub> fotossintética e outras reações essenciais nos cloroplastos e, conseqüentemente, a capacidade das plantas de *R. mangle* crescer e se desenvolver sob alta salinidade.

#### **4.4.2 Melhoria do fornecimento de ATP e ativação eficiente do RubisCO parece ser necessária para a tolerância ao sal em plantas de *R. mangle***

A síntese de ATP em cloroplastos é realizada pela ATP sintase (CF<sub>0</sub>-CF<sub>1</sub>) em um processo chamado fotofosforilação. As subunidades da ATP sintase do cloroplasto são codificadas pelos genomas nucleares e plastidiais (Heldt and Piechulla, 2011; Tikhonov, 2013). Relatórios anteriores baseados em análises proteômicas demonstraram o aumento da abundância de algumas subunidades da ATP sintase nas plantas de mangue *K. candel* sob estresse salino (Wang et al., 2014, 2015). Similarmente, regulação positiva da ATP sintase do cloroplasto foi relatada em espécies de cultiváveis baseadas em análises transcriptômicas e proteômicas (Mirzaei et al., 2018; Zörb et al., 2004). Assim, o aumento da síntese de ATP parece ser uma resposta comum ao estresse salino e tem sido associado ao aumento da necessidade de energia para sustentar o crescimento e o desenvolvimento sob condições de estresse (Wang et al., 2015). De acordo com esses estudos, nossa análise da expressão gênica também mostra uma regulação positiva do gene *atpA*, que codifica uma subunidade essencial da ATP sintase do cloroplasto em plantas de *R. mangle* que crescem na área de maior salinidade HS. Como o ciclo de Calvin é o maior dreno de ATP nos cloroplastos, também investigamos a expressão no nível de transcrição do gene que codifica uma enzima que utiliza ATP como substrato nesse ciclo, a fosfoglicerato quinase (gene *PGKI*). O nível de transcritos de *PGKI* não se alterou em ambas as áreas neste estudo, o que poderia indicar uma taxa semelhante de atividade do ciclo de Calvin. No entanto, é difícil afirmar essa regulamentação com base apenas em dados transcricionais, porque o ciclo de Calvin é fortemente regulado pós-tradução (Heldt and Piechulla 2011).

Outro dreno de ATP nos cloroplastos é a enzima RubisCO ativase. A RubisCO ativase, após o consumo de ATP, libera fosfatos inibitórios de açúcar a partir do sítio ativo de RubisCO, permitindo a carbamilação e ativação do RubisCO livre (Bhat et al., 2017; Heldt and Piechulla, 2011). Com base em nossa análise de expressão, a transcrição do gene *RCA*, que codifica a enzima RubisCO, foi regulada positivamente em plantas de *R. mangle* crescendo na área de maior salinidade. A expressão positiva de

RubisCO activase sob estresse salino foi relatada em outras espécies, incluindo plantas de mangue *K. candel* (Wang et al., 2015). Nesse sentido, o aumento da demanda de ATP sob estresse salino está relacionado, pelo menos em parte, à necessidade de suprimento de energia para o aumento da atividade da RubisCO activase. Além disso, o aumento da atividade da enzima RubisCO pode sugerir que as vias espontâneas de inibição do RubisCO durante o processo de fotossíntese (Parry et al., 2008; Zhu and Jensen, 1991) são superexpressadas sob condições de estresse salino.

#### **4.4.3 A expressão de genes relacionados ao sequestro de Na<sup>+</sup> vacuolar, dissipação de ROS e síntese de GABA aumentou em plantas de *R. mangle* crescendo sob alta salinidade**

Em condições de alta salinidade, a célula vegetal pode sofrer toxicidade iônica devido às altas concentrações de Na<sup>+</sup> no citoplasma, o que resulta em efeitos secundários, como rompimento dos balanços de nutrientes e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS). Para evitar ou mitigar esses efeitos, várias vias regulatórias evoluíram em células vegetais para controlar a absorção de Na<sup>+</sup>, transporte e compartimentação do Na<sup>+</sup> citoplasmático em vacúolos, uma região metabólica inativa (Liang et al., 2018; Yang and Guo, 2018). A compartimentalização vacuolar de Na<sup>+</sup> é realizada principalmente por um antiportador vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, que é um transporte ativo secundário dirigido por um gradiente de prótons gerado por H<sup>+</sup>-ATPases vacuolares e H<sup>+</sup>-piperofosfatases (Yang and Guo, 2018). O gene *NHX1* codifica um antiportador vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, que é induzido em resposta à salinidade e foi relacionado para aumentar a tolerância ao sal em várias espécies (Banjara et al., 2012; He et al., 2005; Xue et al., 2004; Zhang and Blumwald, 2001). As plantas de *R. mangle* analisadas mostraram uma regulação positiva do gene *NHX1* sob alta salinidade. Isso sugere uma indução da compartimentalização do Na<sup>+</sup> no vacúolo, que é importante para evitar a toxicidade iônica e o ajuste osmótico em plantas de *R. mangle*, uma vez que as espécies da família Rhizophoraceae não apresentam glândulas salinas para a secreção de sal (Flowers and Colmer, 2008). Nas plantas de *R. mangle*, o Na<sup>+</sup> acumula-se nos vacúolos das folhas até a senescência e é eliminado das plantas pela abscisão foliar (Teas, 1979; Werner and Stelzer, 1990). Embora um aumento na atividade da H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar tenha sido relatado em outras espécies de manguezais, como *K. candel*, durante um estresse salino de curto prazo (Wang et al. 2014), não observamos diferenças significativas nas transcrições do gene *AVA-P4* (codifica uma subunidade da

H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar) de plantas de *R. mangle* sob diferentes salinidades. No entanto, a atividade vacuolar da H<sup>+</sup>-ATPase em plantas de *R. mangle* sob estresse salino a longo prazo pode ser regulada por eventos pós-transcricionais e/ou pós-traducionais, que controlaria a força motora de prótons necessária para o sequestro de Na<sup>+</sup> vacuolar.

Além do aumento da atividade de sequestro vacuolar de Na<sup>+</sup>, também relatamos uma melhora do sistema de defesa antioxidante em cloroplastos de plantas de *R. mangle* sob alta salinidade, que é baseada na análise de expressão gênica. No geral, a produção de ROS é aumentada durante o estresse salino, o que pode danificar severamente os componentes da célula. Assim, um sistema de resposta antioxidante eficaz é um importante mecanismo de tolerância ao sal (Liang et al., 2018; Yang and Guo, 2018). A enzima superóxido dismutase (SOD) atua como primeira linha de defesa, catalisando a dismutação do radical superóxido em peróxido de oxigênio e água (Heldt and Piechulla, 2011; Prashanth et al., 2008). Em condição de alta salinidade, os transcritos dos genes *CSD2* e *FSD3* (que codificam Cu-SOD e Fe-SOD do cloroplasto, respectivamente), aumentaram nas plantas de *R. mangle*. No entanto, apenas os transcritos do gene *FSD3* mostram um aumento significativo, enquanto os transcritos do gene *CSD2* mostraram alta variação do nível de expressão sob a condição de alta salinidade. Curiosamente, a Fe-SOD também foi a principal SOD induzida sob condições de estresse salino na espécie de mangue *Bruguiera parviflora* (Rhizophoraceae) (Parida et al., 2004). A expressão induzida de SODs foi relatada como uma resposta ao estresse salino em plantas de *K. candel* (Wang et al., 2014, 2015), e sua expressão positiva em plantas de tabaco aumentou a tolerância à salinidade (Jing et al., 2015). Em plantas de *K. candel*, o estresse salino também induziu o aumento de enzimas relacionadas à produção de compostos de eliminação de ROS não enzimáticos, como ascorbato e glutatona (Wang et al., 2014, 2015). Em plantas de *R. mangle*, o nível de transcrito do gene *DHAR3* (codifica uma redutase de desidroascorbato implicada na biossíntese de ascorbato) não se alterou significativamente entre as duas áreas analisadas, o que pode indicar um papel importante da regulação pós-traducional na produção de ascorbato.

Por fim, o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) tem sido relatado como uma molécula de sinalização para várias respostas fisiológicas, incluindo proteção contra danos oxidativos e adaptação a vários estresses abióticos (por exemplo, estresse salino) (Liu et al., 2011; Wang et al., 2017). A biossíntese do GABA é catalisada pela enzima glutamato descarboxilase (GAD), que é aumentada em condições que exigem adaptação da planta ao estresse salino e osmótico (Al-Quraan et al., 2013). Similarmente,

relatamos uma expressão aumentada do gene GAD em plantas de *R. mangle* sob alta salinidade. Wang et al. (2015) também relataram um aumento no nível de proteína GAD em plantas de *K. candel* sob estresse salino. Portanto, o aumento da biossíntese de GABA parece ser um importante mecanismo de tolerância ao sal nas espécies de mangue, que é pelo menos parcialmente regulado transcricionalmente.

#### 4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, baseado em várias análises, como troca gasosa foliar, índice de clorofila, fluorescência da clorofila *a* e expressão gênica, foram relatadas algumas vias implicadas no mecanismo de tolerância ao sal das plantas de *R. mangle*. De acordo com nossos dados, uma melhoria da atividade PSII foi induzida nas plantas que crescem na área de maior salinidade HS, incluindo o aumento de RCs ativos e CEOs estáveis. Um aumento dos transcritos de *psbA* e *PSBO2* sugere fortemente uma regulação positiva transcricional dos componentes RC e CEO sob estresse salino. A regulação positiva dos transcritos de *atpA* também sugere um aumento da síntese de ATP sob alta salinidade para suprir a crescente demanda de energia. Um exemplo de demanda de energia é a ativação da enzima RubisCO pela RubisCO activase, que mostra um aumento no nível de transcrição sob alta salinidade. Nossa análise da expressão gênica também indica a melhoria do processo vacuolar de sequestro de  $\text{Na}^+$  para evitar a toxicidade dos íons sob o aumento da captação de sal ( $\text{Na}^+$ ). Além disso, os genes envolvidos na eliminação de ROS e na biossíntese de GABA também foram positivamente regulados. Portanto, a melhoria do sistema de defesa antioxidante também é uma estratégia importante empregada pelas plantas de *R. mangle* para lidar com altas concentrações de  $\text{Na}^+$ . Entendemos que, embora a salinidade tenha grande influência nos processos fotossintéticos, existem outros fatores que também atuam como reguladores. Por outro lado, caracterizamos aqui vários genes e mecanismos envolvidos na tolerância ao sal em plantas de *R. mangle* em condições naturais de campo. No entanto, nosso estudo procura destacar o papel da salinidade como um importante regulador do solo e essa perspectiva contribuirá para o gerenciamento de situações em que ocorrerão mudanças nos regimes de precipitação, evaporação e vazão dos rios, como as relacionadas às mudanças climáticas.

## 4.6 REFERÊNCIAS

Allen, J.F., Pfannschmidt, T., 2000. Balancing the two photosystems: photosynthetic electron transfer governs transcription of reaction centre genes in chloroplasts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355, 1351-1359. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0697>

Al-Quraan, N.A., Sartawe, F.A.B., Qaryouti, M.M., 2013. Characterization of  $\gamma$ -aminobutyric acid metabolism and oxidative damage in wheat (*Triticumaestivum* L.) seedlings under salt and osmotic stress. *J Plant Physiol.* 170, 1003–1009. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.02.010>

Baker, N.R., Oxborough, K., 2004. Chlorophyll Fluorescence as a Probe of Photosynthetic Productivity. In: Papageorgiou GC, Govindjee (ed) *Chlorophyll a Fluorescence. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 19. Springer, Dordrecht, pp 65-82. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_3)

Ball, M.C., 1988. Ecophysiology of mangroves. *Trees.* 2, 129-142. <https://doi.org/10.1007/BF00196018>

Ball, M.C., 1996. Comparative ecophysiology of mangrove forest and tropical lowland moist rainforest. In: Mulkey SS, Chazdon RL, Smith AP (ed) *Tropical Forest Plant Ecophysiology*. Springer, Boston, pp 461-496. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1163-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1163-8_16)

Banjara, M., Zhu, L., Shen, G., Payton, P., Zhang, H., 2012. Expression of an *Arabidopsis* sodium/proton antiporter gene (*AtNHX1*) in peanut to improve salt tolerance. *Plant Biotechnol Rep.* 6, 59–67. <https://doi.org/10.1007/s11816-011-0200-5>

Barbier, E.B., 2016. The protective service of mangrove ecosystems: A review of valuation methods. *Mar Pollut Bull.* 109, 676–681. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.033>

Bernini, E., Silva, M.A., Carmo, T.M.S. and Cuzzuol, G.R.F., 2006. Composição de folhas das espécies do manguezal do estuário do rio São Mateus, Espírito Santo, Brasil. *Revista Brasileira Botânica.* 29(4), 689-699.

Bhat, J.Y., Thieulin-Pardo, G., Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M., 2017. Rubisco Activases: AAA+ Chaperones Adapted to Enzyme Repair. *Front Mol Biosci.* 4, 20. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00020>

Bompy, F., Lequeue, G., Imbert, D., Dulormne, M., 2014. Increasing fluctuations of soil salinity affect seedling growth performances and physiology in three Neotropical mangrove species. *Plant Soil*. 380- 399. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2100-2>

Cascio, C., Schaub, M., Novak, K., Desotgiu, R., Bussotti, F., Strasser, R.J., 2010. Foliar responses to ozone of *Fagus sylvatica* L. seedlings grown in shaded and in full sunlight conditions. *Environ Exp Bot*. 68, 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.10.003>

Chen, S., Strasser, R.J., Qiang, S., 2014. In vivo assessment of effect of phytotoxin tenuazonic acid on PSII reaction centers. *Plant Physiol Biochem*. 84, 10-21. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.09.004>

Chen, Y., Ye, Y., 2014. Effects of Salinity and Nutrient Addition on Mangrove *Excoecaria agallocha*. – *Plos One*.: doi: [10.1371/journal.pone.0093337](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093337), 2014.

Dangremond, E.M., Feller, I.C., Sousa, W.P., 2015. Environmental tolerances of rare and common mangroves along light and salinity gradients. *Oecologia*. 179,1187–1198. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3408-1>

Dassanayake, M., Haas, J.S., Bohnert, H.J., Cheeseman, J.M., 2009. Shedding light on an extremophile lifestyle through transcriptomics. *New Phytologist*. 183, 764–775. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02913.x>

Dassanayake, M., Haas, J.S., Bohnert, H.J., Cheeseman, J.M., 2010. Comparative transcriptomics for mangrove species: an expanding resource. *Funct Integr Genomics*. 10, 523–532. <https://doi.org/10.1007/s10142-009-0156-5>

Desotgiu, R., Pollastrini, M., Cascio, C., Gerosa, G., Marzuoli, R., Bussotti, F., 2013. Responses to ozone on *Populus* “Oxford” clone in an open top chamber experiment assessed before sunrise and in full sunlight. *Photosynthetica*. 51, 267–280. <https://doi.org/10.1007/s11099-012-0074-y>

Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12, 13-15.

Duke, N.C., Allen, J.A., 2002. *Rhizophora mangle*, *R. samoensis*, *R. racemosa*, *R. × harrisonii* (AtlanticEast Pacific red mangroves), Version 1. In: C.R. Elevitch (Ed.). *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*, url: <http://www.traditionaltree.org>. Permanent Agriculture Resources (PAR), Hōlualoa, Hawaii.

Falqueto, A.R., Silva, D.M., Fontes, R.V., 2008. Photosynthetic performance of mangroves *Rhizophora mangle* and *Laguncularia racemosa* under field conditions. *Revista Árvore*. 32(3), 577-582.

Fan, D.Y., Hope, A.B., Smith, P.J., Jia, H., Pace, R.J., Anderson, J.M., Chow, W.S., 2007. The stoichiometry of the two photosystems in higher plants revisited. *Biochim Biophys Acta* 1767:1064–1072. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.001>

Farnworth, E.J., Ellison, A.M., Gong, W.K., 1996. Elevated CO<sub>2</sub> alters anatomy, physiology, growth, and reproduction of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.). *Oecologia*. 108, 599-609.

Flowers, T.J., Colmer, T.D., 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol.* 179, 945-963. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x>

Guo, W., Wu, H., Zhang, Z., Yang, C., Hu, L., Shi, X., Jian, S., Shi, S., Huang, Y., 2017. Comparative Analysis of Transcriptomes in Rhizophoraceae Provides Insights into the Origin and Adaptive Evolution of Mangrove Plants in Intertidal Environments. *Front Plant Sci.* 8, 795. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00795>

Hao, G., Jones, T.J., Luton, C., Zhang, Y.J., Manzane, E., Scholz, F.G., Bucci, S.J., Cao, K.F., Goldstein, G., 2009. Hydraulic redistribution in dwarf *Rhizophora mangle* trees driven by interstitial soil water salinity gradients: impacts on hydraulic architecture and gas exchange. *Tree Physiol*, 29, 697–705. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpp005>

He, C., Yan, J., Shen, G., Fu, L., Holaday, A.S., Auld, D., Blumwald, E., Zhang, H., 2005. Expression of an Arabidopsis vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field. *Plant Cell Physiol.* 46, 1848–1854. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci201>

Heldt, H.W., Piechulla, B., 2011. *Plant Biochemistry*, 4rd edn. Academic Press, Elsevier.

Järvi, S., Suorsa, M., Aro, E.M., 2015. Photosystem II repair in plant chloroplasts--Regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1847, 900–909. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.01.006>

Jing, X., Hou, P., Lu, Y., Deng, S., Li, N., Zhao, R., Sun, J., Wang, Y., Han, Y., Lang, T., Ding, M., Shen, X., Chen, S., 2015. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase from mangrove *Kandelia candel* in tobacco enhances salinity tolerance by the

reduction of reactive oxygen species in chloroplast. *Front Plant Sci.* 6, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00023>

Kalaji, H.M., Govindjee, Bosa, K., Koscielniak, J., Zuk-Gołaszewskae, K., 2011. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO<sub>2</sub> assimilation of two Syrian barley landraces. *Environ Exp Bot.* 73, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.009>

Kitao, M., Utsugi, H., Kuramoto, S., Tabuchi, R., Fujimoto, K., Lihpai, S., 2003. Light-dependent photosynthetic characteristics indicated by chlorophyll fluorescence in five mangrove species native to Pohnpei Island, Micronesia. *Physiol Plant.* 117, 376–382. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00042.x>

Krauss, K.W., Twilley, R.R., Thomas, W., Doyle, T.W., Gardiner, E.S., 2006. Leaf gas exchange characteristics of three neotropical mangrove species in response to varying hydroperiod. *Tree Physiol.* 26, 959–968. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.7.959>

Lara, R.J., Cohen, M.C.L., 2006. Sediment porewater salinity and mangrove vegetation height in Bragança, North Brazil: an ecohydrology-based empirical model. *Wetl Ecol Manag* 14: 349–358.

Li, N., Chen, S., Zhou, X., Li, C., Shao, J., Wang, R., Fritz, E., Hüttermann, A., Polle, A., 2008. Effect of NaCl on photosynthesis, salt accumulation and ion compartmentation in two mangrove species, *Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*. *Aquatic Botany.* 88, 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.12.003>

Liang, W., Ma, X., Wan, P., Liu, L., 2018. Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochem Biophys Res Commun.* 495, 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.043>

Lima, K.O.O., Tognella, M.M.P., Cunha, S.R., De Andrade, H.A., 2018. Growth models of *Rhizophora mangle* L. seedlings in tropical southwestern Atlantic. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 207, 154-163.

Lin, Z.H., Chen, L.S., Chen, R.B., Zhang, F.Z., Jiang, H.X., Tang, N., 2009. CO<sub>2</sub> assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test of tea leaves in response to phosphorus supply. *BMC Plant Biol.* 9, 43–51. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-43>

Liu, C., Zhao, L., Yu, G., 2011. The dominant glutamic acid metabolic flux to produce gamma-amino butyric acid over proline in *Nicotiana tabacum* leaves under

water stress relates to its significant role in antioxidant activity. *J Integr Plant Biol.* 53, 608–618. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01049.x>

Liu, H., Frankel, L.F., Bricker, T.M., 2007. Functional Analysis of Photosystem II in a PsbO-1-Deficient Mutant in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry.* 46, 7607-7613. <https://doi.org/10.1021/bi700107w>

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$  method. *Methods.* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

López-Hoffman, L., DeNoyer, J.L., Monroe, I.E., Shaftel, R., Anten, N.P.R., Martínez-Ramos, M., David, D., Ackerly, D.D., 2006. Mangrove Seedling Net Photosynthesis, Growth, and Survivorship are Interactively Affected by Salinity and Light. *Biotropica.* 38(5), 606–616. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2006.00189.x>

Lovelock, C.E., Feller, I.C., 2003. Photosynthetic performance and resource utilization of two mangrove species coexisting in a hypersaline scrub forest. *Oecologia.* 134, 455-46. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-1118-y>

Lovelock, C.E., Reef, R., Ball, M.C., 2017. Isotopic signatures of stem water reveal differences in water sources accessed by mangrove tree species. *Hydrobiologia.* 803, 133–145. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3149-8>

Luzhen, C., Wenqing, W., Peng, L., 2005. Photosynthetic and physiological responses of *Kandelia candel* I. Druce seedlings to duration of tidal immersion in artificial seawater. *Environmental and Experimental Botany.* 54, 256-266. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.09.004>

Mehta, P., Jajoo, A., Mathur, S., Bharti, S., 2010. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiol Biochem* 48, 16-20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.10.006>

Mirzaei, S., Mansouri, M., Mohammadi-Nejad, G., Sablok, G., 2018. Comparative assessment of chloroplast transcriptional responses highlights conserved and unique patterns across Triticeae members under salt stress. *Photosynth Res.* 136, 357-369. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0469-5>

Naidoo, G., Hiralal, O., Naidoo, Y., 2011. Hypersalinity effects on leaf ultrastructure and physiology in the mangrove *Avicennia marina*. *Flora.* 206, 814– 820. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2011.04.009>

Naidoo, G., Tuffers, A.V., Von Willert, D.J., 2002. Changes in gas exchange and chlorophyll fluorescence characteristics of two mangroves and a mangrove

associate in response to salinity in the natural environment. *Trees*. 16, 140-146.  
<https://doi.org/10.1007/s00468-001-0134-6>

Nixon, P.J., Michoux, F., Yu, J., Boehm, M., Komenda, J., 2010. Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *An. Bot.* 106, 1–16. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq059>

Oukarroum, A., Bussotti, F., Goltsev, V., Kalaji, H.M., 2015. Correlation between reactive oxygen species production and photochemistry of photosystems I and II in *Lemna gibba* L. plants under salt stress. *Environ Exp Bot.* 109, 80–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.08.005>

Oukarroum, A., Schansker, G., Strasser, R.J., 2009. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiology Plant.* 137, 188-199. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01273.x>

Parida, A.K., Das, A.B., Mohanty, P., 2004. Investigations on the antioxidative defence responses to NaCl stress in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential regulations of isoforms of some antioxidative enzymes. *Plant Growth Regul.* 42, 213–226. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000026508.63288.39>

Parida, A.K., Jha, B., 2010. Salt tolerance mechanisms in mangroves: a review. *Trees* 24:199-217. <https://doi.org/10.1007/s00468-010-0417-x>

Parry, M.A., Keys, A.J., Madgwick, P.J., Carmo-Silva, A.E., Andralojc, P.J., 2008. Rubisco regulation: a role for inhibitors. *J Exp Bot.* 59, 1569–1580.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern084>

Peng, Y.L., Wang, Y.S., Gu, J.D., 2015. Identification of suitable reference genes in mangrove *Aegiceras corniculatum* under abiotic stresses. *Ecotoxicology*.24(7-8),1714-1721. doi: 10.1007/s10646-015-1487-8.

Prashanth, S.R., Sadhasivam, V., Parida, A., 2008. Over expression of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from a mangrove plant *Avicennia marina* in indica rice varPusa Basmati-1 confers abiotic stress tolerance. *Transgenic Res.* 17, 281–291.  
<https://doi.org/10.1007/s11248-007-9099-6>

Scholander, P.F., 1968. How mangrove desalinated water. *Physiol Plant.* 21, 251-261. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1968.tb07248.x>

Soares, M.L.G., Estrada, G.C.D., Fernandez, V., Tognella, M.M.P., 2012. Southern limit of the Western South Atlantic mangroves: Assessment of potentials

effects of global warming from a biogeographical perspective. *Estuar Coast Shelf Sci.* 101, 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.02.018>

Soares, M.L.G., Tognella, M.M.P., Cuevas, E., Medina, E., 2015. Photosynthetic capacity and intrinsic water-use efficiency of *Rhizophora mangle* at its southernmost western Atlantic range. *Photosynthetica.* 53, 464-470. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0119-0>

Sobrado, M.A., 2005. Leaf characteristics and gas exchange of the mangrove *Laguncularia racemosa* as affected by salinity. *Photosynthetica.* 43, 217-221. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0036-8>

Sobrado, M.A., Ball, M.C., 1999. Light use in relation to carbon gain in the mangrove, *Avicennia marina*, under hypersaline conditions. *Australian Journal of Plant Physiol.* 26, 245–251. <https://doi.org/10.1071/PP98075>

Srivastava, A., Guissé, B., Greppin, H., Strasser, R.J., 1997. Regulation of antenna structure and electron transport in photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probe by fast polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient: OKJIP. *Biochim Biophys Acta.* 1320, 95-106. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00017-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00017-0)

Strasser, R.J., Stirbet, A.D., 2001. Estimation of the energetic connectivity of PS II centres in plants using the fluorescence rise O–J–I–P Fitting of experimental data to three different PS II models. *Math Comput Simul.* 56, 451–461. [https://doi.org/10.1016/S0378-4754\(01\)00314-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4754(01)00314-7)

Strasser, R.J., Strasser, B.J., 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test. In: Mathis P (ed) *Photosynthesis: From Light to Biosphere.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 977-980. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-0173-5\\_1142](https://doi.org/10.1007/978-94-009-0173-5_1142)

Strasser, R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A.: Analysis of the Chlorophyll *a* Fluorescence Transient. – In: Papageorgiou GC, Govindjee (ed.) *Chlorophyll *a* Fluorescence. Advances in Photosynthesis and Respiration.* Springer, Dordrecht, pp 321-362, 2004.

Sugihara, K., Hanagata, N., Dubinsky, Z., Baba, S., Karube, I., 2000. Molecular characterization of cDNA encoding oxygen evolving enhancer protein 1 increased by salt treatment in the mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. *Plant Cell Physiol.* 41(11), 1279–1285. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcd061>

Suo, J., Zhao, Q., David, L., Chen, S., Dai, S., 2017. Salinity Response in Chloroplasts: Insights from Gene Characterization. *Int J Mol Sci.* 18(5), 1-17. <https://doi.org/10.3390/ijms18051011>

Suorsa, M., Aro, E., 2007. Expression, assembly and auxiliary functions of photosystem II oxygen-evolving proteins in higher plants. *Photosynth Res.* 93, 89–100. <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9154-4>

Tada, Y., Kashimura, T., 2009. Proteomic analysis of salt-responsive proteins in the mangrove plant, *Bruguiera gymnorhiza*. *Plant Cell Physiol.* 50, 439–446. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp002>

Takemura, T., Hanagata, N., Sugihara, K., Baba, S., Karube, I., Dubinsky, Z., 2000. Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorhiza*. *Aquatic Botany.* 68, 15–28. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(00\)00106-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(00)00106-6)

Teas, H.J., 1979. Silviculture with Saline Water. In: Hollaender A, Aller JC, Epstein E, San Pietro A, Zaborsky OR (ed) *The Biosaline Concept*. Environmental Science Research, vol 14. Springer, Boston, pp 117-161. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3021-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3021-9_7)

Tikhonov, A.N., 2013. pH-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynth Res.* 116, 511–534. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9845-y>

Tuteja, N., 2007. Chapter twenty-four-mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol.* 428, 419–438. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28024-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28024-3)

Twilley, R.R., Montañó, M., Valdivieso, J.M., Boderó, A., 1999. The environmental quality of coastal ecosystems in Ecuador: Implications for the development of integrated mangrove and shrimp pond management. In: Yáñez-Arancibia, A. & LaraDomínguez, A.L. (ed.). *Mangrove Ecosystems in Tropical America*. IUCN/NOAA/Instituto de Ecología, Xalapa, Mexico, 199-230 pp.

Wang, L., Liu, X., Liang, M, Tan, F., Liang, W., Chen, Y., Lin, Y., Huang, L., Xing, J., Chen, W., 2014. Proteomic analysis of salt-responsive proteins in the leaves of mangrove *Kandelia candel* during short-term stress. *PLoS One* 9(1):e83141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083141>

Wang, L., Pan, D., Li, F., Hoffmann-Benning, S., Liang, W., Chen, W., 2015. Proteomic analysis of changes in the *Kandelia candel* chloroplast proteins reveals

pathways associated with salt tolerance. *Plant Sci*, 231, 159-172. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.11.013>

Wang, Y., Gu, W., Meng, Y., Xie, T., Li, L., Li, J., Wei, S., 2017.  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Imparts Partial Protection from Salt Stress Injury to Maize Seedlings by Improving Photosynthesis and Upregulating Osmoprotectants and Antioxidants. *Sci Rep*. 7, 3609. <https://doi.org/10.1038/srep43609>

Werner, A., Stelzer, R., 1990. Physiological responses of the mangrove *Rhizophora mangle* grown in the absence and presence of NaCl. *Plant Cell Environ*. 13, 243–255. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1990.tb01309.x>

Woodroffe, C. 1992. Mangrove sediments and geomorphology. pp. 7-41. *In* A. I. Robertson & D.M. Alongi (eds.). *Tropical mangrove ecosystem*, American Geophysical Union, Washington D.C. <https://doi.org/10.1029/CE041p0007>

Xue, Z.Y., Zhi, D.Y., Xue, G., Zhang, H., Zhao, Y., Xia, G., 2004. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup>. *Plant Sci*. 167, 849–859. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.05.034>

Yamanaka, T., Miyama, M., Tada, Y., 2009. Transcriptome Profiling of the Mangrove Plant *Bruguiera gymnorhiza* and Identification of Salt Tolerance Genes by Agrobacterium Functional Screening. *Biosci Biotechnol Biochem*. 73(2) 304–310. <https://doi.org/10.1271/bbb.80513>

Yang, Y., Guo, Y., 2018. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *New Phytol*. 217, 523–539. <https://doi.org/10.1111/nph.14920>

Yang, Y., Yang, S., Li, J., Deng, Y., Zhang, Z., Xu, S., Guo, W., Zhong, C., Zhou, R., Shi, S., 2015. Transcriptome analysis of the Holly mangrove *Acanthus ilicifolius* and its terrestrial relative, *Acanthus leucostachyus*, provides insights into adaptation to intertidal zones. *BMC Genomics*. 16,605. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1813-9>

Yusuf, M.A., Kumar, D., Rajwanshi, R., Strasser, R.J., Tsimilli-Michae, L.M., Govindjee, Sarin, N.B., 2010. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurements. *Biochi Biophys Acta*. 1797, 1428–1438. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.002>

Zamprogno, G.C., Tognella, M.M.P.T., Quaresma, V.S., Costa, M.B., Pascoalini, S.S., Couto, G.F., 2016. The structural heterogeneity of an urbanised

mangrove forest area in southeastern Brazil: Influence of environmental factors and anthropogenic stressors. *Braz. j. oceanogr.* 64(2), 157-172, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-87592016111706402>

Zhang, H.X., Blumwald, E., 2001. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol.* 19, 765–768. <https://doi.org/10.1038/90824>

Zhang, R.H., Zhang, X.R., Camberato, J.J., Xue, J.Q., 2015. Photosynthetic performance of maize hybrids to drought stress. *Russ J Plant Physiol.* 62, 788–796. <https://doi.org/10.1134/S1021443715060187>

Zhu, G., Jensen, R.G., 1991. Fallover of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity: decarbamylation of catalytic sites depends on pH. *Plant Physiol.* 97, 1354–1358. <https://doi.org/10.1104/pp.97.4.1354>

Zhu, Z., Chen, J., Zheng, H-L., 2012. Physiological and proteomic characterization of salt tolerance in a mangrove plant, *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lam. *Tree Physiology.* 32, 1378–1388. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps097>

Zörb, C., Schmitt, S., Neeb, A., Karl, S., Linder, M., Schubert, S., 2004. The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. *Plant Sci.* 167, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.03.004>

#### IV. CONCLUSÃO GERAL

Plantas jovens de *Rhizophora mangle* crescendo em áreas de maior e menor salinidade exibiram diferenças no desempenho do transporte de elétrons ao longo da cadeia transportadora de elétrons. Na área de maior salinidade (HS) as plantas exibiram melhores desempenhos no transporte de elétron no lado doador e receptor de elétrons no PSII. No entanto, não apresentaram o mesmo desempenho em relação à redução dos aceptores finais de elétron no PSI, sendo mais eficiente nos indivíduos crescendo na área de menor salinidade LS, conforme apontaram IP-pase  $PI_{TOTAL}$ . Apesar de apresentar a menor salinidade média, a área de menor salinidade (LS) exibiu maior variação entre mínima e máxima salinidade, fato que pode maximizar o estresse salino, contribuindo com o baixo desempenho no transporte de elétrons no PSII, principalmente no acúmulo de  $Q_A^-$ .

Apesar de não ter sido encontradas diferenças nos níveis de assimilação de  $CO_2$ , (exceto na segunda amostragem) a análise de expressão apontou aumento de expressão dos genes relacionado à fotossíntese *psbA*, *psbO* e *RCA*, podendo ser determinado como mecanismos moleculares para plantas crescerem no ambiente salino. Além disso, o bom desempenho fotossintético das plantas, mesmo na maior salinidade, também pode estar atribuído aos maiores níveis de expressão dos genes de defesa antioxidante e transporte de sódio, *GAD* e *NHX1*, respectivamente. Mecanismo que minimiza os efeitos oxidativos do sal e possibilita seu desenvolvimento. Assim como foi apontado pela grande representatividade de indivíduos adultos (maior área basal) na área de maior salinidade.

As duas áreas de estudo estão inseridas em manguezais ainda pouco estudados em relação aos mecanismos moleculares desenvolvidos para lidar com solos salinos, evitando (ou mitigando) os efeitos danosos do estresse salino nas células da planta. Em torno destas florestas de mangue vivem comunidades de pescadores e catadores de caranguejos, sendo assim, relativamente pouco povoadas, e que ainda não sofrem os efeitos do adensamento populacional e dos grandes empreendimentos portuários instalados nas regiões vizinhas. Além disso, ao longo dos últimos cinco anos a salinidade média do estuário tem estado elevada, devido diminuição das precipitações. Este trabalho dá início aos estudos que buscam relacionar os efeitos do aumento da salinidade registrado no estuário do rio São Mateus, Brasil, com as relações gênicas e fisiológicas observadas na espécie *Rhizophora mangle* e suas implicações com o

desenvolvimento da floresta madura, uma vez que a espécie, apesar de se desenvolver em uma faixa ampla de salinidade, apresentou desempenhos fotossintéticos menos eficientes quando o nível de salinidade estava mais elevado, que futuramente pode ser refletido na composição da floresta adulta. Assim, estudo como este vão contribuir para se avaliar o comportamento de tolerância desta espécie nas diferentes situações ambientais as quais estão sujeitas ao longo de sua distribuição global e inferir respostas fisiológicas em ocasiões de elevação do nível médio relativo do mar e de mudanças climáticas.