

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

ULLY DEPOLO BARCELOS

**MANGUEZAL COMO SUMIDOURO DE  
METAIS TRAÇO UM ESTUDO DE CASO PARA  
*Rhizophora mangle L.***

Aracruz, 2023

ULLY DEPOLO BARCELOS

**MANGUEZAL COMO SUMIDOURO DE  
METAIS TRAÇO UM ESTUDO DE CASO PARA  
*Rhizophora mangle L.***

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

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

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andreia Barcelos Passos

Lima Gontijo

Aracruz, 2023

ULLY DEPOLO BARCELOS

**MANGUEZAL COMO SUMIDOURO DE  
METAIS TRAÇO UM ESTUDO DE CASO PARA  
*Rhizophora mangle L.***

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

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Mônica Maria Pereira Tognella – Orientador  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Dr. Renato David Ghisolfi – Examinador Interno  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Dr. Agnaldo Silva Martins – Examinador Interno  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Dra. Kátia Naomi Kuroshima – Examinador Externo

---

Dra. Viviane Fernandez de Oliveira – Examinador Externo  
Universidade Federal Fluminense

## AGRADECIMENTOS

À minha família por me apoiarem incondicionalmente.

À prof<sup>a</sup>. Dra. Mônica Maria Pereira Tognella, pela orientação, que não mediu esforços para me fazer crescer como pessoa e como profissional, obrigada por compartilhar comigo todo o seu conhecimento. Pelos puxões de orelha, incentivos, conselhos e por sempre acreditar no meu potencial.

À prof<sup>a</sup>. Dra. Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo pela coorientação, por toda ajuda e suporte necessário.

À fundação RENOVA pelo financiamento da pesquisa.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos professores Drs. Antelmo Ralph Falqueto, Edilson Romais Schmidt e Adriano Alves Fernandes pelo auxílio nas análises dos dados, empréstimo de equipamento e espaço físico.

A todos os estagiários do GEMA pela ajuda nas medições, saídas de campo, e retirada do experimento, muito obrigada por disponibilizarem seu tempo até mesmo nos finais de semana e à noite e de madrugada, sem vocês jamais teria chegado aqui.

A Dielle e Sália pela ajuda no experimento e análises fisiológicas.

Aos membros comissão avaliadora do programa Drs. Renato Ghisolfi e Agnaldo Silva, muito obrigada pelas colaborações.

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

## RESUMO

Manguezais são ambientes altamente produtivos e resilientes. Contudo as pressões antrópicas associadas aos tensores naturais faz com que esta resiliência diminua. Os metais traço estão entre os principais poluentes de origem antrópica que atingem os manguezais. Florestas de mangue são consideradas sumidouros destes poluentes pela capacidade de retenção no sedimento e na biomassa vegetal. Este trabalho foi desenvolvido a partir do cultivo *ex situ* de plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas em diferentes concentrações de ferro (Fe) e alumínio (Al). Esta tese é composta por três capítulos. O primeiro avaliou o efeito do Fe no desenvolvimento, crescimento e fisiologia de plântulas de *R. mangle*. Ao final do experimento foi observada uma redução do desempenho fotossintético, redução da produção foliar na maior concentração ( $315 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Quanto maior a concentração do metal no meio de cultivo maior foi a bioacumulação do Fe na biomassa vegetal, sendo as raízes responsáveis pelo maior acúmulo. O segundo capítulo analisou as respostas morfológicas e fisiológicas de plântulas de *R. mangle* em diferentes concentrações de Al. As plântulas expostas ao excesso de Al apresentaram uma redução no desempenho fotossintético e redução da biomassa das raízes. As raízes também foram responsáveis pelo maior acúmulo de Al em relação a parte aérea. Esta resposta similar para os dois metais sugere que a espécie possui mecanismos de defesa para impedir a entrada de metais sobretudo quando estes estão em concentrações elevadas, como por exemplo, o processo de ultrafiltração. Os resultados apresentados evidenciam a plasticidade da espécie em lidar com tensores. O terceiro capítulo teve como objetivo definir o tamanho de amostra e de parcela em experimentos *ex situ* que utilizam propágulos de *R. mangle*. Foram utilizados parâmetros morfológicos (massa fresca, comprimento, diâmetro basal do meio e apical) dos propágulos coletados na foz natural do estuário do rio Itaúnas em seis épocas distintas. Inicialmente foram realizadas estatísticas descritivas juntamente com medidas de correlação linear e teste de normalidade as metodologias do dimensionamento amostral e do tamanho ótimo de parcela (top) foram definidas. Para experimentos que não envolvem delineamento experimental (i.e: sol e sombra) a quantidade de propágulos utilizadas é determinado por estimação intervalar bootstrap onde o N será definido em função dos erros tolerados em torno da média. Para a determinação do tamanho ótimo de parcelas para instalação de experimentos nos delineamentos inteiramente casualizados (DIC) e em blocos casualizados (DBC) Deve ser empregado o método de Hatheway. O número de propágulos por parcela será definido em função do número de tratamentos, repetições e precisão assumida. Esta definição do tamanho amostral e de parcela é importante haja vista que não existe uma padronização dos mesmos em experimentos *in situ* e *ex situ* com plântulas de mangue.

Palavras chave: Metais traço, Bioacumulação, Delineamentos experimentais, Experimento *ex situ*.

## ABSTRACT

Mangroves are highly productive and resilient environments. However, anthropogenic pressures associated with natural stressors cause this resilience to decrease. Trace metals are among the main anthropogenic pollutants affecting mangroves. Mangrove forests are considered to be sinks for these pollutants because of their capacity to retain them in the sediment and in the vegetal biomass. This work was developed from the *ex situ* cultivation of *Rhizophora mangle* L. seedlings cultivated in different concentrations of iron (Fe) and aluminum (Al). This thesis is composed of three chapters. The first evaluated the effect of Fe on the development, growth and physiology of *Rhizophora mangle* seedlings. At the end of the experiment a reduction in photosynthetic performance, reduced leaf production was observed at the highest concentration (315  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). The higher the concentration of the metal in the culture medium the higher was the bioaccumulation of Fe in the plant biomass, being the roots responsible for the highest accumulation. The second chapter analyzed the morphological and physiological responses of *R. mangle* seedlings in different Al concentrations. Seedlings exposed to excess Al showed a reduction in photosynthetic performance and reduction of root biomass. The roots were also responsible for the higher accumulation of Al in relation to the aboveground part. This similar response for both metals suggests that the species has defense mechanisms to prevent the entry of metals especially when they are in high concentrations, such as the ultrafiltration process. The results presented show the plasticity of the species in dealing with stressors. The third chapter aimed to define sample and plot sizes in *ex situ* experiments using *R. mangle* propagules. Morphological parameters (fresh mass, length, basal middle and apical diameter) of propagules collected at the natural mouth of the Itaúnas river estuary in six different seasons were used. Initially, descriptive statistics were performed along with linear correlation measures and normality test, sample sizing and optimal plot size (top) methodologies were defined. For experiments that do not involve experimental design (i.e. sun and shade) the amount of propagules used is determined by bootstrap interval estimation where N is defined as a function of tolerated errors around the mean. The Hatheway method should be used to determine the optimum plot size for the installation of experiments in Completely Randomized Design (DIC) and Randomized Block Design (BCD). The number of seedlings per plot will be defined as a function of the number of treatments, repetitions and assumed precision. This definition of sample size and plot size is important because there is no standardization of the same in *in situ* and *ex situ* experiments with mangrove seedlings.

Keywords: Trace metals, Bioaccumulation, Experimental design, *ex situ* experiment.

## LISTA DE TABELA

### Apresentação

Tabela 1: Comparação da concentração mínima e máxima de metais traço no sedimento de manguezais no mundo.	9
Tabela 2: Concentração média de metais traço nos diferentes tecidos vegetais em espécies de mangue em condições <i>in situ</i> .	10
Tabela 3: Principais parâmetros avaliados na determinação da toxicidade de metais traço em espécies de mangue em condições <i>in situ</i> e <i>ex situ</i> .	12

### Capítulo 1

Tabela 1 : Número médio de folhas por tratamento das plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L. cultivadas em solução de Hoagland e Arnon (1950) em diferentes concentrações de ferro...	36
--	----

### Capítulo 2

Tabela 1: Parâmetros fotoquímicos das plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L. cultivadas em diferentes doses de alumínio após 270 dias de cultivo em solução de Hoagland e Arnon (1950).....	70
---	----

### Capítulo 3

Tabela 1: Descrição do tamanho da amostra de campo (n) com os valores de mínimo (Min), máximo (Max) e as análises estatísticas envolvendo a média (X), desvio padrão (s), coeficiente de variação (CV) e teste de normalidade de Shapiro-Wilk (SW) para cinco características avaliadas em propágulos maduros de <i>Rhizophora mangle</i> L. coletados em diferentes épocas na foz do rio Itaúnas .....	91
---	----

Tabela 2: Tamanho de amostra experimental (número de propágulos) para estimação da média de cinco características de propágulos maduros de <i>Rhizophora mangle</i> L. para as amplitudes do intervalo de confiança de 95% considerando margem de erros de 5 %; 10 %; 15 %; 20 % e 25 % da estimativa da média, com base em propágulos coletados em seis épocas na foz do rio Itaúnas.....	95
--	----

Tabela 3: Equações estimadas para determinação do tamanho da amostra ( $n_{exp}$ ) de propágulos de *Rhizophora mangle* L. na instalação de experimentos para diferentes erros de estimativa (5%, 10%, 15%, 20% e 25%) em torno da média..... 98

Tabela 4: Tamanho ótimo de parcela, pelo método de Hatheway (1961) para experimentos com propágulos de *Rhizophora mangle* L. em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e em blocos casualizados (DBC) considerando diferentes números de tratamentos (I), repetições (J) e com diferentes precisões (d) em torno da média. .... 100

## LISTA DE FIGURAS

### Apresentação

Figura 1: Foz natural do rio Itaúnas, Conceição da Barra (ES).....	12
Figura 2: Esquema ilustrativo para demonstrar a distribuição dos propágulos de <i>Rhizophora mangle</i> nos vasos para cultivo (parcelas) e sua disposição em blocos casualizados nas bancadas no interior da casa de vegetação.....	13
Figura 3: linha do tempo experimental.....	14

### Capítulo 1

Figura 1: Cultivo das plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L. em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) à meia força com diferentes concentrações de ferro, vasos possuem volume de 20L. A: Instalação do experimento (fevereiro de 2019) na casa de vegetação B: Distr: Distribuição dos propágulos em blocos (fevereiro 2019). C: Plântulas de <i>R. mangle</i> após 95 dias de cultivo (junho 2019 D: Distribuição das plântulas de <i>R. mangle</i> nos tratamentos contendo diferentes concentrações de Fe aos 95 dias de cultivo (junho 2019). .....	27
Figura 2: Plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L. cultivadas por 270 dias em solução de Hoagland e Arnon (1950) com diferentes concentrações de Fe. A: Emprego de IRGA (Infra-red Gas Analyzer) para avaliar as assimilações das trocas gasosas, B: Folhas sendo adaptadas ao escuro com cliques foliares para aquisição da fluorescência transiente da clorofila <i>a</i> .....	30
Figura 3: Plântula (indivíduo) de <i>Rhizophora mangle</i> L. cultivada em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) à meia força. A: Imagem da plântula cultivada ao término do experimento, isto é, 270 dias no tratamento controle ( $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) B: Imagem mostrando a divisão dos compartimentos em epicótilo (ramos e caule), folhas, hipocótilo e raiz. ....	32
Figura 4: Comprimento (cm) do epicótilo das plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L. cultivadas em solução de Hoagland e Arnon (1950) à meia força. A: Comprimento (cm) do epicótilo ao longo 270 dias nos diferentes tratamentos. B: Comprimento médio (cm) do epicótilo ao longo 270 dias nos diferentes tratamentos. B: Comprimento médio (cm) do epicótilo ao final do experimento nas diferentes concentrações de Fe (médias das avaliações entre os 95 e 270 dias de cultivo). Médias seguidas pela letra a não diferem em relação ao controle ( $45\mu\text{mol L}^{-1}$ ) pelo teste de Dunett a 5 % de probabilidade. ....	33
Figura 5: Taxas de crescimento das plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L. cultivados em solução de Hoagland e Arnon (1950) à meia força. A: taxa de crescimento ( $\text{mm ao dia}^{-1}$ ) das plântulas aos 270 dias nas diferentes concentrações de ferro; B: taxa relativa de crescimento	

avaliação comparativa entre as doses aos 270 dias de cultivo. Médias seguidas da letra a não diferem do controle ( $45\mu\text{mol L}^{-1}$ ) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. ....	34
Figura 6: Biomassa dos compartimentos raiz, hipocótilo, epicótilo e folhas das plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L. cultivadas em diferentes concentrações de ferro ao término do experimento.....	35
Figura 7: Produção foliar ao longo do tempo das plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L. cultivadas em diferentes concentrações de ferro. ....	37
Figura 8: Parâmetros foliares das plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L. aos 270 dias de cultivo em diferentes concentrações de ferro. Médias seguidas pela letra a não diferem do controle ( $45\mu\text{mol L}^{-1}$ ) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. ....	38
Figura 9: Fluorescência transiente da clorofila a <i>Rhizophora mangle</i> L. cultivada em diferentes concentrações de Ferro. A: curva polifásica de emissão da fluorescência da clorofila a; B: variação da banda K (0,2 ms) ou $\Delta\text{VOJ}$ estabelecida entre 0 e 2 ms, a partir da dupla normalização $\Delta\text{VOJ} = [\text{VOJ}(\text{controle}) - \text{VOJ}(\text{tratamento})]$ , onde $\text{VOJ} = (\text{Ft} - \text{FO}) / (\text{FJ} - \text{FO})$ . ....	39
Figura 10: Parâmetros fotoquímicos derivados do teste JIP em plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L. cultivadas sob diferentes doses de ferro. Médias seguidas por (*) são estatisticamente diferentes ao controle ( $45\mu\text{mol L}^{-1}$ de ferro) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. Todos os parâmetros do teste JIP foram normalizados com relação ao controle ( $45\mu\text{mol Fe} = 1$ ). ns= não significativo. ....	40
Figura 11 : Valores das trocas gasosas em plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L. cultivadas em diferentes doses de ferro (Fe). A: taxa de assimilação líquida de carbono B: eficiência instantânea de carboxilação C: concentração interna de $\text{CO}_2$ , D: Condutância estomática. ....	41
Figura 12: Concentração de ferro na parte aérea e na raiz em plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L. cultivada em solução nutritiva (Hoagland e Arnon,1950) em diferentes doses de ferro. Médias seguidas da letra a não diferem do controle ( $45\mu\text{mol L}^{-1}$ de ferro) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. ....	42

## Capítulo 2

Figura 1: Plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L. cultivadas em solução de Hoagland e Arnon (1950) distribuídas nos tratamentos com alumínio aos 95 dias de cultivo.....	60
Figura 2: Comprimento (cm) do epicótilo das plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L. cultivadas em solução de Hoagland e Arnon (1950). A: Comprimento (cm) do epicótilo ao longo do experimento nos diferentes tratamentos. B: Comprimento médio (cm) do epicótilo ao final do experimento nas diferentes concentrações de Al (médias das avaliações entre os 95 e 270 dias	

de cultivo). Médias seguidas pela letra a não diferem em relação ao controle pelo teste de Dunet a 5 % de probabilidade..... 63

Figura 3: Taxas de crescimento das plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivados em solução de Hoagland e Arnon (1950). A: Avaliação comparativa das taxas de crescimento entre as concentrações de alumínio aos 270 dias; B: Avaliação comparativa da taxa de crescimento relativo entre as concentrações de Al aos 270 dias de cultivo. Médias seguidas da letra a não diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade..... 64

Figura 4: Efeito do alumínio sob o incremento em biomassa (g) das plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas na solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950). Médias seguidas da letra a não diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade..... 65

Figura 5: Produção foliar média das plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas em solução de Hoagland e Arnon (1950) em diferentes concentrações de alumínio ao longo de 270 dias. .... 66

Figura 6: Parâmetros foliares das plântulas de *Rhizophora mangle* L. aos 270 dias de cultivo em diferentes concentrações de alumínio. Médias seguidas pela letra a não diferem do controle pelo teste de Dunett a 5% de probabilidade. .... 67

Figura 7: Fluorescência transiente da clorofila a das plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivada em diferentes concentrações de alumínio. A: curva polifásica de emissão da fluorescência da clorofila a; B: variação da banda K (0,3 ms) ou  $\Delta VOJ$  estabelecida entre 0 e 2 ms, a partir da dupla normalização  $\Delta VOJ = [VOJ(\text{controle}) - Voj(\text{tratamento})]$ , onde  $VOJ = (F_t - FO) / (F_J - FO)$ . .... 68

Figura 8: Parâmetros fotoquímicos derivados do teste JIP em plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas sob diferentes concentrações de alumínio. Médias seguidas por (\*) são estatisticamente diferentes ao controle pelo teste de Dunett a 5% de probabilidade. Todos os parâmetros do teste JIP foram normalizados com relação ao controle ( $0 \mu\text{mol Al}=1$ ). .... 69

Figura 9: Concentração de alumínio nas partes área e de raiz, após 270 dias, em plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com diferentes concentrações de alumínio. Médias seguidas da letra a não diferem significativamente ao controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. .... 70

### Capítulo 3

Figura 1: Coeficiente de Correlação de Pearson (diagonal inferior) e diagrama de Dispersão (diagonal superior) dos dados de comprimento, massa fresca e diâmetros dos propágulos de *Rhizophora mangle* L. Círculos em verde correspondem aos dados de 200 propágulos coletados em abril de 2016 e aqueles em laranja aos 497 propágulos coletados em fevereiro de 2019..... 93

Figura 2: Descrição do comportamento da simulação dos valores de massa fresca (g) dos propágulos de acordo com valores:  $\triangle$  Mínimo,  $\blacktriangle$  Percentil 2,5%,  $\blacksquare$  Média,  $\bullet$  Percentil 97,5% e  $\circ$  Máximo das 4.000 médias de massa fresca de propágulos, obtidos por amostragens em diferentes tamanhos de amostra (10, 20, 30, ... 400 propágulos) a partir de 497 propágulos de *Rhizophora mangle* L. .... 94

Figura 3: Ábaco da determinação do tamanho da amostra de propágulos de *Rhizophora mangle* L. para instalação de experimentos a partir do coeficiente de variação do peso fresco dos propágulos, considerando erro de estimativa de 5%, 10%, 15%, 20% e 25% em torno da média. .... 98

## Sumário

1. <b>Apresentação</b>	1
1.1 Metais traço no manguezal	2
2. Objetivos	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3.1 Coleta e desinfestação dos propágulos.	11
3.2 Desenho experimental e meio de cultivo	13
3. Referências	15
<b>CAPÍTULO 1:</b>	22
<b>Efeito do ferro na morfofisiologia em plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L.</b>	22
1. Introdução	22
2. Metodologia	25
2.1 Implementação do ferro	26
2.2 Dados Morfológicos	27
2.3 Taxas de Crescimento	28
2.4 Parâmetros fisiológicos.	28
2.5 Concentração de Ferro	30
2.7 Retirada do experimento.	31
3. Resultados	33
3.1 Parâmetros morfológicos	33
3.2 Fluorescência da clorofila <i>a</i> e trocas gasosas.	38
3.3 Concentração de Ferro	41
4 Discussão	42
5. Considerações finais	48
6. Referências	49
<b>CAPÍTULO 2:</b>	56
<b>Efeito do alumínio no crescimento inicial e fisiologia de plântulas de <i>Rhizophora mangle</i> L.</b>	56

1. Introdução	56
2.1 Implementação dos tratamentos com Alumínio	60
2.2 Dados morfológicos	60
2.3 Fluorescência transiente da clorofila <i>a</i>	61
2.4 Assimilação de Carbono	61
2.5 Análise estatística	62
3 Resultados	62
3.1 Parâmetros morfológicos	62
3.2 Fluorescência da clorofila <i>a</i> e trocas gasosas	67
3.3 Análise nutricional	70
4. Discussão	71
5. Considerações finais	73
6. Referências	74
<b>CAPÍTULO 3:</b>	<b>82</b>
<b>Experimentos <i>ex situ</i> de <i>Rhizophora mangle</i>: Qual o tamanho ideal da amostra e da parcela?</b>	<b>82</b>
1. Introdução	83
2. Material e Métodos	85
2.1 Dimensionamento amostral	86
2.2 Tamanho ótimo de parcela	87
3. Resultados e Discussão	89
3.1 Dimensionamento amostral	93
3.2 Tamanho ótimo de parcela	98
4. Considerações finais	101
5. Referências	102
6. Apêndices	108

# 1. Apresentação

Manguezais são distribuídos mundialmente nas zonas intertidais das regiões tropicais e subtropicais, representam um ecossistema altamente produtivo, provedor de diversos bens e serviços beneficiando direta e indiretamente as populações costeiras, ecossistemas costeiros e marinhos adjacentes (GIRI et al., 2011)

O ecossistema manguezal se estabelece como resultado da interação de vários fatores como geomorfologia, inundação, textura e temperatura do substrato, pH, salinidade, aporte de nutrientes, produção e dispersão dos propágulos, competição, herbívora, bem como a resposta fisiológica das espécies aos gradientes de salinidade e inundação, incluindo as interações simbióticas. Estas condições modificam a distribuição do manguezal e sua diversidade florística (TOMLINSON, 1986; ALONGI; MUKHOPADHYAY, 2015)

O manguezal é um ecossistema diverso em termos estruturais e funcionais (FELLER et al., 2010), fornecendo diferentes serviços ecossistêmicos (TOGNELLA-DE-ROSA et al., 2006). Os serviços ecossistêmicos providos pelo manguezal, incluindo: biofiltração, retenção e ciclagem de nutrientes, estoque de carbono, proteção física das zonas costeiras, estabilização da costa entre outros (LOVELOCK e ELLISON, 2007; DONATO et al., 2011; GEDAN et al., 2011; ALONGI, 2014; ATWOOD et al., 2017; PASCOALINI et al., 2019).

Embora sejam consideradas uma das principais fontes de produção primária nas regiões tropicais e subtropicais (HOGAN et al., 2013), as florestas de mangue têm sido perdidas em todo o mundo nas últimas décadas (GIRI et al., 2011). Além do desmatamento direto, alterações hidrológicas, mudanças climáticas (em particular aumento do nível médio do mar), infestações de insetos, poluição química, aquicultura, desenvolvimento urbano e industrial (ALONGI, 2002; DUKE et al., 2007; SPALDING et al., 2010; GIRI et al., 2011) estão entre os principais fatores antrópicos.

Os manguezais são ambientes resilientes, isto é, têm uma alta capacidade de se recompor naturalmente (TOGNELLA-DE-ROSA et al., 2007). Contudo, quando os drenos energéticos naturais e induzidos são simultâneos, esta resiliência diminui, tornando-se difícil a recuperação e/ou manutenção do ecossistema (LOVELOCK e ELLISON, 2007).

## 1.1 Metais traço no manguezal

O teor de metais traço no solo é influenciado pelo seu material de origem, clima e vegetação, refletindo a oferta de nutrição mineral para o crescimento das plantas pelo solo. As plantas absorvem e acumulam os elementos em seu tecido, mas também pode liberá-los de volta para o ambiente circundante. Parte do elemento absorvido é translocado entre os tecidos vegetais. Elementos essenciais para a sobrevivência das plantas (MENGEL et al., 2001) são classificados de acordo com o seu requerimento como macronutrientes, sendo eles: N, P, K, Na, Ca e Mg; e micronutrientes, sendo: Cu, Fe, Mo, Mn, Ni e Zn. Esses elementos essenciais melhoram o crescimento e rendimento das plantas (TAIZ, 2017). Muitos metais traço como Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn não são tóxicos na maioria dos ambientes e atuam como micronutrientes para o crescimento das plantas até que ultrapassem um certo limite (APPENROTH, 2010). Outros elementos traço não essenciais como Al, Cr, Cd e Pb são muitas vezes tóxicos para crescimento das plantas (BOTHE, 2011).

Os metais-traço são considerados, dentre os compostos químicos tóxicos, contaminantes de grande relevância, visto que não são biodegradáveis. A atividade humana influencia o ciclo de elementos de duas maneiras correlacionadas: (i) por alterar a taxa na qual os elementos são transportados entre diferentes reservatórios e (ii) alterando sua especiação (forma de ocorrência) entre fontes e sumidouros (RAY et al., 2021).

Pela sua natureza não biodegradável, uma das grandes preocupações sobre o incremento de metais traço no ambiente é o fenômeno da biomagnificação nos organismos, ou seja, o incremento da concentração dos metais ao longo da cadeia alimentar até o homem. Manguezais fornecem um ambiente ecológico único para fauna e flora diversas, que representam teias alimentares relativamente complexas com relações intrincadas com habitats vizinhos e concentração de metais nos níveis superiores da cadeia alcança valores muito acima dos que se encontram no ar e na água (KATHIRESAN e BINGHAM, 2001; NAGELKERKEN et al., 2008). Esses metais-traço ao serem lançados nos corpos d'água sofrem partição entre a água e os particulados suspensos, sendo que parte desta carga é metabolizada pela flora e fauna local e parte deposita-se nos sedimentos tornando-os o destino final desses contaminantes (SILVERIO, 2003).

Os metais traço estão entre os principais poluentes de origem antrópica que atingem os manguezais (MACFARLANE et al., 2007). O enriquecimento metálico dos manguezais surge do uso de áreas urbanas e agrícolas e resulta de diversas fontes como: efluentes industriais,

embarcações, vazamentos de produtos químicos, emissão de esgoto, lixiviação do solo (SILVA et al., 1990; BAYEN, 2012; CHENG et al., 2012) e são agravados pela rápida urbanização (TAM e WONG, 1997; MACHADO et al., 2008; ZHOU et al., 2010).

O acúmulo de metais no sedimento dos manguezais é favorecido por sua alta capacidade de adsorção de matéria orgânica e pela presença de pequenas partículas granulométricas (ZHOU et al., 2010). A inundação frequente do ambiente causa, em muitas situações, depleção do oxigênio que desacelera a decomposição da matéria orgânica o que gera acúmulo de solutos potencialmente tóxicos, como íons ferrosos ( $Fe^{2+}$ ) e íons sulfeto ( $S^{2-}$ ) (ARMSTRONG, 1971; PONNAMPERUMA, 1984) . Estudos que relacionam a concentração de metais traço no sedimento consideram os manguezais como barreiras biogeoquímicas para o transporte de poluentes em áreas costeiras tropicais (MCLUSKY e ELLIOTT, 2004; QIU et al., 2011). Metais traço no sedimento de manguezais são relatados em uma ampla gama de concentrações (Tabela 1).

Tabela 1: Comparação da concentração mínima e máxima de metais traço no sedimento de manguezais no mundo.

Referência	Localização	Metais traço mg Kg <sup>-1</sup>											
		As	Al	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn
PREDA e COX, 2002)	Austrália	17-40	333-25,530	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FARIAS et al. (2007)	Brasil	-	4,9-6,2	0,01-0,2	0,01-0,38	-	0,01-300	0,9-4,4**	-	72-509	3,5-31,7	6,5-19	16-63
TUE et al. (2012)	Vietnã	-			2,18-19,76	53,65-78,73	31,79-93,59	-	-	-	-	52-105	76,53-199,94
MARCHAND et al. (2011)	Guiana Francesa	-		0,01-0,2		0,36-3,11	0,08-0,51	22,64-721,69		1,13-5	0,03-3,55	-	0,68-2,36
REITERMAJER et al. (2011)	Brasil	-	1,69-6,25	-	-	4,75-26,7	4,62-36,92	5,52-18,38**	-	-	-	2,19-21,93	0,15-1,82
BODIN et al. (2013)	Senegal	-	6,4-8,8**	0,27-0,29	-	105-108	20-34	3,2-4,2**		214-297	43-53	22	105-143
CABRAL et al., (2016)	Brasil	-	-	0,25-0,42	-	5,3-22,51	0,74-9,42	-	0,11-0,15	-	2,5-11,71	-	15-118
NORONHA et al. (2016)	Índia	-	-	-	47,75-59,5	240-285	90,25-133	-	-	775-6725	125-160	-	137-157
GOPALAKRISHNAN et al. (2020)	China	-	-	1,97-37,8	-	19,6-467,6	32,5-102,2	27275,8-50893,6	-	372-2063,6	13-62,7	44,1-84,8	104,8-314,9
MANJU et al. (2020)	Índia	-	-	0,46-2,63	10,70-36,94	-	8,55-38,17	-	-	-	26,65-78,02	6,09-29,93	23,01-82,21
GHOSH et al. (2022)	Índia	-	36,5-59,55	0,069-0,164	8,1-16,7	61,3	45,3-79,7	30,7-53,01	-	460-928	27,9-58,1	7,8-24,4	51,9-105
MOUSHMI et al. (2022)	Índia	-	-	0,05-1,84	0,10-21,08	6,57-228,94	0,02-89,19	-	-	-	2,15-64,90	1,42-124,87	49,06-1292,64
RRDM, 2020	Brasil	-	-	-	-	5,75-62,49	-	43,76-130,4	-	8,59-301,61	-	2,31-30,13	-

\*Concentração em %

As plantas de mangue apresentam mecanismos biológicos únicos para lidar com salinidades elevadas e o estresse osmótico derivados do excesso de íons no interior da célula (TOMLINSON, 1986). Alguns estudos exploraram se estes mecanismos também poderiam regular os metais traço. Estudos recentes mostram a bioacumulação de metais como mercúrio (Hg), níquel (n=Ni), cobalto (Co), cádmio (Cd), cromo (Cr), manganês (Mn), ferro (Fe) e alumínio (Al) (TABELA 2).

Tabela 2: Concentração média de metais traço nos diferentes tecidos vegetais em espécies de mangue em condições *in situ*.

Referência	País	Concentração de metais traço nos tecidos vegetais mg Kg <sup>-1</sup>											
		Al	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Sn	Zn
MACFARLANE et al. (2003)	Austrália	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	0,28	-	1,726667
AGORAMOORTHY et al. (2008)	Índia	-	-	-	-	24,09	193,6	0,06	168,7	-	16,69	1187,6	56
NATH et al. (2014)	Austrália	-	1,5	4,9	21	153	63,578	-	105	9,5	189	-	-
WU et al. (2015)	China	-	0,36	-	3,036	16,338	-	-	137,74	5,422	2,354	-	28,32
MARCHAND et al. (2016)	Nova Caledônia	-	-	0,345	-	0,205	319,575	-	1,088333	4,926667	-	-	0,365
RRDM, (2020)	Brasil	-	-	-	-	4,11	208,73	-	132,96	-	8,6	-	10,35
GHOSH et al. (2022)	Índia	773,6	0,022	1,6	46	58,1	5122,7	-	565,3	5,2	4	-	90

MacFarlane et al. (2003) avaliaram o potencial de acumulação e translocação de Zn, Cu e Pb na biomassa vegetal de *Avicennia marina*. Os autores concluíram que esta espécie pode ser utilizada como indicador biológico para estes metais, pois a concentração dos mesmos nos tecidos foi proporcional à quantidade observada no sedimento.

Mejías et al. (2013)Mejías et al. (2013) avaliaram a acumulação e translocação de dez metais traço (Hg, Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mg, Zn) presentes no sedimento do manguezal em Porto Rico, de três espécies de mangue *A. germinans*, *L. racemosa* e *R. mangle*. Os pesquisadores concluíram que a taxa de translocação e acumulação nos tecidos vegetais (raiz e folhas) é diferente entre as espécies, sendo o acúmulo relacionado com tipo de sedimento e a concentração de metais presente no mesmo. Ramos e Geraldo, (2007) obtiveram resultados similares avaliando três espécies no rio Cubatão. Os autores encontraram uma relação linear entre a concentração dos metais avaliados (Cd, Cr, Cu, Pb e Zn) e aquela registrada na biomassa vegetal.

Apesar de possuírem a capacidade de armazenar metais, a concentração dos mesmos nos tecidos foliares é menor do que nas raízes. No geral, as plantas de mangue tendem a operar como espécies excludentes de metais não essenciais e reguladores de metais essenciais (MACFARLANE et al., 2007) . A baixa concentração de metais na biomassa vegetal é associada a presença de barreiras na epiderme e endoderme da raiz (MACFARLANE; BURCHETT, 2002), pela oxidação do sedimento pelas raízes de mangue, diminuindo o ingresso destes elementos na biota (LIU et al., 2009) e pela formação de placas de ferro na superfície radicular (MACHADO et al., 2005; CHENG et al., 2012), sendo mecanismo de retenção nos solos mais oxigenados.

Os efeitos da poluição em plantas de mangue têm sido estudados por avaliação das respostas biológicas para sobrevivência como a produção de biomassa, eliminação de folhas, fotossíntese, bioacumulação nos diferentes órgãos e translocação para os tecidos de armazenamento. Além disso, estão associados aos metais no interior da planta a ocorrência de aumentos na expressão de metalotioneínas (MT), de atividades enzimáticas, de produtos de peroxidação de lipídios e na frequência de mutações (Tabela 3). A maioria dos estudos são realizados *ex situ* em plântulas de mangue, mas observações de campo em árvores maduras também foram relatadas (Tabela 3). Sob condições controladas, metais traço foram, por exemplo, associados à redução da fotossíntese (BELL; DUKE, 2005); (MACFARLANE et al., 2003), redução de crescimento e de biomassa (MACFARLANE e BURCHETT, 2002;

ALONGI, 2010), modificações na anatomia radicular (CHENG et al., 2012; ARRIVABENE et al., 2016); além de induções na taxa de mortalidade (MACFARLANE e BURCHETT, 2002)

Tabela 3: Principais parâmetros avaliados na determinação da toxicidade de metais traço em espécies de mangue em condições *in situ* e *ex situ*.

Espécies de mangue	Parâmetros avaliados	Contaminante	<i>In situ</i>	<i>Ex situ</i>	Referência
<i>Bruguiera gymnorrhiza</i> (plântula)	MT mRNA	Cd		X	HUANG; WANG; YING, (2011)
<i>Kandelia candel e Bruguiera gymnorrhiza</i> (plântula)	pigmentos fotossintetizantes, atividade enzimática	Cd, Pb, Hg		X	HUANG e WANG, (2010)
<i>Kandelia candel e Bruguiera gymnorrhiza</i> (plântula)	pigmentos fotossintetizantes, atividade enzimática	Cd, Pb, Hg		X	HUANG et al. (2010)
<i>Kandelia obovata</i> (plântula)	atividade antiradicalar , polifenóis totais, , MT mRNA	Pb, Mn		X	YAN e TAM (2011)
<i>Avicennia marina</i> (plântula)	pigmentos fotossintetizantes, atividade enzimática	Cu, Pb, Zn		X	HUANG e WANG (2010)
<i>Aegiceras corniculatum</i> (plântula)	Metabolismo de carboidratos	Cu, Cd, Zn		X	GUANGQIU et al. (2007)
<i>Avicennia marina</i>	Atividade enzimática, frequência de mutação	Zn	X	X	CAREGNATO et al. (2008)
<i>Rhizophora mangle, Bruguiera gymnorrhiza</i> (plântula)	Bioacumulação, respostas anatômicas, crescimento	Fe		X	ARRIVABENE et al. (2016); CHENG et al. (2010); ALONGI, (2010)
<i>Rhizophora mangle, Avicennia schaueriana, Laguncularia racemosa</i>	Translocação e bioacumulação	Al, Cu, Ar, Fe Cd, Cr, Cu, Pb, Mg, Zn	X		MEJIAS et al. (2013)
<i>B. gymnorrhiza, R. stylosa, K. obovata, A. corniculatum</i>	mecanismos antioxidantes	Cd,Cu e Pb	X		ZHOU et al. (2021)
<i>K. abovata</i>	Formação de placa de ferro	Cu, Pb, Zn		X	SHEN et al. (2021)

O Brasil apresenta a segunda maior área de manguezal do mundo com 130.000 hectares, correspondendo a 8,5% das áreas de mangue no mundo (SPALDING et al.,2010). Os manguezais brasileiros ocorrem ao longo de 6.786 km da linha de costa, colonizando áreas desde o rio Oiapoque, no extremo norte do litoral do Amapá, até município de Laguna, no sul do estado de Santa Catarina (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000; SOARES et al., 2012). O levantamento realizado por Cintron e Schaeffer-Novelli (1983) identificou sete espécies de mangue no Brasil, sendo elas: *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), *R. harrisonii* L. (Rhizophoraceae), *R. racemosa* G. Mey. (Rhizophoraceae), *Avicennia schaueriana* Stapf &

Leechm. Ex Moldenke (Acanthaceae), *A. germinans* (L.) L. (Acanthaceae), *Laguncularia racemoosa* (L.) C.F. Gaertn. (Combretaceae) e *Conocarpus erectus* L. (Combretaceae).

*Rhizophora mangle* L. conhecida popularmente como mangue vermelho se desenvolve em regiões tropicais e subtropicais. Sua distribuição vai desde a África Ocidental até a costa Pacífica da América tropical. Nas Américas, apresenta ampla distribuição no lado do Oceano Atlântico com limite próximo aos 29° N na Flórida (JIMENEZ, 2000) até o sul do Brasil aos 27°30' S (SOARES et al., 2012). Na costa Pacífica do continente, ocorre desde o México até o norte do Chile (TOMLINSON, 1986). 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 (SILVA et al., 2005; PETRI et al., 2011). No litoral capixaba, a espécie ocorre desde Conceição da Barra, extremo norte do estado, até Presidente Kennedy na divisa com o Rio de Janeiro (VALE e FERREIRA, 1998). É considerada uma espécie vivípara onde o embrião se desenvolve na planta-mãe (CLARKE e ALLAWAY, 1993). Após o período de maturação do embrião (3 a 6 meses), os propágulos desenvolvidos são liberados e dispersos pelas correntes até a implantação (VAN DER STOCKEN et al., 2019).

Entre os serviços ecossistêmicos providos pelo manguezal incluem-se a biofiltração, a retenção e ciclagem de nutrientes e carbono, proteção física das zonas costeiras durante tempestades e outros distúrbios de grande escala (LOVELOCK e ELLISON, 2007). Ao longo do globo, espécies do gênero fornecem bens como a madeira para a construção de embarcações e lenha para a subsistência de povos tradicionais. O tanino presente no córtex de *R. mangle* é usado para impermeabilizar um dos principais símbolos da cultura popular do Espírito Santo - a panela de barro de Goiabeiras - cuja fabricação de forma artesanal foi tombada pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional como patrimônio imaterial do Espírito Santo (IPHAN, 2009).

Intervenções antrópicas na zona costeira irão reduzir a resiliência do ecossistema, tornando-o mais vulnerável às pressões ambientais (ELLISON e FARNSWORTH, 1996; LOVELOCK e ELLISON, 2007) tanto de origem natural quanto antrópica. Desta forma, os manguezais se tornam mais suscetíveis a doenças e pragas quando estressados por alterações de salinidade, de inundação das marés, nas taxas de sedimentação, nas características físico-químicas do solo, por introdução de poluentes e por danos causados por tempestades e ciclones (ALONGI, 2002).

O estado do Espírito Santo é detentor do maior complexo de produção e exportação de pelotas de ferro do mundo (IBEF, 2011). Em novembro de 2015 mais de 50 milhões de metros cúbicos de rejeitos de mineração foram liberados no rio Doce quando a barragem de Fundão

rompeu causando o maior desastre ambiental da história brasileira (IBAMA, 2015) e um dos maiores desastres ambientais da indústria da mineração (CARMO et al., 2017). A lama então percorreu o rio Doce e alcançou a região estuarina 17 dias após a queda da barragem. O transporte e a liberação das plumas de rejeito ao longo da costa impactaram os ecossistemas marinhos, estuarinos e costeiros em uma escala ainda desconhecida (MIRANDA e MARQUES, 2016) Neto et al. (2016) realizaram amostragens antes e após a chegada dos rejeitos na foz do Rio Doce e na plataforma continental adjacente, demonstrando o aumento das concentrações de Fe, Al, Mn e Cr após a pluma dos rejeitos. Para o Fe total, a concentração mais elevada (52.360 mg/L) foi registrada nas amostras de água de fundo coletadas na estação próxima à linha de costa. Para a fração dissolvida, a concentração máxima foi de 226 mg/L em uma estação localizada perto da desembocadura (NETO et al., 2016).

Diante do exposto o ecossistema manguezal é considerado por muitos pesquisadores como um sumidouro de metais traço, seja retendo-os no sedimento ou na biomassa da vegetação. Avaliar o desenvolvimento de plântulas de mangue em diferentes concentrações de metais traço é de fundamental importância para que se possa traçar estratégias de conservação e preservação dos bosques, e como ferramenta de manejo em áreas poluídas e/ou degradadas.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho fotossintético (fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas na assimilação de carbono) e o desenvolvimento de plântulas de *Rhizophora mangle* em cultivo *ex situ* sob diferentes concentrações de Fe e Al.

### 2.2 Objetivos específicos

Correlacionar o desempenho fotossintético das plântulas com o aumento da concentração do Fe e Al no meio de cultivo;

Averiguar o crescimento e desenvolvimento das plântulas de *R. mangle* nas diferentes concentrações de Fe e Al;

Correlacionar a produção foliar em plântulas de *R. mangle* com o aumento da concentração dos contaminantes no meio de cultivo.

Estimar a biomassa por compartimento (raiz, caule e folhas) nas diferentes concentrações de Fe e Al.

Avaliar a bioacumulação dos metais na parte aérea e raiz nas diferentes concentrações dos metais.

Contribuir para estimativa do tamanho da amostra e parcela para minimizar o erro amostral, uniformizar os estudos e diminuir o impacto sobre as populações amostrais.

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

O capítulo 1 intitulado: Efeito do ferro na morfofisiologia em plântulas de *Rhizophora mangle* L. Deste capítulo foi escrito o artigo: The role of iron on the growth and development of the seedlings of *Rhizophora mangle* L. Publicado na revista *Scientific Research and Essays*. Foram avaliados o crescimento inicial, produção foliar, alocação de biomassa, bioacumulação, fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas das plântulas cultivados em substrato com excesso de ferro.

O capítulo 2 intitulado: Efeito do alumínio no crescimento inicial e fisiologia de plântulas de *Rhizophora mangle* L. Teve como objetivo avaliar as respostas morfológicas e fotoquímicas após o cultivo em substrato com excesso de alumínio.

O capítulo 3 intitulado: Experimentos *ex situ* de *Rhizophora mangle*: Qual o tamanho ideal da amostra e da parcela? Este capítulo foi escrito em forma de artigo e faz uso dos dados morfológicos iniciais dos propágulos utilizados neste e em experimentos anteriores. Teve como objetivo determinar o tamanho da amostra e de parcela em experimentos *ex situ* utilizando propágulos de *R. mangle*.

## Metodologia Geral

### 3.1 Coleta e desinfestação dos propágulos.

Os propágulos de *R. mangle* foram coletados em diferentes indivíduos adultos no manguezal da Guaxindiba, região localizada nas cercanias da foz natural do rio Itaúnas (Figura 1) por esforço intensivo, considerando as duas margens do rio. Após a coleta, os propágulos foram acondicionados em sacos plásticos e transportados para o laboratório de Ecologia do Ecossistema Manguezal (CEUNES/UFES) para serem triados. Os indivíduos coletados (N = 497) foram lavados em água corrente com detergente neutro para retirar resíduos de lama e areia, bem como micro-organismos, após a lavagem foram triados e, apenas os indivíduos sem avarias, foram selecionados para implantação de todo o experimento. Na sequência, os propágulos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% durante 10 minutos seguido de tríplice enxágue. Este protocolo foi estabelecido para este projeto uma vez que não existem protocolos para a espécie na literatura, sendo o teste realizado com diferentes

concentrações até o estabelecimento de concentração mínima sem injúrias ao meristema apical e radicular.

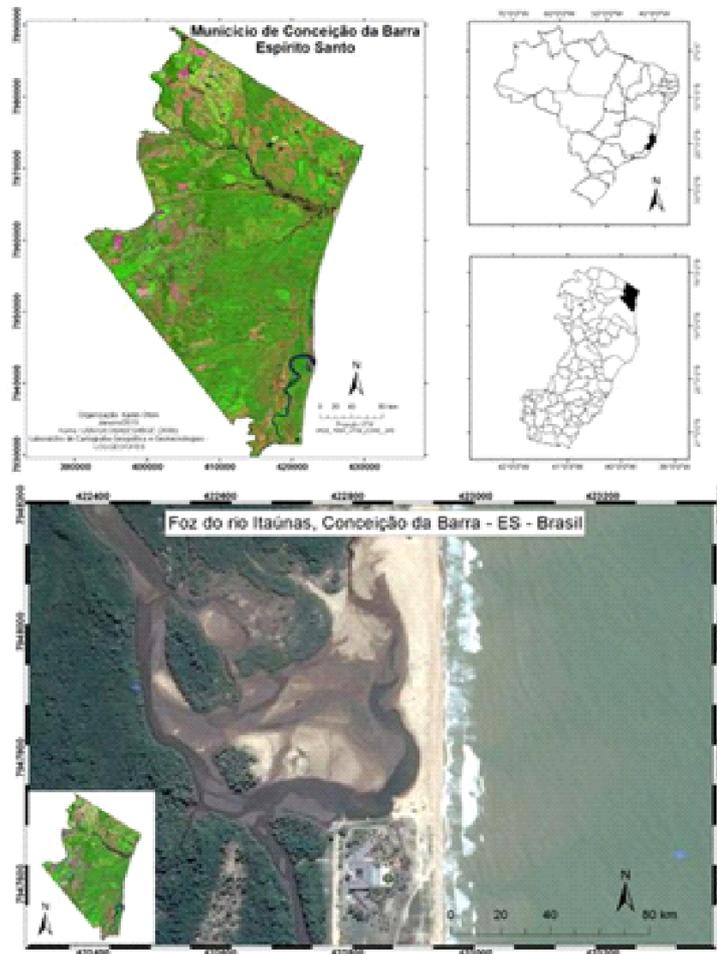


Figura 1: Foz natural do rio Itaúnas, Conceição da Barra (ES)

Após a assepsia, os propágulos foram numerados aleatoriamente para acompanhamento individual durante as diferentes etapas deste projeto. Após numeração, tiveram seu comprimento obtido por meio de trena calibrada (Starrett) e seu peso fresco (g) aferido em balança analítica com precisão de 0,001g (AL500C, Marte). Em experimentos *in situ*, Souza et al (2003) observaram que o estabelecimento dos propágulos de *R. mangle* ocorre independentemente do tamanho, porém indivíduos maiores cresceram mais rápido. Procurando evitar a interferência do tamanho na taxa de crescimento dos propágulos neste experimento, estes foram padronizados sendo classificados quanto ao tamanho.

Desta forma, foram utilizados no experimento os propágulos com maior comprimento entre os coletados e selecionados, ou seja, aqueles distribuídos no intervalo de 15 a 32 cm, sendo respeitada uma amplitude de variação do comprimento em 4 cm por bloco. Os remanescentes e aqueles que se encontravam fora desta faixa de tamanho foram levados à

estufa bacteriológica à 60° C (MBSSA11L, Fortinox) até obtenção de peso constante e estes dados foram utilizados para a determinação de equação de regressão de forma a permitir a utilização da relação entre massa fresca e massa seca como referencial para avaliar a incorporação de biomassa das plântulas no final dos tratamentos.

### 3.2 Desenho experimental e meio de cultivo

O delineamento experimental foi definido em blocos casualizados (DBC), distribuídos em cinco tratamentos (controle mais quatro concentrações distintas de Fe ou Al), com sete repetições por concentração, resultando em 35 parcelas experimentais. Cada parcela experimental continha quatro propágulos totalizando 140 propágulos (Figura 2).

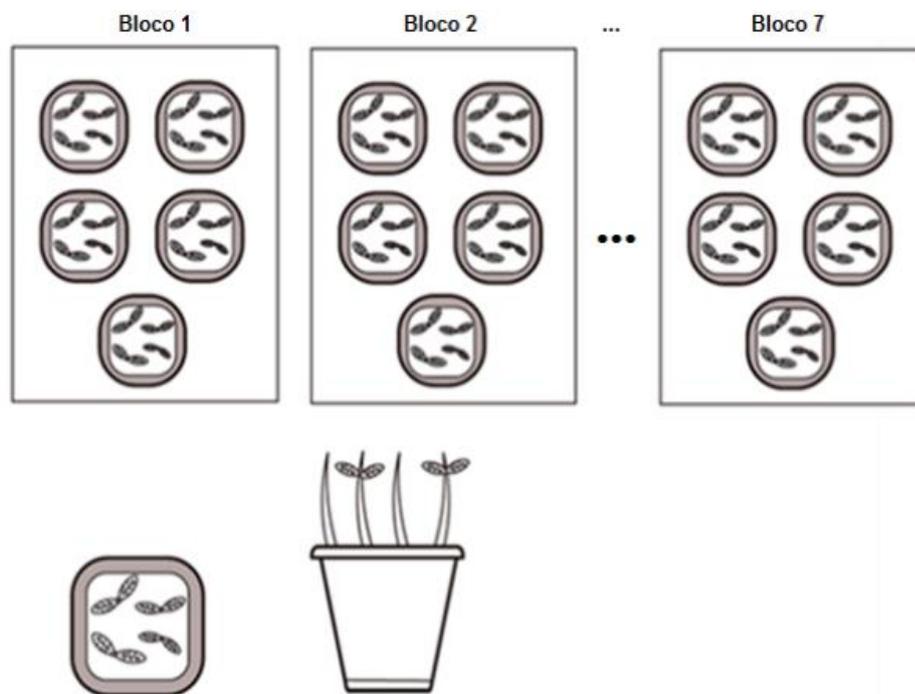


Figura 2: Esquema ilustrativo para demonstrar a distribuição dos propágulos de *R. mangle* nos vasos para cultivo (parcelas) e sua disposição em blocos casualizados nas bancadas no interior da casa de vegetação.

Os propágulos foram cultivados em casa de vegetação situada no campus da UFES em São Mateus (CEUNES), em recipientes (vasos) plásticos com as seguintes dimensões: 49 cm de altura, 20 cm de largura, com capacidade máxima de 20 litros (19,6 L). A técnica de cultivo empregada foi a hidroponia sendo utilizada para cada amostra 10 L de solução de Hoagland e Arnon (1950) a meia força, sendo o pH da solução ajustado a 6 considerado adequado para assimilação de nutrientes e para garantir o melhor desenvolvimento das plântulas. Pelo fato das plantas serem classificadas como halófitas (TOMLINSON, 1986) foram adicionados à solução 14,61 g/L<sup>-1</sup> de NaCl por litro de solução (Apêndice 1) resultando numa concentração salina de 20 ppm. Esta etapa de cultivo foi mantida durante 84 dias (i. e., de fevereiro a maio 2019) com

o surgimento do primeiro par de folhas, após expansão dos cotilédones do embrião. A partir desta etapa, foi considerado que os propágulos já eram capazes de autossustentação, não dependendo mais das reservas contidas no hipocótilo passando então a denominar os indivíduos de plântulas. Este procedimento foi adotado em função dos estudos *in situ* realizados por Lima et al. (2018) no rio Itaúnas que identificou o sucesso de desenvolvimento a partir de três meses de implantação dos propágulos. Transcorrido esse tempo, as soluções foram trocadas e os tratamentos implementados. O experimento foi monitorado por 270 dias sendo 190 destes com as plântulas cultivadas nos tratamentos (Figura 3).

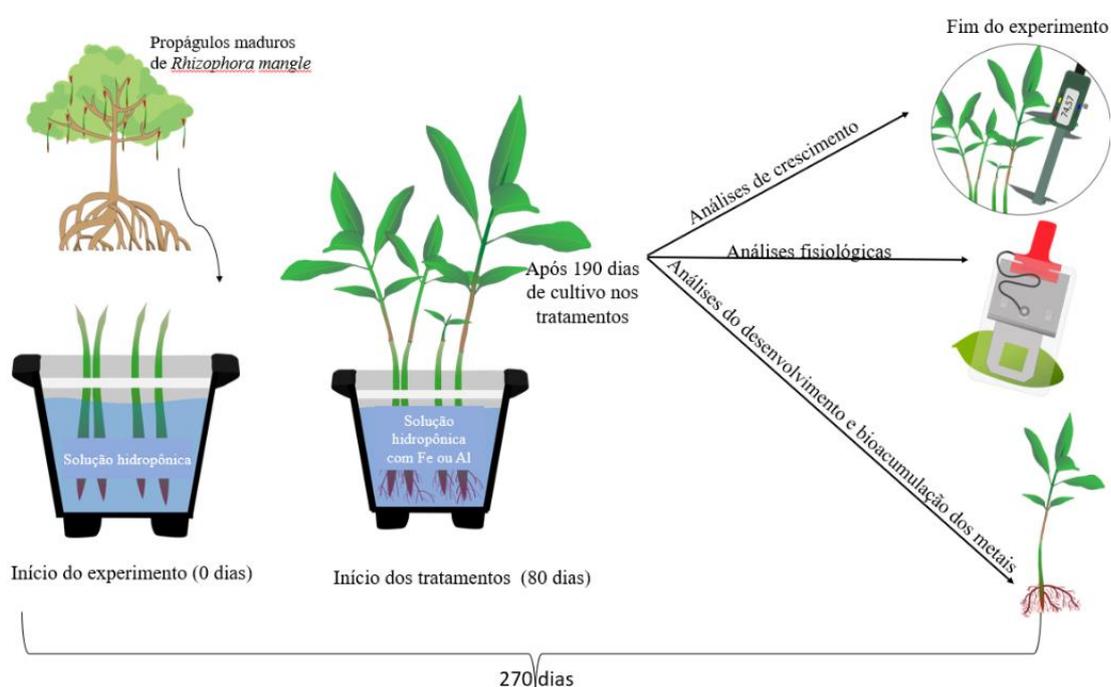


Figura 3: linha do tempo experimental

Será empregada a nomenclatura experimento para identificar todo processo desde o início do cultivo com os propágulos e o termo tratamento será utilizado para indicar os processos que ocorreram após a introdução do Fe e Al, nos cultivos. O termo desenvolvimento envolve a aquisição de biomassa seja na forma de folhas ou de raízes e a denominação crescimento será empregada para estimar o ganho em altura dos indivíduos já na fase definida como plântulas.

### 3. Referências

ALONGI, Daniel M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environmental conservation**, v. 29, n. 3, p. 331-349, 2002.

ALONGI, Daniel M.; MUKHOPADHYAY, Sandip K. Contribution of mangroves to coastal carbon cycling in low latitude seas. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 213, p. 266-272, 2015.

APPENROTH, Klaus-J. Definition of “heavy metals” and their role in biological systems. In: **Soil heavy metals**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 19-29, 2010.

ARMSTRONG, W. Radial oxygen losses from intact rice roots as affected by distance from the apex, respiration and waterlogging. **Physiologia plantarum**, v. 25, n. 2, p. 192-197, 1971.

AGORAMOORTHY, G.; CHEN, F. A.; HSU, M. J. Threat of heavy metal pollution in halophytic and mangrove plants of Tamil Nadu, India. **Environmental Pollution**, v. 155, n. 2, p. 320–326, 2008.

AMORIM, K. D. S. P. **Cultivo ex situ de Propágulos de *Rhizophora mangle* L. em diferentes concentrações salinas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, 2015.

ARRIVABENE, H. P. et al. Differential bioaccumulation and translocation patterns in three mangrove plants experimentally exposed to iron. Consequences for environmental sensing. **Environmental Pollution**, v. 215, p. 302–313, 1 ago. 2016.

ATWOOD, T. B., CONNOLLY, R. M., ALMAHASHEER, H., CARNELL, P. E., DUARTE, C. M., EWERS LEWIS, C. J., ... & LOVELOCK, C. E. (2017). Global patterns in mangrove soil carbon stocks and losses. *Nature Climate Change*, 7(7), 523-528.

AYRES, Manuel et al. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. **Instituto Mamirauá, Belém**, v. 364, 2007.

BAYEN, S. Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: a review. **Environment international**, 48, 84-101, 2012.

BELL, A. M.; DUKE, N. C. Effects of Photosystem II inhibiting herbicides on mangroves - Preliminary toxicology trials. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, n. 1–4, p. 297–307, 2005.

BODIN, N. et al. Assessment of trace metal contamination in mangrove ecosystems from Senegal, West Africa. **Chemosphere**, v. 90, n. 2, p. 150–157, 2013.

BOTHE, Hermann. Plants in heavy metal soils. In: **Detoxification of heavy metals**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 35-57.

CABRAL, L. et al. Anthropogenic impact on mangrove sediments triggers differential responses in the heavy metals and antibiotic resistomes of microbial communities. **Environmental Pollution**, v. 216, p. 460–469, 1 set. 2016.

DO CARMO, F. F., KAMINO, L. H. Y., JUNIOR, R. T., DE CAMPOS, I. C., DO CARMO, F. F., SILVINO, G., ... PINTO, C. E. F. Fundão tailings dam failures: the environment tragedy of the largest technological disaster of Brazilian mining in global context. *Perspectives in ecology and conservation*, 15(3), 145-151, 2017.

Cintrón, G., and Schaeffer-Novelli, Y. Introducción a la ecología del manglar. Oficina Regional de Ciencia y tecnología de la UNESCO Para América Latina y el Caribe- ROSTLAC, Montevideo, pp. 109, 1983.

CHENG, H. et al. Interactions among Fe<sup>2+</sup>, S<sup>2-</sup>, and Zn<sup>2+</sup> tolerance, root anatomy, and radial oxygen loss in mangrove plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 7, p. 2619–2630, 2012.

CLARKE, P.J., ALLAWAY, W.G. The regeneration niche of the grey mangrove (*Avicennia marina*): effects of salinity, light and sediment factors on establishment, growth and survival in the field. *Oecologia* 93, 548-556, 1993.

DONATO, D. C., KAUFFMAN, J. B., MURDIYARSO, D., KURNIANTO, S., STIDHAM, M., KANNINEN, M. (2011). Mangroves among the most carbon-rich forests in the tropics. *Nature geoscience*, 4(5), 293-297.

DUKE, N. C., MEYNECKE, J. O., DITTMANN, S., ELLISON, A. M., ANGER, K., BERGER, U., DAHDOUH-GUEBAS, F. A world without mangroves?. **Science**, 317(5834), 41-42, 2007.

Ellison, A.M., Farnsworth, E.J. Spatial and temporal variability in growth of *Rhizophora mangle* saplings on Coral Cays: links with variation in insolation, herbivory, and local sedimentation rate. *J. Ecol.* 84, 717-731, 1996.

FARIAS, C. O. et al. **Trace Metal Contamination in Mangrove Sediments, Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil**. *Braz. Chem. Soc.* [s.l: s.n.].

FELLER, I. C. et al. Biocomplexity in mangrove ecosystems. **Annual Review of Marine Science**, v. 2, n. 1, p. 395–417, 15 jan. 2010.

GEDAN, K. B., ALTIERI, A. H., FELLER, I., BURRELL, R., & BREITBURG, D. (2017). Community composition in mangrove ponds with pulsed hypoxic and acidified conditions. *Ecosphere*, 8(12), e02053.

GHOSH, S. et al. Assessment of role of rhizosphere process in bioaccumulation of heavy metals in fine nutritive roots of riparian mangrove species in river Hooghly: Implications to global anthropogenic environmental changes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 174, 1 jan. 2022.

GIRI, C. et al. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, v. 20, n. 1, p. 154–159, jan. 2011.

RAMOS, M. G. M., GERALDO, L. P. Avaliação das espécies de plantas *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle* como bioindicadoras de poluição por metais pesados em ambientes de mangues. **Engenharia sanitária e ambiental**, v. 12, p. 440-445, 2007.

GOPALAKRISHNAN, G. et al. Distribution determination, risk assessment, and source identification of heavy metals in mangrove wetland sediments from Qi'ao Island, South China. **Regional Studies in Marine Science**, v. 33, 1 jan. 2020.

HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular*. **California agricultural experiment station**, 347(2nd edit), 1950.

HUANG, G. Y.; WANG, Y. S. Physiological and biochemical responses in the leaves of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*) exposed to multiple heavy metals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 182, n. 1–3, p. 848–854, 2010.

HUANG, G. Y.; WANG, Y. S.; YING, G. G. Cadmium-inducible BgMT2, a type 2 metallothionein gene from mangrove species (*Bruguiera gymnorrhiza*), its encoding protein

shows metal-binding ability. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 405, n. 1–2, p. 128–132, 2011.

JIMÉNEZ J. A. Rhizophora mangle L. Mangle colorado. Bioecología de arboles nativos y exóticos de Puerto Rico y las Indias Occidentales: silvics of native and exotic tree species of Puerto Rico and the Caribbean Islands. Puerto Rico: **United States Department of Agriculture** 450-455, 2000.

KATHIRESAN, Kandasamy; BINGHAM, Brian L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. 2001.

LIMA, K.O.O., TOGNELLA, M.M.P., CUNHA, S.R. ANDRADE, H.A. Growth models of Rhizophora mangle L. seedlings in tropical southwestern Atlantic. **Estuar.Coast. Shelf Sci.** 207, 154-163, 2018.

LIU, Y., TAM, N. F. Y., YANG, J. X., PI, N., WONG, M. H., & YE, Z. H. Mixed heavy metals tolerance and radial oxygen loss in mangrove seedlings. *Marine Pollution Bulletin*, 58(12), 1843-1849, 2009.

LORRAINE MEJÍAS, C.; CARLOS MUSA, J.; OTERO, J. Exploratory Evaluation of Retranslocation and Bioconcentration of Heavy Metals in Three Species of Mangrove at Las Cucharillas Marsh, Puerto Rico. **Journal of Tropical Life Science**, v. 3, n. 1, p. 14–22, 2013.

LOVELOCK, C. E.; ELLISON, J. C. Vulnerability of mangroves and tidal wetlands of the Great Barrier Reef to climate change. 2007.

MACFARLANE, G. R.; BURCHETT, M. D. Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove Avicennia marina (Forsk.) Vierh. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 1, p. 65–84, 2002.

MACFARLANE, G. R.; KOLLER, C. E.; BLOMBERG, S. P. Accumulation and partitioning of heavy metals in mangroves: A synthesis of field-based studies. **Chemosphere**, v. 69, n. 9, p. 1454–1464, 2007.

MACFARLANE, G. R.; PULKOWNIK, A.; BURCHETT, M. D. Accumulation and distribution of heavy metals in the grey mangrove, Avicennia marina (Forsk.) Vierh.: Biological indication potential. **Environmental Pollution**, v. 123, n. 1, p. 139–151, 2003.

MACHADO, W. et al. Trace metals in mangrove seedlings: Role of iron plaque formation. **Wetlands Ecology and Management**, v. 13, n. 2, p. 199–206, abr. 2005.

MANJU, M. N. et al. Trace metal distribution in the sediment cores of mangrove ecosystems along northern Kerala coast, south-west coast of India. **Marine Pollution Bulletin**, v. 153, 1 abr. 2020.

MARCHAND, C.; ALLENBACH, M.; LALLIER-VERGÈS, E. Relationships between heavy metals distribution and organic matter cycling in mangrove sediments (Conception Bay, New Caledonia). **Geoderma**, v. 160, n. 3–4, p. 444–456, 15 jan. 2011.

MARCHAND, C.; FERNANDEZ, J. M.; MORETON, B. Trace metal geochemistry in mangrove sediments and their transfer to mangrove plants (New Caledonia). **Science of the Total Environment**, v. 562, p. 216–227, 15 ago. 2016.

MCLUSKY, D S., ELLIOTT, M. **The estuarine ecosystem: ecology, threats and management**. OUP Oxford, 2004.

MENGEL, K. Alternative or complementary role of foliar supply in mineral nutrition. In: **International Symposium on Foliar Nutrition of Perennial Fruit Plants 594**. 2001. p. 33-47.

MIRANDA, L. S.; MARQUES, A. C. Hidden impacts of the Samarco mining waste dam collapse to Brazilian marine fauna - an example from the staurozoans (Cnidaria). **Biota Neotropica**, v. 16, n. 2, 2016.

MOUSHMI, K. S. et al. Trace metal distribution and ecological risk assessment in the core sediments of a highly urbanized tropical mangrove ecosystem, Southwest coast of India. **Marine Pollution Bulletin**, v. 175, 1 fev. 2022.

NAGELKERKEN, I. S. J. M., BLABER, S. J. M., BOUILLON, S., GREEN, P., HAYWOOD, M., KIRTON, L. G., ... & SOMERFIELD, P. J. (2008). The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: a review. *Aquatic botany*, 89(2), 155-185.

NATH, B. CHAUDHURI, P. BIRCH, G. Assessment of biotic response to heavy metal contamination in *Avicennia marina* mangrove ecosystems in Sydney Estuary, Australia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 284-290, 2014.

NETO, R. R. et al. The worst brazilian environmental disaster altered the distribution of metals in water at the doce river estuary and marine region. 2016.

NORONHA-D'MELLO, C. A.; NAYAK, G. N. Assessment of metal enrichment and their bioavailability in sediment and bioaccumulation by mangrove plant pneumatophores in a

tropical (Zuari) estuary, west coast of India. **Marine Pollution Bulletin**, v. 110, n. 1, p. 221–230, 15 set. 2016.

PASCOALINI, S. S. et al. Structural plasticity and species distribution in a peri-urban mangrove of Southeastern Brazil. **Scientific Research and Essays**, v. 14, n. 11, p. 129–144, 2019.

PASCOALINI, S. S. TOGNELLA, M., FALQUETO, A., SOARES, M. Photosynthetic efficiency of young *Rhizophora mangle* L. in a mangrove in southeastern Brazil. **PHOTOSYNTHETICA**, v. 60, n. 3, p. 337-349, 2022.

PREDA, M.; COX, M. E. Trace metal occurrence and distribution in sediments and mangroves, Pumicestone region, southeast Queensland, Australia. **Environment International**, v. 28, n. 5, p. 433–449, 1 nov. 2002.

QIU, Y. W., YU, K. F., ZHANG, G., & WANG, W. X. Accumulation and partitioning of seven trace metals in mangroves and sediment cores from three estuarine wetlands of Hainan Island, China. **Journal of Hazardous Materials**, 190(1-3), 631-638, 2011.

RAY, R. et al. Storage and recycling of major and trace element in mangroves. **Science of the Total Environment**, v. 780, 1 ago. 2021.

REITERMAJER, D.; CELINO, J. J.; QUEIROZ, A. F. DE S. Heavy metal distribution in the sediment profiles of the Sauípe River Estuary, north seashore of the Bahia State, Brazil. **Microchemical Journal**, v. 99, n. 2, p. 400–405, nov. 2011.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y., CINTRON-MOLERO, G., ADAIME, R.R., CAMARGO, T.M., 1990. Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian coast. *Estuaries* 13, 204-218.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y., CINTRÓN-MOLERO, G., SOARES, M. L. G., DE-ROSA, T. Brazilian mangroves. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, 3(4), 561-570, 2010.

SHEN, X. et al. Does combined heavy metal stress enhance iron plaque formation and heavy metal bioaccumulation in *Kandelia obovata*? **Environmental and Experimental Botany**, v. 186, 1 jun. 2021.

SILVA, C. A. R., LACERDA, L. D., & REZENDE, C. E. Metals reservoir in a red mangrove forest. **Biotropica**, 339-345, 1990.

SILVA, M. A. B. D., BERNINI, E. CARMO, T. M. S. D. Características estruturais de bosques de mangue do estuário do rio São Mateus, ES, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 19, 465-471, 2005.

SILVERIO, P. F. *Bases técnico-científicas para a derivação de valores-guias de qualidade de sedimentos para metais: experimentos de campo e laboratório*. Diss. Universidade de São Paulo, 2003.

SPALDING, Mark. **World atlas of mangroves**. Routledge, 2010.

SOARES, M. L. G., ESTRADA, G. C. D., FERNANDEZ, V., TOGNELLA, M. M. P. Southern limit of the Western South Atlantic mangroves: Assessment of the potential effects of global warming from a biogeographical perspective. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 101, 44-53, 2012.

TOGNELLA-DE-ROSA, M. M. P., CUNHA, S. R., SOARES, M. L. G., SCHAEFFER-NOVELLI, Y., & LUGLI, D. O. Mangrove evaluation-an essay. **Journal of Coastal Research**, 1219-1224, 2006.

TAM, N. FY; WONG, Y.S. Accumulation and distribution of heavy metals in a simulated mangrove system treated with sewage. In: **Asia-Pacific conference on science and management of coastal environment**. Springer, Dordrecht, 1997. p. 67-75.

TOMLINSON, P. B. *the Botany of Mangroves* Cambridge University Press London. 1986.

TUE, N. T. et al. Historical profiles of trace element concentrations in Mangrove sediments from the Ba Lat Estuary, Red River, Vietnam. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, n. 3, p. 1315–1330, mar. 2012.

VAN DER STOCKEN, T., LOPEZ-PORTILLO, J., KOEDAM, N. Seasonal release of propagules in mangroves–Assessment of current data. **Aquatic Botany**, v. 138, p. 92-99, 2017.

WU, H., YIN, J. J., WAMER, W. G., ZENG, M., & LO, Y. M. Reactive oxygen species-related activities of nano-iron metal and nano-iron oxides. **Journal of Food and Drug Analysis**, 22(1), 86-94, 2014.

ZHOU, Y. Y.; WANG, Y. S.; INYANG, A. I. Ecophysiological differences between five mangrove seedlings under heavy metal stress. **Marine Pollution Bulletin**, v. 172, 1 nov. 2021.

## CAPÍTULO 1:

### **Efeito do ferro na morfofisiologia em plântulas de *Rhizophora mangle* L.**

#### Resumo

Ferro (Fe) é um elemento essencial e sua deficiência e excesso tem efeitos negativos no crescimento e fisiologia das plantas. Os metais traço estão entre os principais poluentes de origem antrópica que atinge o ecossistema manguezal. Este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos morfológicos e fisiológicos do excesso de Fe em plântulas de *Rhizophora mangle* L. em condições de cultivo *ex situ*. As plântulas previamente estabelecidas, foram transferidas para meio de cultivo contendo 45 (Controle); 135; 225; 270 e 315  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Fe, os indivíduos foram cultivados por 190 dias. O excesso do ferro levou a uma menor incorporação de biomassa, afetando sobre tudo a produção foliar no tratamento com maior concentração de Fe (315  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), levando em consideração a taxa de crescimento após 190 dias de exposição ao excesso do metal não houve diferença significativa entre o controle e os demais tratamentos, mas é possível observar uma tendência ao aumento do crescimento nas concentrações intermediárias (225 e 270  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e regressão do mesmo na maior concentração (315  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Foram observadas reduções na assimilação do carbono e condutância estomática nas maiores concentrações. O excesso do Fe na solução aumentou a sua concentração na biomassa vegetal. A análise integrada dos fatores ecológicos e fisiológicos são complementares sendo considerados bons indicadores para análise de toxidez do Fe, sendo as maiores inibições observadas nas maiores concentrações. As plântulas cultivadas na maior concentração (315  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) apresentaram uma redução na produção foliar e em todos os parâmetros fisiológicos, com exceção da  $C_i$  (vpm). A espécie mostrou uma grande resiliência em lidar com o metal acumulando a maior parte nas raízes, protegendo assim o aparato fotossintético.

#### 1. Introdução

A poluição por metais traço nos manguezais vem sendo alvo de diversas pesquisas no mundo. Sendo esta contaminação uma preocupação haja vista que esses elementos podem ser captados, armazenados na biomassa ou adsorvidos nas raízes e, posteriormente, transferidos

promovendo a biomagnificação dos metais ao longo da cadeia alimentar gerando toxicidade para a biota com o aumento da concentração (COIMBRA, 2003; CARDWELL et al., 2013; NICA et al., 2012), com isto, os problemas são amplificados nos predadores de topo, onde se inclui o homem. A funcionalidade do manguezal em reter estes elementos no sedimento, possibilitando ao sistema agir como um filtro sedimentar e depois biológico, torna-se um fato preocupante uma vez que outros tensores impostos ao ecossistema podem disponibilizar estes metais já inertes no sedimento ou acumulados na biomassa vegetal.

Muitos destes metais são considerados como elementos nutritivos necessários às plantas, como é o caso do Ferro (Fe) sendo inclusive mineral abundante na crosta terrestre. Como nutriente essencial para as plantas, este elemento está envolvido em processos fundamentais como fotossíntese, respiração celular, metabolismo do nitrogênio e na síntese de DNA e de hormônios (BRIAT e LOBREAUX, 1997; BECANA et al., 1998; ROUT e SAHOO, 2015). Em condições nutricionais normais, o teor de Fe nas plantas em geral varia de 0,05 a 0,25 mg g<sup>-1</sup> (MARSCHNER, 1995). No entanto, quando a concentração interna deste elemento em nível celular excede o limiar máximo, esta passa a exercer efeitos citotóxicos (APPENROTH, 2010).

O ferro total presente no solo está em sua maior parte na forma oxidada (Fe<sup>3+</sup>), não sendo prontamente absorvida pelas plantas (FAGERIA et al., 1990). Portanto, apesar de abundante na crosta, nem sempre este elemento está biodisponível. Desta forma, para absorver o ferro, a estratégia comum desenvolvida entre dicotiledôneas e monocotiledôneas não-gramíneas envolve processos de acidificação do solo. Isto é feito pela extrusão de prótons por meio das ATPases presentes nas células epidérmicas radiculares (HELL e STEPHAN, 2003) que ao liberarem os prótons de H<sup>+</sup> captam elétrons provenientes do ferro. A acidificação do meio aumenta a solubilidade do ferro na rizosfera e, conseqüentemente, na redução do Fe<sup>3+</sup> oxidado para a forma solúvel Fe<sup>2+</sup> (KIM e GUERINOT, 2007). Mas este processo nos manguezais só ocorre na presença de oxigênio (TWILLEY e RIVERA-MORROY, 2009), isto é, nas camadas superficiais do sedimento ou mais profundas em solos arenosos.

O ciclo do ferro nos manguezais está intimamente ligado aos ciclos do carbono e do enxofre (ALONGI et al., 2005) haja vista a enorme concentração de matéria orgânica neste ambiente, tanto autóctone quanto alóctone. Quando em excesso no sedimento, o ferro pode interferir no crescimento das plântulas alterando a capacidade de armazenamento de nutrientes. Uma das conseqüências é dificultar a disponibilidade de fósforo proveniente do sedimento, outra é a precipitação de ferro como sulfetos de ferro o que pode favorecer o potencial de

toxicidade destes elementos (ALONGI, 2010) tanto para as plantas quanto para a biota no sedimento.

A toxidez por ferro para os organismos pode ocorrer por meio da absorção e acúmulo excessivo nos tecidos ou por meio da sua precipitação sobre as raízes, formando uma crosta de óxido férrico que altera a absorção de outros nutrientes como o fósforo, potássio e zinco (HOWELER, 1973). Os sintomas desta deficiência nutricional incluem atrofia da planta, redução das brotações, folhas alaranjadas, além de raízes cobertas por uma camada vermelha de ferro oxidado (VALH, 1991). Em situações de acúmulo excessivo de ferro nos tecidos, ocorre a potencialização de estresse oxidativo, com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) comprometendo o desenvolvimento dos indivíduos (WU et al., 2014).

As árvores de mangue possuem adaptações morfológicas e ecofisiológicas que em conjunto as tornam estrutural e funcionalmente como organismos únicos entre as plantas terrestres. Dentre estas adaptações anatômicas, fisiológicas e ecológicas, pode-se destacar a presença de raízes aéreas (de diferentes morfologias), embriões vivíparos (TOMLINSON, 1986), mecanismos de dispersão de propágulos feita pelas marés, rápidas taxas de produção de dossel, ausência frequente de um sub-bosque, retenção de nutrientes na biomassa estrutural e a capacidade de lidar com o sal (ALONGI, 2002).

Tendo em vista as características geomorfológicas, físicas e químicas do ambiente onde ocorrem estas espécies, o estresse fisiológico é quase uma constante nos manguezais. Diversos estudos investigam estas diferentes fontes de tensores para as plantas, entre eles se destacam aqueles voltados para avaliações do efeito da variação de salinidade (BALL, 2002; LOVELOCK et al., 2006), da disponibilidade de nutrientes (MCKEE, 1995; FELLER et al., 2002), dos efeitos da alta intensidade de luz (MCKEE, 1995), das consequências dos sedimentos anóxicos sobre o desenvolvimento (MCKEE, 1996) e da poluição causada por diferentes tipos de metais (ALONGI, 2010; CHENG et al., 2012; MEJIAS et al., 2013; ARRIVABENE et al., 2016). A avaliação do efeito dos metais traço sobre as espécies de mangue geralmente é focada nas consequências sobre o crescimento, na modificação da anatomia, no acúmulo destes metais e na sua translocação entre os tecidos vegetais.

Existem diferentes técnicas e métodos para se avaliar o efeito dos tensores sobre o crescimento e desenvolvimento dos mangues, como alguns deles aplicados nos estudos descritos acima. Apesar de serem ferramentas não invasivas, a avaliação da fluorescência da clorofila *a* e a análise de trocas gasosas são pouco utilizadas para elucidar os efeitos dos metais traço nas espécies de mangue. A primeira técnica fornece respostas provenientes das reações fotoquímicas da fotossíntese com informações acerca da estrutura e do funcionamento do

fotossistema II, dos centros de reação (CR) e do transporte de elétrons entre os fotossistemas II e I que podem explicar desvios de energia do processo luminoso resultando em menor eficiência fotossintética (FALQUETO et al., 2008; LOPES et al., 2019). A técnica da assimilação fotossintética e a eficiência no uso da água vem sendo aplicada, principalmente, em estudos relacionados ao estresse hídrico e salino cujo diagnóstico de dano também é imediato (NAIDOO et al., 2002; PASCOALINI et al., 2022).

A fase de plântula, isto é logo após a sua implantação no sistema, é considerada a mais vulnerável no ciclo de vida das plantas no manguezal (JIMENEZ et al., 1985). Durante esta etapa, o indivíduo está mais susceptível a danos causados por pragas, insetos, entre outros grupos de organismos, além disso, o estresse hídrico pode, rapidamente, mostrar-se prejudicial (RAVEN et al., 2014). Estes fatores externos aleatórios associados aos tensores naturais já existentes no ambiente podem induzir rapidamente o consumo das reservas dos cotilédones antes do indivíduo ter condições de nutrição sozinho. Além dos fatores externos que podem interferir no desempenho das plântulas (salinidade, luminosidade, temperatura, anoxia, geomorfologia, entre outros), o seu sucesso no ambiente também será influenciado pelas diferenças intrínsecas dos indivíduos (MCKEE, 1995).

Por ser um micronutriente essencial para plantas, o Fe está diretamente envolvido na fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, síntese hormonal e manutenção do cloroplasto (HÄNSCH e MENDEL, 2009). Apesar de ser fundamental para o bom desenvolvimento vegetal, ainda não há uma compreensão de quais são os efeitos do excesso de Fe sobre o crescimento e a assimilação de carbono? Mediante os estudos que relacionam os nutrientes necessários para o desenvolvimento das plântulas de mangue e diante dos processos de acúmulo de metais nos ambientes estuarinos e costeiros, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do Fe no desenvolvimento e na fisiologia de plântulas de *R. mangle* em condições de cultivo *ex situ*. Tendo como hipótese que em altas concentrações, o ferro irá afetar a capacidade fotoquímica das plântulas de *R. mangle* acarretando na redução do desenvolvimento e crescimento das plântulas.

## 2. Metodologia

As etapas descritas abaixo ocorreram posteriormente aquelas descritas na metodologia geral desta tese (Capítulo 1). Por ocasião da elaboração dos artigos serão repetidas.

## 2.1 Implementação do ferro

Para avaliar o efeito do excesso de ferro no desenvolvimento e na fisiologia das plântulas de *R. mangle*, aquelas previamente estabelecidas no período de adaptação, foram aleatorizadas de acordo com os tratamentos definidos por diferentes concentrações de ferro. Para isto foram selecionadas 28 amostras com suas respectivas réplicas para o desenvolvimento desta etapa do estudo (Figura 1A-B). Os meios de cultivo existentes foram trocados para todas as amostras sendo, então, adicionadas à solução nutritiva de Hogland e Arnon (1950) diferentes concentrações de Fe na forma de cloreto de ferro ( $\text{FeCl}_3$ ). Isto resultou nos seguintes tratamentos, baseados na concentração final de Fe: (1) -  $45 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Controle); (2) -  $135 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (3) -  $225 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (4) -  $270 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; e (5) -  $315 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Fe (Figura 3C-D), sendo o pH da solução ajustado a  $5,5 \pm 0,2$ .

O Fe é um micronutriente essencial para o desenvolvimento vegetal (BECANA, 1998) e sua ausência na solução faria com que as plântulas apresentassem sinais da deficiência do micronutriente. Desta forma, o tratamento controle recebeu a concentração de Fe sugerida na literatura (Hoagland e Arnon, 1950) para não haver interferências na comparação entre os resultados do desempenho fotossintético, principalmente, no que diz respeito a fluorescência da clorofila a. Assim, a concentração do elemento no tratamento controle é a recomendada, ou seja,  $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ . As demais concentrações deste elemento nos tratamentos foram formuladas com base em experimentos prévios realizados com as espécies de mangue (ALONGI, 2010; ARRIVABENE et al., 2016).



Figura 1: Cultivo das plântulas de *Rhizophora mangle L.* em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) à meia força com diferentes concentrações de ferro, vasos possuem volume de 20L. A: Instalação do experimento (fevereiro de 2019) na casa de vegetação B: Distr: Distribuição dos propágulos em blocos (fevereiro 2019). C: Plântulas de *R. mangle* após 95 dias de cultivo (junho 2019) D: Distribuição das plântulas de *R. mangle* nos tratamentos contendo diferentes concentrações de Fe aos 95 dias de cultivo (junho 2019).

## 2.2 Dados Morfológicos

O experimento foi monitorado quinzenalmente durante 270 dias (i.e., de fevereiro a dezembro de 2019) sendo avaliado em todos os indivíduos o surgimento de folhas, de raízes e o incremento em altura (cm) para acompanhar o desenvolvimento das plântulas (nas réplicas em cada parcela de tratamento). Houve acompanhamento do desenvolvimento por meio de fotografias digitais obtidas por celular e câmera fotográfica (Nikon).

A cada monitoramento quinzenal, o número de folhas era obtido por contagem manual e individual em cada plântula partindo do epicótilo em direção ao hipocótilo, isto é, das folhas novas para as mais velhas. Não foi possível estimar a queda de folhas por tratamento, uma vez que os vasos estavam próximos inviabilizando a identificação da origem.

O comprimento do epicótilo das plântulas era obtido individualmente com o auxílio de paquímetro digital (King Tools  $\pm 0,01\text{mm}$ ), registrado em unidades de milímetros e convertidos a centímetro em planilhas do Excell<sup>®</sup> em cada avaliação. A referência para manter o ponto zero

de medição foi a marca da transição entre o hipocótilo e epicótilo e, a partir deste, media-se até o ápice da maior ramificação. Além do crescimento do epicótilo, foi estimado, mensalmente, o comprimento (cm) e a largura (cm) das folhas. Segundo Schaeffer-Novelli e Citron (1986), medidas da biometria foliar (comprimento e largura) são boas indicadores do desenvolvimento das espécies de mangue, pois a redução da superfície foliar sugere alteração no seu desenvolvimento.

### 2.3 Taxas de Crescimento

As medidas foram empregadas para determinar a taxa de crescimento (TC) que é calculada pela fórmula:  $TC = \Delta C / \Delta T$ . Onde  $\Delta C$  corresponde à variação da altura (em cm) e  $\Delta T$  (tempo em dias) refere-se ao intervalo entre as observações. A taxa de crescimento relativo (TCR), diferentemente da TC, leva em consideração o peso dos indivíduos, sendo balizada como:  $TCR = [(\ln Ps1 - \ln Ps2) / (Ti - Tf)]$ ; onde Ps1 e Ps2 correspondem, respectivamente, ao peso seco em gramas do indivíduo no início e ao final do experimento, isto é, em Ti e Tf (MCKEE, 1995). O peso seco inicial (Ps1) foi obtido com base nos 217 propágulos que não foram utilizados no experimento. A massa seca destes propágulos foi utilizada na elaboração da curva de regressão para correlação com os propágulos do experimento.

### 2.4 Parâmetros fisiológicos.

A fluorescência transiente da clorofila *a* e a assimilação de carbono foram avaliadas ao final do experimento (Figura 2 A e B) e correspondem aos parâmetros fisiológicos que vão identificar a eficiência do indivíduo na utilização da água, nutrientes e luz para a elaboração de biomassa líquida. Tendo em vista que todas as réplicas estavam sob mesmas condições ambientais (i. e., luz, nutrientes e temperatura), espera-se que as diferenças observadas nestes parâmetros entre os tratamentos representem a interferência do elemento em maior concentração na solução, neste caso, o ferro sobre a produção primária líquida.

Inicialmente, a fluorescência transiente da clorofila *a* foi medida ao final do experimento, isto é, após terem transcorridos 190 dias de cultivo a contar do início dos tratamentos com adição de ferro na solução de hidroponia contendo as plântulas já estabelecidas. As medidas foram feitas de forma aleatória em 14 folhas por tratamento (cada um deles continha 7 amostras com quatro réplicas) sempre na segunda folha totalmente expandida contada a partir do ápice do epicótilo. Esta recomendação é feita para padronizar a idade das folhas entre si, isto é, todas são maduras e são as mais novas no indivíduo.

As folhas foram previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos (FALQUETO et al., 2008) utilizando cliques foliares (Hanstech) para a oxidação completa do sistema fotossintético

(STRASSER et al., 2000). Os transientes foram induzidos com 1s de iluminação por um pulso de luz saturante com intensidade máxima de  $3000 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$  em uma área foliar de 4 mm de diâmetro utilizando-se para isso fluorômetro portátil (Handy PEA, Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK). Não foi realizado o censo, i. e., amostragem de todas as folhas expandidas para evitar danos ao indivíduo, uma vez que os cliques acabam sobrecarregando o pecíolo foliar por excesso de peso.

A partir da curva de fluorescência transiente OJIP, o teste JIP foi avaliado com base na Teoria de Fluxo de Energia em Biomembranas (STRASSER et al., 2000; 2004) considerando-se os parâmetros citados no apêndice 2. Estes parâmetros permitem avaliar os efeitos do tensor (contaminante, neste caso) sobre os transportes de elétrons e sobre a elaboração dos centros de reações luminosas associados aos pigmentos antena. Os resultados obtidos vão colaborar no entendimento sobre as consequências do aumento da concentração de Fe nos processos luminosos da fotossíntese.

A taxa de assimilação líquida de carbono ( $A \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e a concentração de  $\text{CO}_2$  intercelular ( $C_i \text{ vpm}$ ) foram obtidas utilizando o sistema portátil ADC, modelo L*Ci* (ADC, *BioScientific Ltd. Hoddesdon, England*), denominado de IRGA (Infra Red Gases Analyser). Para esta análise, as leituras foram realizadas durante o período da manhã (entre 8 horas e 10 h e 30 min), uma vez que se busca avaliar a assimilação das trocas gasosas após o efeito inibidor na assimilação causado pela baixa concentração interna do gás carbônico e antes do efeito externo provocado pelo excesso de luz que pode acarretar em aumento da temperatura foliar e, conseqüentemente, maior consumo de água (LARCHER, 2000; GURRENVITCH, 2009).

Esta análise permite avaliar o uso da água (transpiração) e as trocas gasosas nas plantas, indicando processos relacionados aos tensores naturais (salinidade, temperatura e luminosidade) ou o sinergismo destes com outros tensores, no caso, a concentração do ferro. Os tensores naturais foram minimizados, uma vez que os tratamentos ocorreram sob condições similares, modificando-se somente o parâmetro a ser avaliado. Com isto, assume-se que os tensores naturais vão apresentar baixa variabilidade entre os tratamentos. Portanto, as diferenças registradas são explicadas e interpretadas como resultantes da perda de energia líquida das plântulas, uma vez que as plantas devem realizar ajustes nos seus processos de assimilação para compensar as concentrações mais acentuadas do ferro (GURRENVITCH, 2009).

As medições foram realizadas em cinco folhas (segundo par, intactas e completamente expandidas) em cinco indivíduos, não foi realizado o censo, i. e., amostragem de todas as folhas expandidas para evitar danos ao indivíduo. A câmara do IRGA, mais ainda que o fluorômetro,

sobrecarrega o pecíolo foliar podendo quebrá-lo por excesso de peso. As análises fotoquímicas foram realizadas no mesmo dia, sequência.



Figura 2: Plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas por 270 dias em solução de Hoagland e Arnon (1950) com diferentes concentrações de Fe. A: Emprego de IRGA (Infra-red Gas Analyzer) para avaliar as assimilações das trocas gasosas, B: Folhas sendo adaptadas ao escuro com cliques foliares para aquisição da fluorescência transiente da clorofila *a*

## 2.5 Concentração de Ferro

Ao final do experimento, as plântulas de cada tratamento foram separadas em dois compartimentos, um contendo a parte aérea (caule e folhas) e outro somente a raiz. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel, identificados de acordo com cada compartimento e seu respectivo tratamento, sendo então levadas à estufa de circulação forçada (Fortinox SL 100) a 65 °C até peso constante. Em seguida, as amostras foram moídas em moinho tipo Wiley (Marca Tecnal; modelo TE650/1) com peneiras de malha 20 micras e enviadas para análise química para determinação da concentração de Fe no laboratório de análises agrônômicas Fullin. A técnica utilizada foi espectrofotometria de absorção atômica (Thermo Scientific ICE 3000) pelo método de Malavolta et al. (1997).

## 2.6 Análise estatística

Todos os dados biológicos obtidos neste capítulo foram analisados no período de exposição ao contaminante (i.e.,  $T_i = 95$  a  $T_f = 270$  dias). As avaliações temporais (dias) para

estimar o comprimento do epicótilo (cm) e produção de folhas foram submetidas à técnica de regressão, para estimar o modelo de crescimento entre os experimentos. As taxas de crescimento (TC) e de crescimento relativo (TCR), bem como, a incorporação de biomassa (B), os parâmetros morfológicos das folhas, parâmetros derivados do teste JIP e as trocas gasosas, após o teste de normalidade e de homocedasticidade, foram submetidas a análise de variância ANOVA One-Way seguida pelo teste de Dunnett com significância de 5%. Os testes estatísticos foram aplicados utilizando os softwares GENES (CRUZ., 2016) e BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007).

## 2.7 Retirada do experimento.

As plântulas foram retiradas após 270 dias do início do cultivo quando em fase ontogênica de propágulo e 190 dias após a inserção do ferro nas soluções. Isto é, a partir da definição dos tratamentos para avaliar o estresse causado por este elemento em distintas concentrações na solução nutritiva. Com isto, as plântulas foram retiradas da casa de vegetação e transportadas cuidadosamente ao laboratório de Ecologia (CEUNES-UFES) onde o experimento foi desmontado para obtenção dos dados de massa seca.

Cada réplica, por amostra e por tratamento, foi retirada dos vasos e lavada com água destilada preservando-se todas as estruturas, isto é, raiz, caule e folhas. Este material compõe a amostra composta por tratamento considerando todas as réplicas da parcela e foram etiquetados com base na numeração da mesma. Após este processamento inicial, cada amostra teve suas réplicas divididas em quatro compartimentos: hipocótilo, epicótilo (ramos e caules), raiz e folhas (Figura 3A e B). O corte para determinar o caule foi realizado acima da marca de incisão do fruto no hipocótilo e para raiz, logo acima da primeira emissão. Considerou-se como biomassa caulinar a projeção do epicótilo e os ramos laterais, conforme observado na primeira imagem da figura 3B.

Este material proveniente de cada amostra por tratamento foi pesado em balança analítica para obtenção da biomassa fresca e seca, em gramas, por amostra e por concentração de ferro nos seus respectivos tratamentos. O objetivo deste procedimento foi verificar a incorporação da biomassa em detrimento do crescimento somente, tornando mais eficiente a avaliação do efeito do ferro sobre a produção primária líquida. Este material seco foi enviado para análises da concentração do ferro por unidade de biomassa em cada compartimento, permitindo identificar quais são os órgãos com maior concentração deste elemento.

Em relação ao hipocótilo que é a parte mais representativa dos propágulos, foram estimados os diâmetros da base, meio e ponta com auxílio de um paquímetro digital (Kingtools

$\pm 0,01$  mm). Estes dados serão posteriormente correlacionados com o peso seco estimado do material vivo. Medidas individuais das folhas, por amostra, foram obtidas para determinação do comprimento (cm), largura (cm) e área foliar ( $\text{cm}^2$ ) com auxílio do scanner digital portátil (ADC modelo AM350). Estes dados servirão para avaliar o efeito do ferro sobre a unidade de área foliar.



Figura 3: Plântula (indivíduo) de *Rhizophora mangle* L. cultivada em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) à meia força. A: Imagem da plântula cultivada ao término do experimento, isto é, 270 dias no tratamento controle ( $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) B: Imagem mostrando a divisão dos compartimentos em epicótilo (ramos e caule), folhas, hipocótilo e raiz.

### 3. Resultados

#### 3.1 Parâmetros morfológicos

Os propágulos de *R. mangle* provenientes do manguezal da foz do rio Itaúnas (N = 497) apresentaram comprimento médio de  $25,10 \pm 4,66$  cm e peso médio de  $16,41 \pm 6,49$  g. O peso médio seco dos propágulos (N = 217) foi  $5,8 \pm 3$  g. Após sete dias de cultivo registrou-se a emissão das raízes para todos os cultivos. O epicótilo começou a se desenvolver, em média, no 27º dia e, em torno de 160 dias do início do experimento, foi observada estabilização do crescimento para todos os tratamentos, isto é, 73 dias após a implantação do ferro (Figura 4 A). O crescimento total do epicótilo foi avaliado ao final do experimento, sendo o menor (i. e., 9,91 cm) e maior (i. e., 10,87 cm) comprimento do epicótilo foram observados para os tratamentos com as concentrações de 315 e 270  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ferro, respectivamente (Figura 4B).

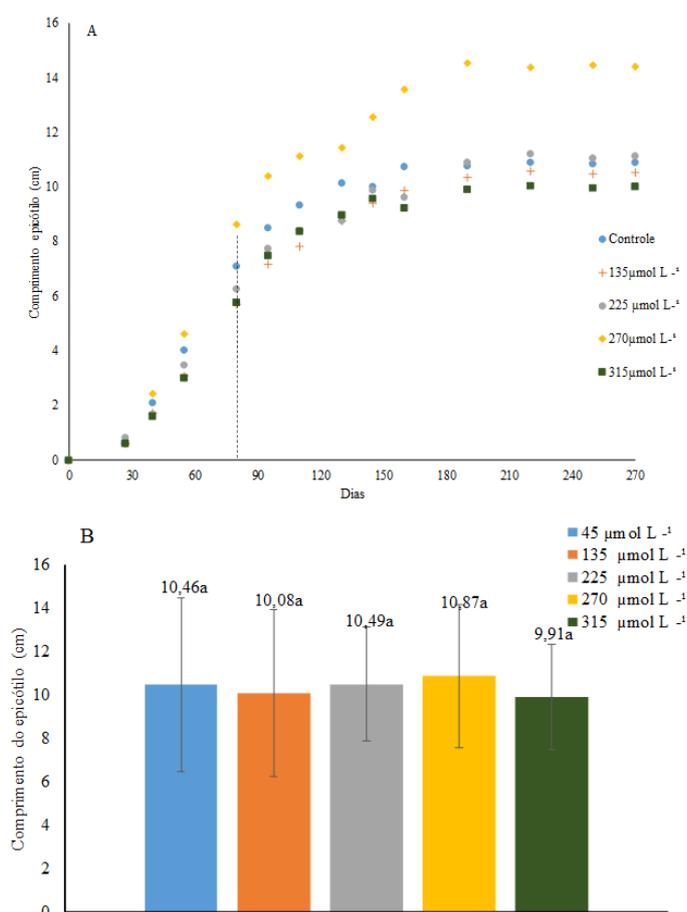


Figura 4: Comprimento (cm) do epicótilo das plântulas de *Rhizophora mangle L.* cultivadas em solução de Hoagland e Arnon (1950) à meia força. A: Comprimento (cm) do epicótilo ao longo 270 dias nos diferentes tratamentos. B: Comprimento médio (cm) do epicótilo ao longo 270 dias nos diferentes tratamentos. B: Comprimento médio (cm) do epicótilo ao final do experimento nas diferentes concentrações de Fe (médias das

avaliações entre os 95 e 270 dias de cultivo). Médias seguidas pela letra a não diferem em relação ao controle ( $45\mu\text{mol L}^{-1}$ ) pelo teste de Dunnett a 5 % de probabilidade.

As taxas de crescimento final (TC) variaram entre 0,27 a 0,32 ( $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ ) correspondendo aos tratamentos  $45\mu\text{mol L}^{-1}$  e  $270\mu\text{mol L}^{-1}$ , sendo o tratamento com maior concentração ( $315\mu\text{mol L}^{-1}$ ) apresentando crescimento similar ao controle ( $45\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Para taxa de crescimento relativo (TRC), a menor (0,048) e maior (0,070) foram observados nos tratamentos 45 (controle) e  $315\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente (Figura 5B). As taxas de crescimento final e crescimento relativo não apresentaram diferença estatística com relação ao controle.

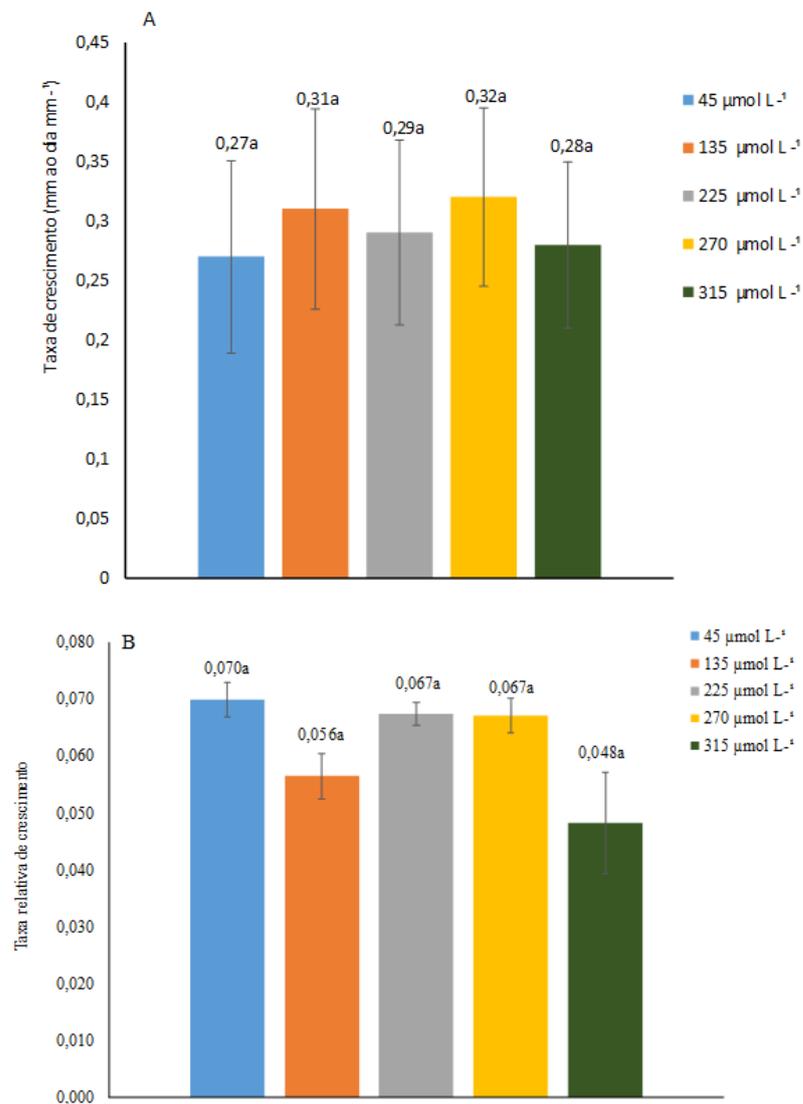


Figura 5: Taxas de crescimento das plântulas de *Rhizophora mangle L.* cultivadas em solução de Hoagland e Arnon (1950) à meia força. A: taxa de crescimento ( $\text{mm ao dia}^{-1}$ ) das plântulas aos 270 dias nas diferentes concentrações de ferro; B: taxa relativa de crescimento avaliação comparativa entre as doses aos 270 dias de cultivo. Médias seguidas da letra a não diferem do controle ( $45\mu\text{mol L}^{-1}$ ) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Reduções significativas do acúmulo de biomassa em todos compartimentos foram observadas nas amostras tratadas com  $315 \mu\text{mol L}^{-1}$  Fe, sem efeitos significativos para os demais tratamentos, com exceção do incremento no hipocótilo em  $270 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Fe (Figura 6).

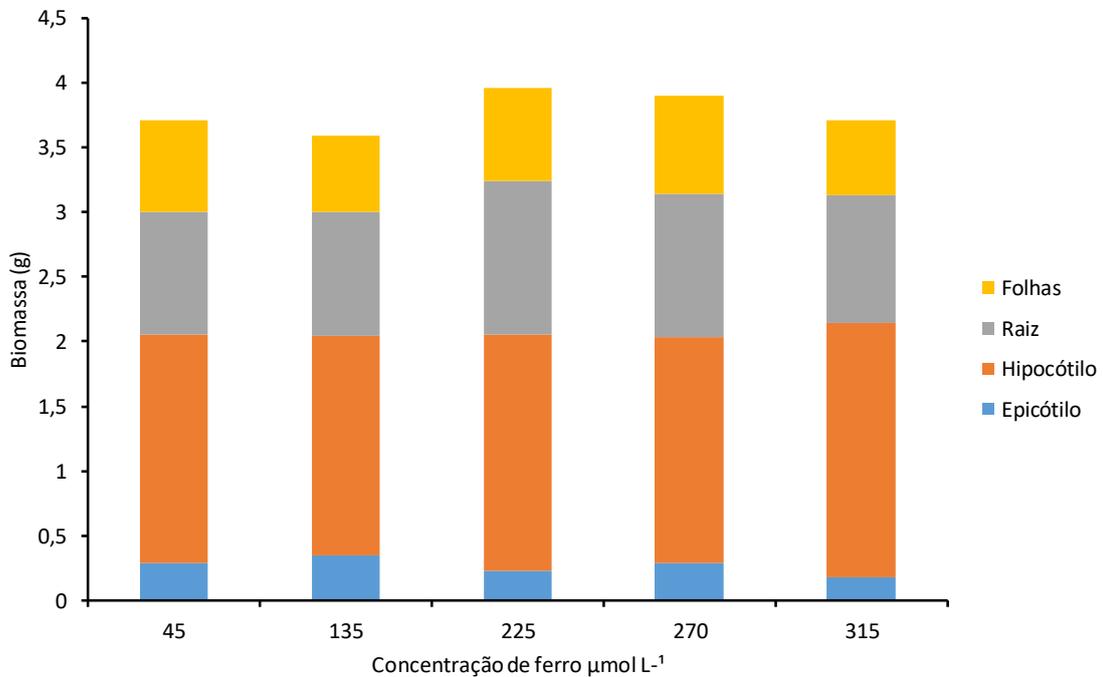


Figura 6: Biomassa dos compartimentos raiz, hipocótilo, epicótilo e folhas das plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas em diferentes concentrações de ferro ao término do experimento.

Apesar de exibirem a menor TC (Figura 5A), as plântulas cultivadas no controle ( $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) apresentaram a maior TRC e maior produção foliar média (Tabela 1) quando se compara com as cultivadas na maior dose ( $315 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Ao longo do experimento, as plântulas da solução  $45 \mu\text{mol L}^{-1}$  dobram em número enquanto aquelas no tratamento  $315 \mu\text{mol L}^{-1}$  declinam, indicando deficiência na aquisição de energia para a produção de biomassa que se reflete nas raízes e no epicótilo. Em relação à biomassa do hipocótilo, os dados sugerem que houve maior consumo de reserva no tratamento com ferro à  $315 \mu\text{mol L}^{-1}$  em relação ao controle ( $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Após iniciar o cultivo sob diferentes concentrações de Fe, as plântulas cultivadas no Tratamento Controle mantiveram o número de folhas similar ao cultivo em solução inicial; para todos os outros tratamentos houve perda de folhas ao longo do experimento. Após 80 dias de cultivo na presença de Fe, as plântulas de todos os tratamentos, à exceção das cultivadas em 315  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , mantiveram o mesmo número de folhas comparado ao Controle.

Tabela 1: Número médio de folhas por tratamento das plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas em solução de Hoagland e Arnon (1950) em diferentes concentrações de ferro.

Tempo de cultivo (dias)		Concentração de Fe, em $\mu\text{mol L}^{-1}$				
Início do experimento	Início dos tratamentos	45 (controle)	135	225	270	315
80	0	5.70a	6.27a	8.65a	5.75	7.11
95	15	5.00a	4.47a	4.87a	5.17a	4.83a
110	30	5.89a	5.44a	5.79a	5.60a	5.56a
130	50	6.66a	5.80a	6.76a	7.59a	6.13a
145	65	8.37a	7.61a	7.51a	8.30a	6.64a
160	80	8.72a	8.09a	7.31a	8.53a	6.56
190	110	8.81a	8.30a	7.51a	8.07a	5.76
220	140	8.67a	8.34a	7.54a	7.96a	5.46
250	170	9.47a	9.14a	7.69a	7.99a	5.46
270	190	10.00a	9.96a	7.41a	8.14a	5.46

Médias dos tratamentos com diferentes doses de ferro seguidas da letra a, não diferem do controle (45  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ferro) a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett

Ao avaliar a produção foliar ao longo do tempo, após o início dos tratamentos observou-se que as plântulas cultivadas nas menores concentrações (controle e 135  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Fe) mantiveram a produção foliar. Plântulas cultivadas em concentrações intermediárias (225 e 270  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Fe) estabilizaram o número de folhas. Para plântulas cultivadas em 315  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Fe, observou-se aumento na produção foliar seguido de perda, para esses indivíduos, diferentemente das plântulas cultivadas em concentrações intermediárias, não foi observada estabilização da produção foliar (Figura 7).

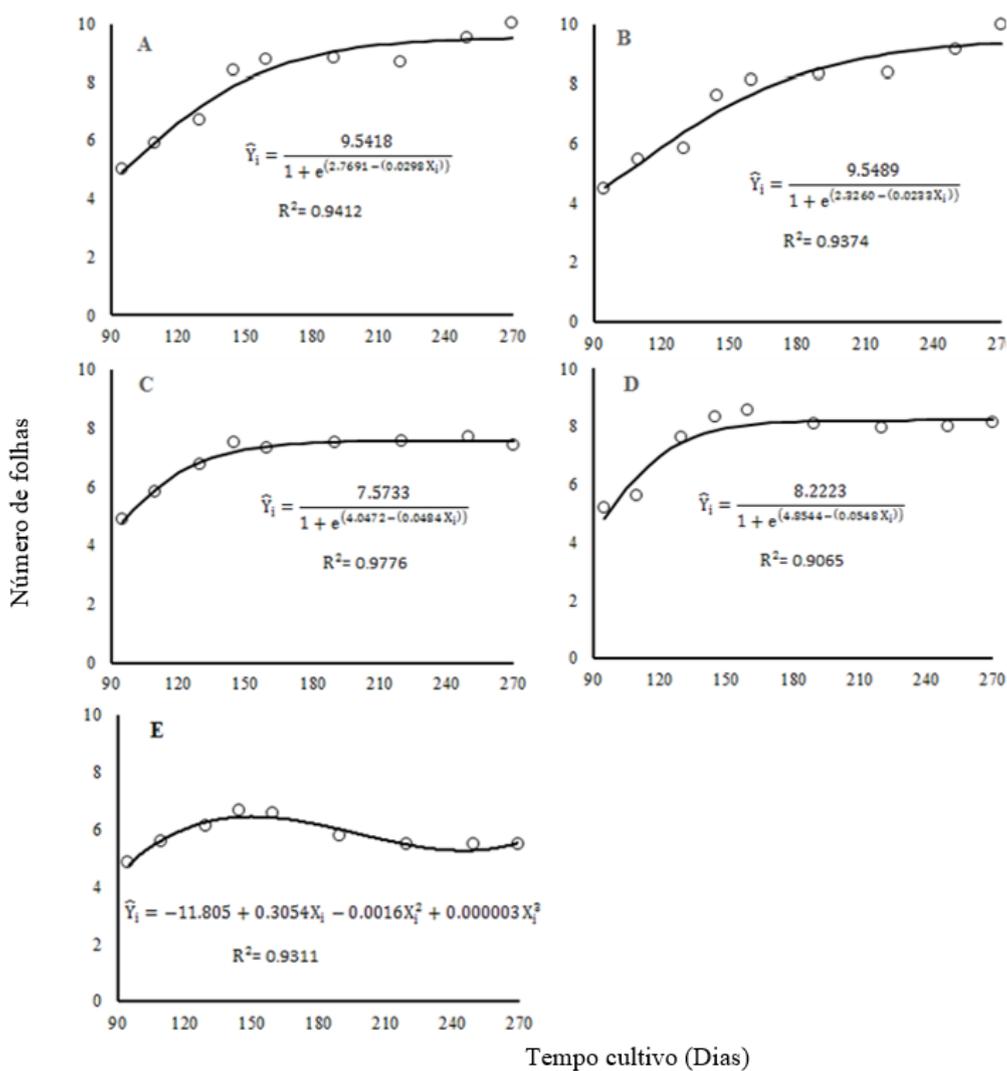


Figura 7: Produção foliar ao longo do tempo das plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas em diferentes concentrações de ferro.

Com relação aos parâmetros foliares avaliados, as plântulas cultivadas na maior concentração apresentam o menor comprimento (7,13 cm), largura (3,26 cm) e relação C/L (2,22 cm). Os maiores valores foram observados no tratamento 270  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 8). Ainda

que não haja diferença significativa entre as áreas foliares individuais totais ao se contabilizar o número de folhas e a área individual de cada uma delas, o tratamento controle ( $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) possui maior área disponível para assimilar radiação luminosa. A menor área total disponível para a luz foi do tratamento  $315 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

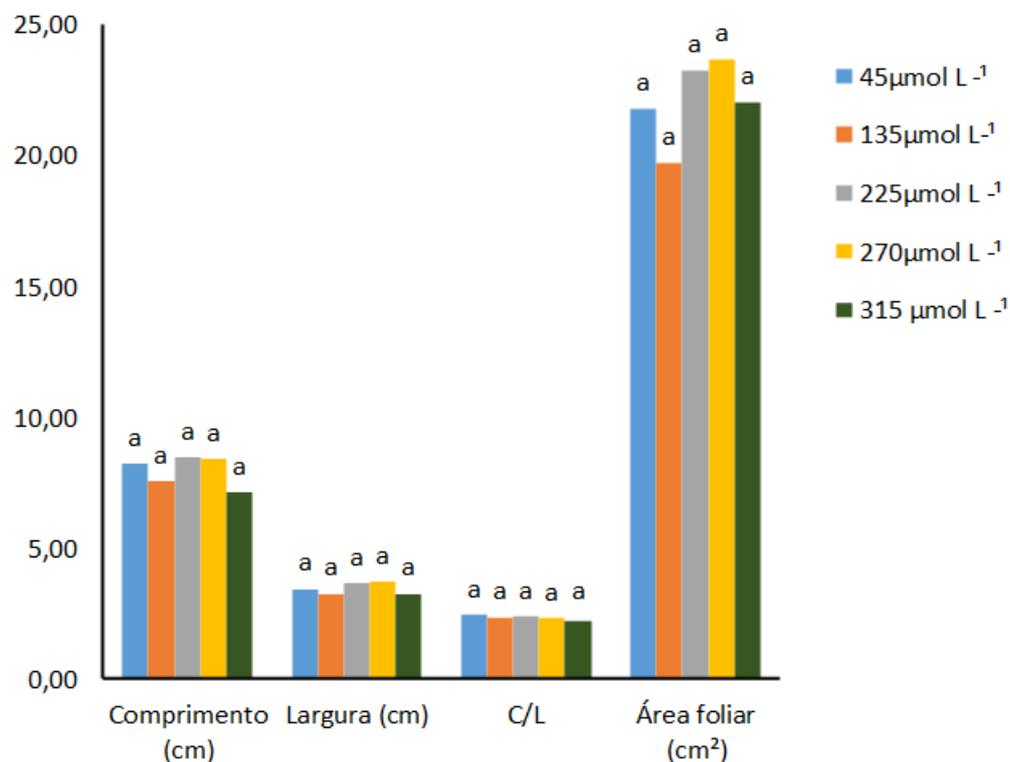


Figura 8: Parâmetros foliares das plântulas de *Rhizophora mangle* L. aos 270 dias de cultivo em diferentes concentrações de ferro. Médias seguidas pela letra a não diferem do controle ( $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

### 3.2 Fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas.

As plântulas de *R. mangle* quando submetidas aos tratamentos com ferro em cultivo *ex situ*, independentemente das concentrações utilizadas, mantiveram-se fotossinteticamente ativas, apresentando curvas OJIP com aumento polifásico característico (Figura 9A). Após 190 dias de cultivo com o Fe, foi observada a formação da banda K (estabelecida ao 0-2 ms), sendo mais expressivas (maior amplitude) nas amostras cultivadas em 270 e  $315 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Fe (Figura 9B).

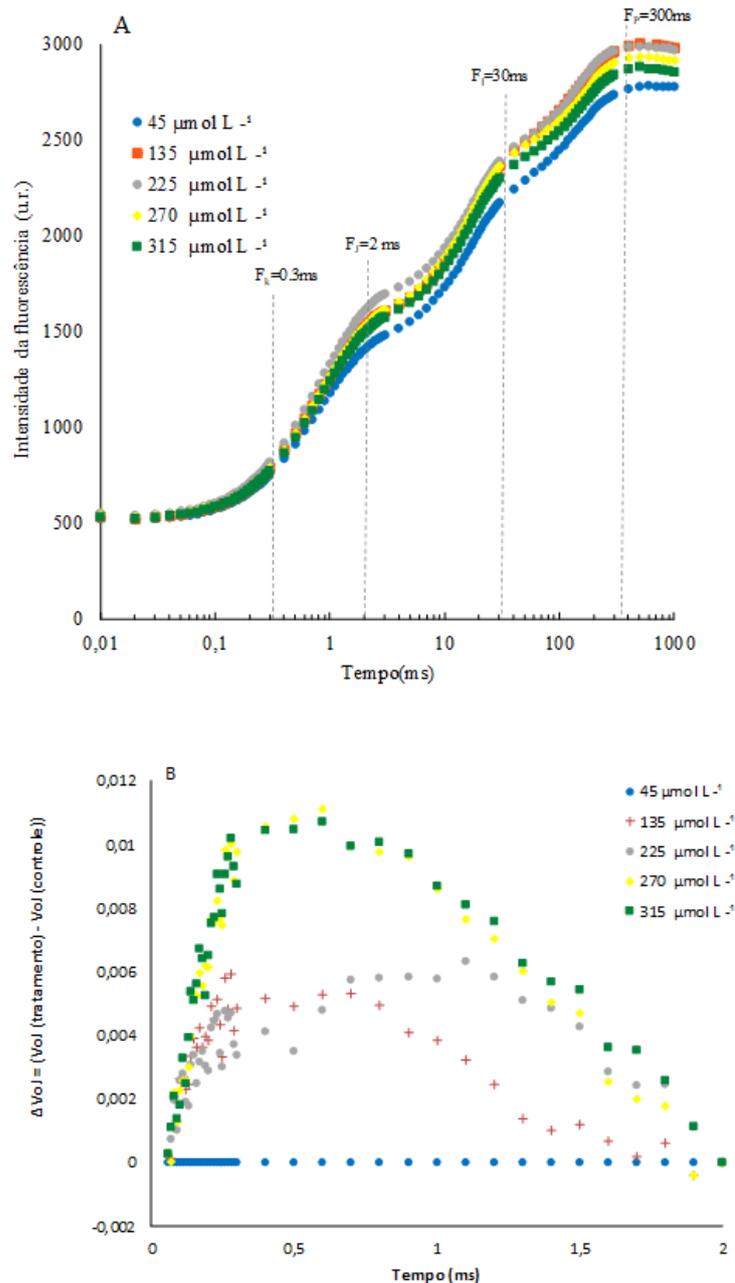


Figura 9: Fluorescência transitente da clorofila a *Rhizophora mangle L.* cultivada em diferentes concentrações de Ferro. A: curva polifásica de emissão da fluorescência da clorofila a; B: variação da banda K (0,2 ms) ou  $\Delta VOJ$  estabelecida entre 0 e 2 ms, a partir da dupla normalização  $\Delta VOJ = [VOJ(\text{controle}) - VOV(\text{tratamento})]$ , onde  $VOJ = (F_t - F_0) / (F_J - F_0)$ .

Os parâmetros de fluxo específico de energia extraídos do teste JIP evidenciaram que as plântulas cultivadas em solução contendo concentrações de 270 e 315  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ferro exibiram aumento na fluorescência máxima ( $F_m$ ) Fluorescência variável ( $F_v$ ). Em relação aos valores dos fluxos de energia específicos por centro de reação (RC), verificou-se uma diminuição da absorção (ABS/RC) para os indivíduos cultivados com 270  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Fe.

Entretanto, o aprisionamento e transporte de elétrons e dissipação de calor (TRo/RC, ETo/RC e, DIO /RC, respectivamente) por centro de reação não diferiram significativamente em função das doses de Fe (Figura 10), indicando que o Fe não interfere na transferência de elétrons entre os dois fotossistemas. Apesar de ser observado uma diminuição nos índices de desempenho PI (ABS) e PI (TOTAL) a partir da dose de 225  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Fe, não houve diferença significativa para tais parâmetros (Figura 10).

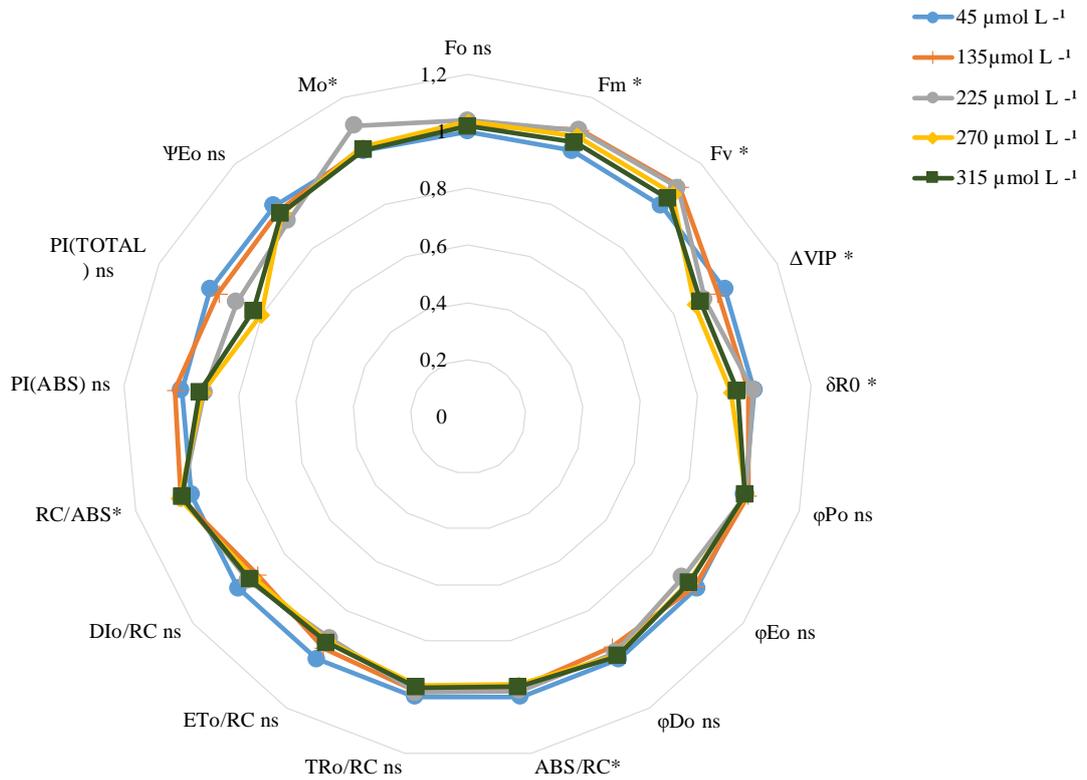


Figura 10: Parâmetros fotoquímicos derivados do teste JIP em plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas sob diferentes doses de ferro. Médias seguidas por (\*) são estatisticamente diferentes ao controle (45  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ferro) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. Todos os parâmetros do teste JIP foram normalizados com relação ao controle (45  $\mu\text{mol Fe} = 1$ ). ns= não significativo.

As análises referentes às trocas gasosas identificaram que o aumento da concentração de Fe nos cultivos provocou efeitos distintos sobre os parâmetros avaliados (Figura 11 A-D). É possível observar que até a concentração intermediária de 225  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Fe houve aumento na assimilação ( $A \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), entretanto, a partir deste tratamento o excesso do Fe acarretou em redução da  $A$  ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Resultado similar é observado para a eficiência instantânea de carboxilação ( $A/C_i \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e para condutância estomática ( $g_s \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Em contrapartida, o aumento da concentração do Fe não afetou a concentração interna de  $\text{CO}_2$ . O valor das concentrações máximas foi calculado para estimar o ponto em que o aumento do Fe na solução levou à redução dos parâmetros avaliados. Os valores de  $A \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $A/C_i$  e  $g_s \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foram respectivamente 148, 125 e 162,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Fe.

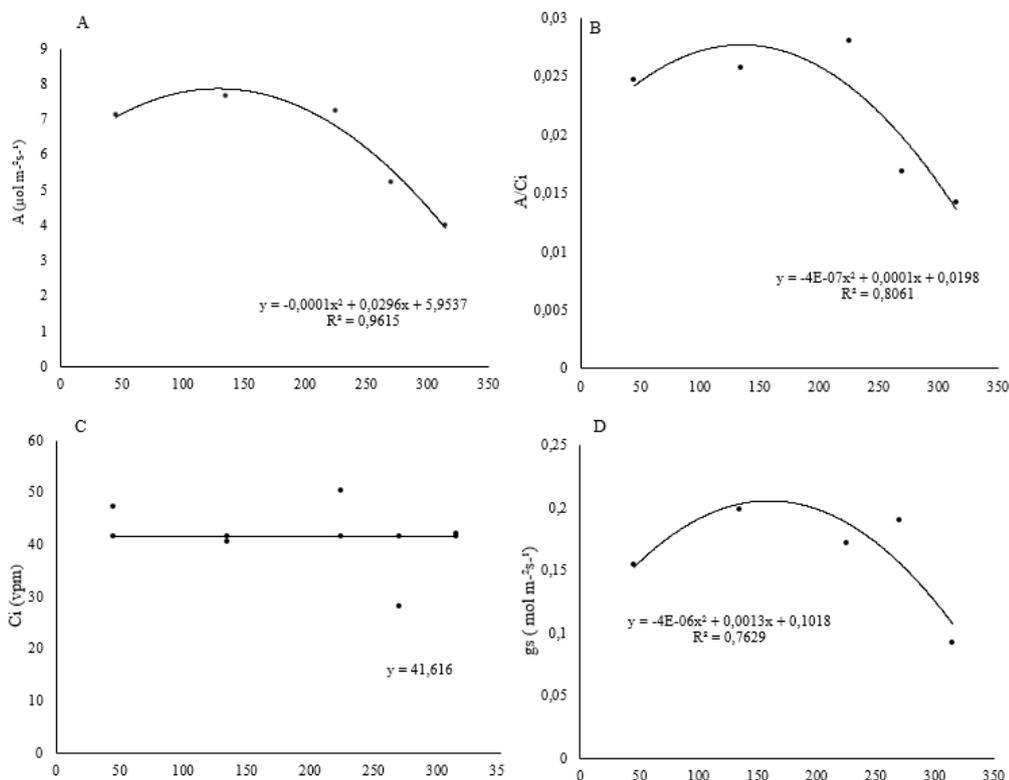


Figura 11 : Valores das trocas gasosas em plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas em diferentes doses de ferro (Fe). A: taxa de assimilação líquida de carbono B: eficiência instantânea de carboxilação C: concentração interna de CO<sub>2</sub>, D: Condutância estomática.

### 3.3 Concentração de Ferro

A concentração de Fe nos compartimentos aéreo e radicular foi medida ao final dos experimentos, após 270 dias de cultivo. Observou-se uma relação direta entre o acúmulo de metal na biomassa vegetal em decorrência do aumento da concentração de Fe na solução de cultivo (Figura 12). Para todos os tratamentos, as raízes apresentaram maior bioacumulação de Fe quando comparadas às concentrações na parte aérea da muda. Não houve diferença estatística entre o controle e os demais tratamentos considerando a parte aérea, mas foi observada diferença estatística para as raízes. O maior e o menor acúmulo de Fe foram observados no tratamento 270 μmol L<sup>-1</sup> e no controle (45 μmol L<sup>-1</sup>), respectivamente.

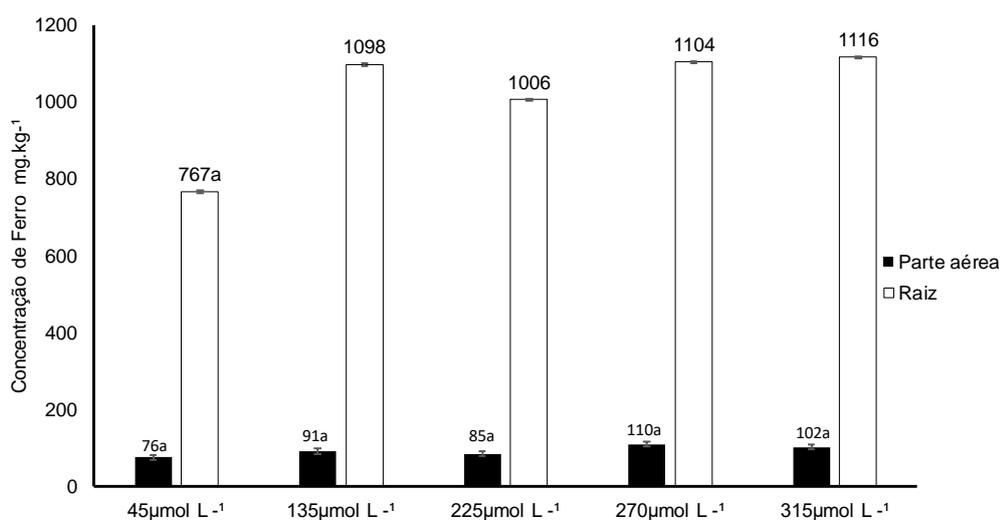


Figura 12: Concentração de ferro na parte aérea e na raiz em plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivada em solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950) em diferentes doses de ferro. Médias seguidas da letra a não diferem do controle (45 µmol L<sup>-1</sup> de ferro) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

## 4 Discussão

Após o início do cultivo foi observado rápido crescimento inicial das plântulas nos primeiros três meses. Esse padrão de crescimento foi semelhante ao encontrado por (BALL, 2002) em experimento *ex situ* e na avaliação de crescimento realizado por (LIMA et al., 2018) *in situ*. Os autores também observaram um declínio e/ou estabilização da taxa de crescimento conforme observado no presente trabalho, o que atesta como o desenvolvimento esperado para as plântulas de *R. mangle*.

O Fe é um micronutriente essencial para todas as plantas (ROUTH e SAHOO, 2015), incluindo as espécies de mangue. Este metal está diretamente envolvido na fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, síntese hormonal e manutenção do cloroplasto (HÄNSCH; MENDEL, 2009). Após 180 dias de exposição ao Fe, as plântulas não apresentaram diferença significativa da taxa de crescimento em relação ao controle. Resultados semelhantes foram observados em plântulas de diferentes espécies de *Rhizophora* cultivadas sob outros tipos de estresse, luminoso, nutricional e salino (DANGREMOND; FELLER; SOUSA, 2015; MCKEE, 1995). O comprimento do epicótilo também não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Esse resultado difere de (ALONGI, 2010), que avaliou o efeito do Fe em cinco espécies de plântulas de mangue. O autor observou que as espécies da família *Rhizophoraceae* tiveram o crescimento do epicótilo afetado apenas em doses muito elevadas do metal.

Embora a presença de Fe não tenha comprometido o crescimento inicial das plântulas de *R. mangle*, em altas concentrações deste metal ( $315 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) houve um decréscimo no número de folhas. Aspecto interessante e que demonstra ajuste das plântulas ao aumento de concentração, uma vez que houve queda das folhas imediatamente após a alteração das concentrações na solução de Hoagland; somente o controle continuou com aumento progressivo das folhas, como esperado para as condições de nutrientes da solução. As concentrações abaixo de  $315 \mu\text{mol L}^{-1}$  ao longo do tempo recuperaram o número anterior e permaneceram similares aos números de folha do tratamento controle ( $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), sugerindo um ajuste das plântulas as novas condições.

Em condições naturais, a produtividade das florestas de manguezal está controlada por interações entre gradientes reguladores, gradientes de recursos e hidroperíodo (TWILLEY; RIVERA-MONROY, 2009). No presente trabalho, o gradiente regulador salinidade foi mantido similar para todos os tratamentos, incluindo o controle, os recursos luminosidade e disponibilidade de água foram similares, somente sendo alterado após implantação do Fe com nutriente em concentrações distintas. O hidroperíodo foi mantido constante para todos os tratamentos, podendo ser interpretado como um estresse similar a todos os experimentos.

Dangremond et al. (2015) observaram que plântulas de *R. mangle* não reduziram o seu desenvolvimento com o aumento da salinidade. Este padrão também foi observado por (MCKEE, 1995) com plântulas submetidas ao estresse luminoso e nutricional, mostrando que a espécie possui grande resiliência. Ao comparar desenvolvimento de três espécies de mangue sob estresse salino, Bompy et al. (2014) observaram que *R. mangle* não teve redução significativa no número de folhas e na produção de biomassa quando comparada com *L. racemosa* e *A. germinans*. Segundo os autores esta resposta se deve à reserva energética que a espécie possui nos propágulos que faz com a mesma consiga investir no desenvolvimento inicial. Desta forma, nossos resultados podem ser explicados a luz do modelo proposto por Twilley e Riveira-Monroy (2005), onde os gradientes reguladores, como a salinidade, inicialmente incrementam a aquisição de biomassa e depois passam a ser dreno de energia contribuindo para seu decaimento, cujo ponto de virada vai depender das estratégias das espécies em relação ao sal (BALL, 1988). Por outro lado, o estresse causado pelo gradiente de recursos (nutrientes) apresenta-se de forma negativa sobre a produtividade em menores concentrações, passando gradativamente com seu incremento a manter a produtividade constante.

Considerando que o Fe no manguezal funciona como um tensor para o ambiente, da mesma forma que a salinidade, este estudo mostra que as plântulas de *R. mangle* possivelmente

podem responder de forma similar ao estresse de metal no meio como salientado pela estratégia adotada por esta espécie quando cultivada em concentrações excessivas de Fe. Por ser um elemento essencial, o aumento das concentrações de Fe inicialmente estimula o crescimento e desenvolvimento da plântula, porém, com o passar do tempo é possível observar que em concentrações intermediárias parece existir um ajuste em relação ao tensor e, posteriormente, adaptação e desenvolvimento. Os resultados de produção média de folhas similar para todos os tratamentos até o 145º dia reforçam a hipótese de ajuste para as concentrações mais elevadas de Fe, entretanto, os efeitos em longo prazo do acúmulo deste elemento pode ser percebido pelo declínio da assimilação do carbono e pelo aumento da concentração de Fe nas raízes das plântulas cultivadas na maior concentração de Fe ( $315 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Estes resultados sugerem que esta concentração pode ser o limiar da toxidez do ferro para a espécie haja vista que o incremento em biomassa e a produção foliar das plântulas cultivadas em  $315 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi afetada pelo metal.

Em contrapartida à menor resposta em termos de crescimento e desenvolvimento das plântulas frente a um estresse ambiental, os parâmetros fisiológicos são uma fonte importante de observação dos danos iniciais dos tensores sobre os indivíduos e colaboram com interpretações que podem posteriormente explicar o declínio de uma população ou comunidade perante um impacto pontual agudo ou em contaminações crônicas não letais. Esta análise permite avaliar o uso da água (transpiração) e as trocas gasosas nas plantas, indicando processos relacionados aos tensores naturais (salinidade, temperatura e luminosidade) ou o sinergismo destes com outros tensores, no caso a concentração do Fe. Os tensores naturais são minimizados, pois os tratamentos ocorreram sob condições similares, conforme já discutido. Portanto, devem apresentar baixa variabilidade entre os tratamentos, sendo as diferenças explicadas e interpretadas como resultado da perda de energia líquida das plântulas, uma vez que vão realizar ajustes nos seus processos de assimilação para compensar as concentrações mais acentuadas do Fe (GURRENVITCH, 2009).

A biologia molecular é uma fonte importante de observação dos dados iniciais dos tensores sobre os indivíduos e colaboram com interpretações que podem posteriormente explicar o declínio de uma população ou comunidade perante um impacto pontual agudo ou em contaminações crônicas não letais. Em relação a fluorescência da clorofila *a* o aumento da magnitude dos sinais de fluorescência desde um nível basal ( $F_0$ ) até um nível máximo ( $F_M$ ) com pontos intermediários J e I bem definidos indicam que as amostras estavam fotossinteticamente ativas em todos os tratamentos (MEHTA et al., 2010).

Apesar de se demonstrarem fotossinteticamente ativas, o ferro afetou o desempenho fotoquímico das plântulas de *R. mangle*, havendo a formação da banda-K para todos os tratamentos sendo mais acentuada nas maiores concentrações de ferro. De acordo com Oukarroum et al. (2009), a análise da banda-K é uma boa referência para caracterizar distúrbios fisiológicos em plantas. A banda-K aparece aproximadamente aos 0,3 ms (Figura 12B) e expressa a atividade de doação de elétrons do complexo de evolução do oxigênio (CEO) para o FSII, que, por sua vez, compete com a doação de elétrons que não são provenientes da água (POLLASTRINI et al., 2017). Uma banda-K positiva, como observada em todos os tratamentos, indica falta de integridade do CEO por instabilidade na evolução do oxigênio pelo complexo manganês ( $Mn_4CaO_5$ ) como doador de elétrons para o FSII (GURURANI et al., 2012). Valores positivos para a banda K podem indicar, ainda, um aumento no tamanho funcional da antena associada ao FSII (YUSUF et al., 2010) bem como danos entre o lado doador e acceptor do FSII, resultante do desbalanço entre o fluxo de elétrons do CEO para o centro de reação e lado acceptor do FSII em direção ao FSI (STRASSER, 1997; CHEN e CHENG, 2010). Expressão da banda K positiva foi observada em pesquisas relacionadas ao estresse causado por pesticidas (CHENG et al., 2014), efeito salino (YUSUF et al., 2010; LOPES et al., 2019).

Os parâmetros do teste JIP derivados dos transiente OJIP podem ser usados para caracterizar o comportamento/atividade do FSII, intersistema e FSI (STRASSER et al., 2004). A fluorescência inicial ( $F_0$ ) não apresentou aumento significativo, este resultado também foi obtido por Macfarlane (2003) em estudos com *A. marina* sob diferentes concentrações de zinco. Contudo foi observado diminuição da fluorescência máxima nos tratamentos 270 e 315  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Fe, a redução da fluorescência máxima pode indicar inibição no transporte de elétrons do lado doador do FSII resultando acúmulo da P680 e/ou diminuição do *pool* de quinona A (MEHTA et al., 2010). A redução da fluorescência máxima foi observada em espécies de mangue sob estresse salino (PASCOALINI, 2019) e metais traço (MACFARLANE, 2003).

Entre os parâmetros avaliados e que normalmente diminuem em resposta ao estresse causado por metais traço está o  $FV / FM$  ( $\phi P_0$ ) (DAI et al., 2016; HUANG et al., 2019). Normalmente, redução deste parâmetro induz aumentos na dissipação de energia ( $DI_0 / RC$  e  $\phi D_0$ ). Para este estudo, as plântulas de *R. mangle* mostraram certa estabilidade e funcionalidade do aparelho fotossintético, pois as plantas apresentaram valores de  $\phi P_0$  maiores que 0,74 e de  $\phi D_0$  menor que 0,27. Plantas consideradas livres de estresse fisiológico normalmente têm valores de  $\phi P_0$  entre 0,75 e 0,85 (BOLHAR-NORDENKAMPF et al., 1989).

A fase I-P (30ms – 200ms) refere-se aos eventos de transferência de elétrons associados ao FSI (SCHANSKER et al., 2003; REDILLAS et al., 2011). O excesso do Fe levou a redução  $\Delta VIP$  comparada com o controle. O  $\Delta VIP$  está relacionado com a transferência de elétrons do FSII, a partir da plastoquinona reduzida, até a redução dos aceptores finais do lado acceptor do FSI, isto é, ferredoxina, aceptores intermediários e NADP (YUSUF et al., 2010), sendo as maiores reduções observadas nos tratamentos 270 e 315  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Fe, declínio  $\Delta VIP$  foram observados em plantas sob estresse salino (YUSUF et al., 2010; LOPES et al., 2019).

Os indivíduos de *R. mangle* cultivados sob condições *ex situ* com excesso Fe não exibiram alterações do número de RCs para absorção (RC/ ABS), indicando a ausência de estresse na faixa das concentrações testadas. A pequena variação nos valores médios da  $E_{To}/RC$ ,  $\phi E_o$  e  $\Psi E_o$ , pode estar envolvida no papel do ferro na planta, pois é um elemento essencial na acepção de elétrons participando na cadeia de transporte de elétrons.

Apesar de não serem estatisticamente significativas pode-se observar redução nos índices de desempenho do FSII ( $PI_{(ABS)}$  e  $PI_{(TOTAL)}$ ), sobretudo nas concentrações 270 e 315  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Fe. A redução do  $PI_{(ABS)}$  está relacionada 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 e SANTOS Jr, 2005). Já o  $PI_{(TOTAL)}$ , 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 e sobrevivência em condições de estresse (YUSUF et al., 2010).

Espécies de mangue são reconhecidas por apresentarem comportamento conservativo da água perante ao estresse (BALL, 1988; BOMPY et al., 2014). A análise das trocas gasosas vem sendo aplicada principalmente em estudos relacionados ao estresse hídrico e salino cujo diagnóstico de dano é imediato (LOPES et al., 2019).

Neste estudo, o excesso de Fe levou a diminuição na taxa de assimilação líquida ( $A$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Esta resposta de redução da assimilação também foi observada em avaliações em campo para a mesma espécie quando se comparou situações de diferentes salinidades provocadas por gradiente salino ou por modificações na precipitação (LOPES et al., 2019; PASCOALINI et al., 2019). Adamski et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes onde o excesso de Fe levou a redução da  $A$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para os autores, esta redução está associada à diminuição da capacidade de redução do NADH e na síntese de ATP.

As plântulas apresentaram uma redução em  $g_s$  nas maiores concentrações de Fe. A redução da  $g_s$  é uma das principais restrições à fotossíntese em plantas, limitando o influxo de  $CO_2$  nas folhas (ERICKSON et al., 2004). Contudo, apesar da redução destes parâmetros, não houve variação expressiva no  $C_i$  (vmp). Para (ALVES et al., 2011) uma menor  $A$  não deve ser apenas associada com a menor entrada de  $CO_2$  nas folhas, mas com alguma limitação bioquímica na fixação de  $CO_2$  dentro dos cloroplastos. O aumento da  $A$   $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$  e a invariabilidade de  $C_i$  foram similares aos dados coletados em campo (RRDM, 2020).

O excesso do Fe acarretou a redução na eficiência instantânea de carboxilação ( $A/C_i$   $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ ), que representa o aproveitamento do  $C_i$  para produção de biomassa. Frequentemente, alterações na fotoquímica foliar e o metabolismo do carbono estão relacionados à menor atividade da Rubisco e mudanças na capacidade de regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato (HISCOX e ISRAELSTAM, 1979). A redução na atividade da Rubisco também foi relatada em plantas infestadas por patógenos (DEBONA et al., 2014; D'ADDAZIO et al., 2020).

A combinação da redução da  $A$  ( $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ ) e  $A/C_i$  ( $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ ) também foi observada por Soares et al. (2015) em árvores de *R. mangle* que se desenvolveram no extremo latitudinal de distribuição da espécie, sendo considerada pelos autores restrição fisiológica causada pela temperatura ambiental.

Conclui-se que processos de estresse, naturais ou não, vão provocar diminuição na eficiência da planta em utilizar a radiação luminosa para maximizar sua produção de biomassa. Estes tensores podem inclusive produzir perda de capacidade energética em sintetizar biomassa aérea para o processo de assimilação até de raízes, inviabilizando a aquisição de nutrientes. Dois fatores observados nos experimentos com maiores concentrações de ferro e que se corroboraram nas avaliações de curto prazo, isto é, imediatas como as trocas gasosas e as emissões de fluorescência da clorofila *a*.

A concentração de Fe nos tecidos vegetais acompanhou o aumento da disponibilidade do mesmo na solução de cultivo, onde as raízes acumularam 75% do metal quando comparado com a parte aérea. A principal fonte de absorção de metais traço pelas plantas é por meio das raízes, embora outros tecidos também possam contribuir para este processo. A maior concentração de elementos tóxicos nas raízes de *R. mangle* é relatada na literatura (SOUZA et al., 2014; ARRIVEBENE et al., 2016) para manguezais em áreas poluídas por efluentes domésticos, agrícolas e industriais. Nossos resultados corroboram com os de Machado et al (2005) que relatam o acúmulo preferencial de Fe e Zn nos tecidos das raízes de *R. mangle* suprimindo a translocação dos metais para as folhas.

*R. mangle* é considerada uma espécie sal excludente, ou seja, ela evita a entrada de quantidade considerável de sódio e cloro já em nível de raiz (PARIDA e JHA, 2010) pelo processo de ultrafiltração. Essa estratégia é apresentada por plantas menos tolerantes à salinidade (SOARES et al., 2015; PARIDA e JHA, 2010). Estudos avaliam se os mecanismos utilizados pelas espécies para a regulação do sal seriam os mesmos utilizados para os metais traço. MacFarlane et al. (2007) avaliaram os padrões de acumulação e translocação dos elementos cobre, chumbo e zinco nas raízes e folhas de diferentes espécies de mangue e observaram que nas espécies não secretoras de sal a translocação de metais para as folhas foi menor quando comparada com as secretoras; os autores supõem então que a via de regulação do transporte dos metais é bastante similar a via de regulação do sal. Resultado similar foi encontrado por Arrivabene et al. (2016). Estes resultados demonstram a estratégia da espécie em proteger o aparato fotossintético do máximo de danos, preservando a estrutura produtora de energia.

Os resultados deste estudo indicam que o Fe apesar de ser um elemento essencial para as plantas apresentou efeitos negativos sobre a assimilação de carbono, na produção de folhas e na bioacumulação nos órgãos das plantas, corroborando outros estudos realizados com elementos traço em manguezais (CHENG et al., 2012; HUANG et al., 2011; MACFARLANE et al., 2003; MACFARLANE e BURCHETT, 2002). Entretanto, quando comparados com outros metais, apresenta menor toxicidade em curto prazo, podendo em longo prazo comprometer áreas de manguezal com excesso deste elemento no sedimento. Este comprometimento pode ser agravado quando em situações de formação de sulfetos de ferro que podem alterar o pH do sedimento comprometendo a biota (TWILEY e RIVIERA-MONTORY, 2005).

## 5. Considerações finais

Apesar de ser um elemento essencial para as plantas, o Fe em altas concentrações mostrou efeitos tóxicos no desenvolvimento das plântulas de *R. mangle* levando a redução do número de folhas nas maiores concentrações deste estudo. Observa-se que o tempo de exposição ao Fe, bem como, sua concentração são fatores importantes para que as plântulas comecem a esboçar os efeitos causados morfológicamente. Inicialmente a produção foliar foi o parâmetro morfológico mais afetado pelo excesso deste metal. A análise integrada dos fatores ecológicos e fisiológicos são complementares sendo considerados bons indicadores para análise de toxicidade do Fe, sendo as maiores inibições observadas nas maiores concentrações. As plântulas cultivadas na maior concentração ( $315 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) apresentaram uma redução na produção foliar e em todos os parâmetros fisiológicos, com exceção da Ci (vpm). A espécie

mostrou uma grande resiliência em lidar com o metal acumulando a maior parte nas raízes, protegendo assim o aparato fotossintético.

Recomendamos ampliar o conhecimento sobre o papel do Fe em outras espécies de mangue, em concentrações mais elevadas e também avaliações em nível molecular que vão complementar muitas das informações obtidas neste estudo, dando suporte para as hipóteses levantadas.

## 6. Referências

ADAMSKI, J. M., PETERS, J. A., DANIELOSKI, R., BACARIN, M. A. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. **Journal of plant physiology**, 168(17), 2056-2062, 2011.

ALONGI, Daniel M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environmental conservation**, v. 29, n. 3, p. 331-349, 2002.

ALONGI, D. M., CLOUGH, B. F., ROBERTSON, A. I. Nutrient-use efficiency in arid-zone forests of the mangroves *Rhizophora stylosa* and *Avicennia marina*. **Aquatic botany**, v. 82, n. 2, p. 121-131, 2005.

ALONGI, D. M. Dissolved iron supply limits early growth of estuarine mangroves. **Ecology**, v. 91, n. 11, p. 3229-3241, 2010.

ALVES AA, GUIMARÃES LMS, CHAVES ARM, DAMATTA FM, ALFENAS AC . Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. **Acta Physiologiae Plantarum** 33(5):1831-1839, 2011.

APPENROTH, Klaus-J. Definition of “heavy metals” and their role in biological systems. In: **Soil heavy metals**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 19-29, 2010.

ARRIVABENE, H. P., CAMPOS, C. Q., DA COSTA SOUZA, I., WUNDERLIN, D. A., MILANEZ, C. R. D., MACHADO, S. R. Differential bioaccumulation and translocation patterns in three mangrove plants experimentally exposed to iron. Consequences for environmental sensing. **Environmental Pollution**, 215, 302-313, 2016.

AYRES, M., AYRES Jr, M., AYRES, D. L., SANTOS, A. A. S. Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: IDSM.364p, 2007.

BALL, M. C. Ecophysiology of mangroves. **Trees**, v. 2, n. 3, p. 129-142, 1988.

BALL, M. C. Interactive effects of salinity and irradiance on growth: implications for mangrove forest structure along salinity gradients. **Trees**, v. 16, n. 2-3, p. 126-139, 2002.

BECANA, M.; MORAN, J. F.; ITURBE-ORMAETXE, I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**, v. 201, n. 1, p. 137-147, 1998.

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 and soil** 380, 399-413.

BRIAT, J., LOBRÉAUX, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in plant science**, v. 2, n. 5, p. 187-193, 1997.

BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R., LONG, S. P., BAKER, N. R., OQUIST, G., SCHREIBER, U. L. E. G., & LECHNER, E. G. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. **Functional Ecology**, 497-514, 1989.

CARDWELL, R. D., DEFOREST, D. K., BRIX, K. V., ADAMS, W. J. DO cd, cu, Ni, Pb, and Zn biomagnify in aquatic ecosystems?. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 226*, pp. 101-122, 2013.

COIMBRA, A. G. et al. Distribuição de metais pesados em moluscos e sedimentos nos manguezais de coroa grande e da enseada das garças, Baía de Sepetiba, RJ. 2003.

CHEN, L. S.; CHENG, L. The acceptor side of photosystem II is damaged more severely than the donor side of photosystem II in 'honeycrisp' apple leaves with zonal chlorosis. **Acta Physiologia Plant**, v. 32, p. 253-261. 2010.

CHENG, H., CHEN, D. T., TAM, N. F. Y., CHEN, G. Z., LI, S. Y., YE, Z. H. Interactions among Fe<sup>2+</sup>, S<sup>2-</sup>, and Zn<sup>2+</sup> tolerance, root anatomy, and radial oxygen loss in mangrove plants. *Journal of Experimental Botany*, 63(7), 2619-2630, 2012.

CHEN, S., STRASSER, R. J. QIANG, S.. In vivo assessment of effect of phytotoxin tenuazonic acid on PSII reaction centers. **Plant physiology and biochemistry**, v. 84, p. 10-21, 2014.

CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**. v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.

DANGREMOND, E.M., FELLER, I.C., SOUSA, W.P. Environmental tolerances of rare and common mangroves along light and salinity gradients. **Oecologia** 179, 1187-1198, 2015.

DAI, H., XU, Y., ZHAO, L., & SHAN, C. Alleviation of copper toxicity on chloroplast antioxidant capacity and photosystem II photochemistry of wheat by hydrogen sulfide. **Brazilian Journal of Botany**, 39, 787-793, 2016.

D'ADDAZIO V, SILVA JVG, JARDIM AS, LONGUE LL, SANTOS RAA, FERNANDES AA, SILVA MB, SILVA DM, SANTOS TA, SCHMILDT ER, PFENNING LH, FALQUETO AR. Silicon improves the photosynthetic performance of black pepper plants inoculated with *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. *Photosynthetica* 58(3):692-701. doi: 10.32615/ps.2019.182, 2020.

DEBONA, D., RODRIGUES, F. Á., RIOS, J. A., MARTINS, S. C. V., PEREIRA, L. F., & DAMATTA, F. M. Limitations to photosynthesis in leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, 104(1), 34-39, 2014.

ERICKSON, J. E.; STANOSZ, G. R.; KRUGER, E. L. Photosynthetic consequences of Marssonina leaf spot differ between two poplar hybrids. **New Phytologist**, v. 161, n. 2, p. 577-583, 2004.

FAGERIA, N. K., BALIGAR, V. C., WRIGHT, R. J. Nutrição de ferro das plantas: química e fisiologia da sua deficiência e toxicidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 553-570, 1990.

FALQUETO, A. R., SILVA, D., FONTES, R. V. Photosynthetic performance of mangroves *Rhizophora mangle* and *Laguncularia racemosa* under field conditions. **Revista Árvore**, v. 32, n. 3, p. 577-582, 2008.

GONÇALVES, J.F.C., SANTOS JÚNIOR, U. M. Utilization of the chlorophyll a fluorescence technique as a tool for selecting tolerant species to environments of high irradiance. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 3, p. 307-313, 2005.

GURURANI, M. A. UPADHYAYA, C. P. STRASSER, R. J. WOONG, Y. J. PARK, S. W. Physiological and biochemical responses of transgenic potato plants with altered expression of PSII manganese stabilizing protein. **Plant physiology and biochemistry**, 58, 182-194. 2012.

GUREVITCH, J. SCHEINER, S. M.. FOX, G. A. **Ecologia Vegetal** Artmed Editora, 2009.

HÄNSCH, R. MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 3, p. 259-266, 2009.

HELL, R. STEPHAN, U. W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, v. 216, n. 4, p. 541-551, 2003.

HISCOX JD, ISRAELSTAM GF . A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany* 57 (12):1332-1334, 1979. <https://doi.org/10.1139/b79-163>

HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultural experiment station*, 347(2nd edit), 1950.

HOWELER, Reinhardt H. Iron-induced orange disease of rice in relation to physico-chemical changes in a flooded oxisol. **Soil Science Society of America Journal**, v. 37, n. 6, p. 898-903, 1973.

HUANG, X. H., ZHU, F., YAN, W. D., CHEN, X. Y., WANG, G. J., & WANG, R. J. Effects of Pb and Zn toxicity on chlorophyll fluorescence and biomass production of *Koeleria paniculata* and *Zizania glaberrima* young plants. **Photosynthetica**, 57, 688-697, 2019.

KIM, S. A., GUERINOT, M.L. Mining iron: iron uptake and transport in plants. **FEBS letters**, v. 581, n. 12, p. 2273-2280, 2007.

JIMENEZ, J. A., LUGO, A. E., CINTRON, G. Tree mortality in mangrove forests. **Biotropica**, p. 177-185, 1985.

LARCHER, W. *Ecofisiologia Vegetal* (São Carlos: Rima). **Artes e textos**, 2000.

LIMA, K.O.O., TOGNELLA, M.M.P., CUNHA, S.R. ANDRADE, H.A. Growth models of *Rhizophora mangle* L. seedlings in tropical southwestern Atlantic. **Estuar. Coast. Shelf Sci.** 207, 154-163, 2018.

LOPES, D. M. S., TOGNELLA, M. M. P., FALQUETO, A. R., & SOARES, M. L. G. Salinity variation effects on photosynthetic responses of the mangrove species *Rhizophora mangle* L. growing in natural habitats. **PHOTOSYNTHETICA**, 57(4), 1142-1155, 2019.

LOVELOCK, C. E., BALL, M. C., FELLER, I. C., ENGELBRECHT, B. M., LINGE, M. Variation in hydraulic conductivity of mangroves: influence of species, salinity, and nitrogen and phosphorus availability. *Physiologia Plantarum*, 127(3), 457-464, 2006.

MACFARLANE, G.R.; PULKOWNIK, A.; BURCHETT, M.D. Accumulation and distribution of heavy metals in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh.: biological indication potential. **Environmental Pollution**, v. 123, p. 139–151, 2003.

MALAVOLTA, E. VITTI, G. C. OLIVEIRA, S. A. de. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 1997.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London. Second ed. 889p 1995.

MCKEE, Karen L. Interspecific variation in growth, biomass partitioning, and defensive characteristics of neotropical mangrove seedlings: response to light and nutrient availability. **American Journal of Botany**, v. 82, n. 3, p. 299-307, 1995.

MCKEE, K. L. Growth and physiological responses of neotropical mangrove seedlings to root zone hypoxia. **Tree physiology**, v. 16, n. 11-12, p. 883-889, 1996.

MEJÍAS, C.L., MUSA, J. S; OTERO, J. Exploratory evaluation of retranslocation and bioconcentration of heavy metals in three species of Mangrove at Las Cucharillas Marsh, Puerto Rico. **Journal of Tropical Life Science**, v. 3, n. 1, p. 14-22, 2013.

MEHTA, P., JAJOO, A., MATHUR, S., BHARTI, S. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. **Plant Physiology and biochemistry**, 48(1), 16-20, 2010.

NAIDOO G., TUFFERS A.V., VON WILLERT D.J.: 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, 2002

NICA, D. V., BURA, M., GERGEN, I., HARMANESCU, M., BORDEAN, D. M. Bioaccumulative and conchological assessment of heavy metal transfer in a soil-plant-snail food chain. **Chemistry Central Journal**, 6(1), 55, 2012.

OUKARROUM, A.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R. J. 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. **Physiologia Plantarum**, v. 137, p. 188-199. 2009.

PARIDA, A.K., JHA, B. Salt tolerance mechanisms in mangroves: a review. **Trees**, v. 24, n. 2, p. 199-217, 2010.

PASCOALINI, S. S. **Absorção de carbono em um manguezal no sudeste do brasil: perspectiva de análise dos serviços ecossistêmicos** Tese de doutorado. Universidade Federal do Espírito Santo, 2019.

PASCOALINI, S., TOGNELLA, M., FALQUETO, A., SOARES, M. Photosynthetic efficiency of young *Rhizophora mangle* L. in a mangrove in southeastern Brazil. *PHOTOSYNTHETICA*, 60(3), 337-349. 2022.

POLLASTRINI, M.; NOGALES, A. G., BENAVIDES, R., BONAL, D., FINER, L., FOTELLI, M.; GESSLER, A., GROSSIORD, C., RADOGLU, K., STRASSER, R. J., BUSSOTTI, F. Tree diversity affects chlorophyll a fluorescence and other leaf traits of tree species in a boreal forest. **Tree Physiology**, v. 00, p. 1–10. 2017.

RAVEN, Peter H. et al. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 2014.

Rede Rio Doce Mar (RRDM). Relatório anual PMBA/Fest-RRDM -Ambiente Costeiro RT-36C, Programa de monitoramento da biodiversidade aquática , Espírito Santo Technology Foundation. 422 page. 2020.

REDILLAS, M. C., STRASSER, R. J., JEONG, J. S., KIM, Y. S., & KIM, J. K. The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing OsNAC10. **Plant Biotechnology Reports**, 5(2), 169-175,2011.

ROUT, G. R.; SAHOO, S. Role of iron in plant growth and metabolism. **Reviews in Agricultural Science**, v. 3, p. 1-24, 2015.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRON, G. Guia para estudo de áreas de manguezal, estrutura, função e flora. São Paulo: **Caribbean Ecological Research**,1986.

SCHANSKER, G., TÓTH, S. Z., STRASSER, R. J. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1706, n. 3, p. 250-261, 2005.

SOARES, M. L.G, PEREIRA TOGNELLA, M. M., CUEVAS, E., MEDINA, E. Photosynthetic capacity and intrinsic water-use efficiency of *Rhizophora mangle* at its southernmost western Atlantic range. **Photosynthetica**, 53(3), 464-470, 2015.

SOUZA, C. I., MOROZESK, M., DUARTE, I. D., BONOMO, M. M., ROCHA, L. D., FURLAN, L. M., WUNDERLIN, D. A. Matching pollution with adaptive changes in mangrove

plants by multivariate statistics. A case study, *Rhizophora mangle* from four neotropical mangroves in Brazil. **Chemosphere**, 108, 115-124, 2014.

STRASSER, B. J. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. **Photosynthesis Research**, v. 52, n. 2, p. 147-155, 1997.

STRASSER, R. J., SRIVASTAVA, A., TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. **Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation**, p. 445-483, 2000.

STRASSER, R.J., TSIMILLI-MICHAEL, M., SRIVASTAVA, A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: **Chlorophyll a fluorescence**. Springer, Dordrecht. p. 321-362, 2004.

TWILLEY R. R, RIVERA-MONROY V. H Developing performance measures of mangrove wetlands using simulation models of hydrology, nutrient biogeochemistry, and community dynamics. *Journal of Coastal Research* pp. 79-93. 2005.

TWILLEY, R. R.; RIVERA-MONROY, V. H. Ecogeomorphic models of nutrient biogeochemistry for mangrove wetlands. **Coastal wetlands: an integrated ecosystem approach**. Elsevier, Amsterdam, v. 641, 2009.

TOMLINSON, P. B. *The Botany of Mangroves* Cambridge University Press London. 1986.

VAHL, L. C. **Iron toxicity in rice genotypes irrigated by flooding**. Tese de Doutorado. Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

WU, H., YIN, J. J., WAMER, W. G., ZENG, M., & LO, Y. M. Reactive oxygen species-related activities of nano-iron metal and nano-iron oxides. **Journal of Food and Drug Analysis**, 22(1), 86-94, 2014.

YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N. B. 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**, v. 1797, p. 1428-1438. 2010.

## CAPÍTULO 2:

### Efeito do alumínio no crescimento inicial e fisiologia de plântulas de *Rhizophora mangle* L.

#### Resumo

Diversos estudos apontam que o ecossistema manguezal atua como um sumidouro de metais traço na zona costeira, contudo a tolerância da vegetação de mangue ao alumínio (Al) ainda é pouco estudada. Este estudo avaliou o desenvolvimento e a resposta fisiológica de plântulas de *Rhizophora mangle* L. ao excesso de Al. Para avaliar o efeito do Al as plântulas previamente estabelecidas, foram transferidas para meio de cultivo contendo 0 (controle); 190; 370; 1100 e 2220  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al. Após 190 dias de cultivo não houve diferença significativa nos parâmetros de crescimento. O excesso de alumínio levou a redução da produção foliar no tratamento de maior concentração (2220  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), além disto, houve uma redução significativa na biomassa radicular das plântulas cultivadas em 1100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Ao avaliar as respostas fisiológicas observou-se que o alumínio levou a redução na taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $\text{A mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e aumento na concentração de carbono interno ( $\text{Ci vpm}$ ) analisando os parâmetros referentes a florescência da clorofila *a* é possível indicar que o Al causa danos ao aparato fotoquímico mesmo nas menores concentrações. A incorporação de Al na biomassa foi maior nas raízes quando comparada com a parte aérea. A análise integrada dos parâmetros morfológicos e fisiológicos são complementares mostrando o efeito do Al no desenvolvimento inicial nas plântulas de *R. mangle*. Em conclusão este estudo fornece informações sobre as respostas e as estratégias das plântulas de *R. mangle* expostas ao Al.

#### 1. Introdução

Os manguezais estão entre os ecossistemas mais produtivos do planeta (ALONGI, 2009), desempenhando um papel importante nas áreas costeiras tropicais e subtropicais do mundo (RIVERA-MONROY et al., 1995). Apesar de possuírem uma baixa diversidade de

espécies vegetais, as florestas de mangue são a principal fonte de produtividade primária nas áreas em que ocorrem e possuem relevância econômica na produção de bens e serviços (HOGARTH, 2013).

As espécies de mangue possuem uma série de atributos estruturais e funcionais que promovem sua sobrevivência e desenvolvimento na zona entremarés, dentre elas: raízes aéreas, embriões vivíparos, dispersão de propágulos pela maré, rápidas taxas de produção de dossel, uso eficiente de nutrientes e mecanismos de tolerância ao sal mantendo o balanço de água e de carbono (DUKE et al., 1998; ALONGI, 2002).

Apesar da sua grande importância ecológica e econômica, grande parte das florestas de mangue tem sido perdida nas últimas décadas motivada pelo aquecimento global, aquicultura, desenvolvimento urbano e industrial (ALONGI, 2002; DUKE et al., 2006; SPALDING et al., 2010; GIRI et al., 2011). A degradação dos habitats do manguezal resulta em perda de funcionalidade ecológica comprometendo diversos recursos e na redução de fonte de renda de comunidades tradicionais (DUKE et al., 2007; FELLER et al., 2010).

As propriedades físico-químicas dos sedimentos dos manguezais facilitam a adsorção de poluentes orgânicos (KRUITWAGEN et al., 2008), bem como favorecem a acumulação de metais traço (QIU et al., 2011), sendo assim, o sedimento dos manguezais é considerado como tampão entre fontes de poluentes metálicos e os ecossistemas marinhos adjacentes (SAENGER e MCCONCHIE, 1991; MARCHAND et al., 2006)

Os metais traço estão entre os principais poluentes de origem antrópica que atingem manguezais (MACFARLANE et al., 2007), e sua toxicidade é considerada uma séria ameaça ao ecossistema (WU et al., 2014). Geralmente, a poluição dos manguezais com metais traço está associada às seguintes causas: efluentes industriais, agroindústrias, escoamento agrícola, estações de tratamento de esgoto, lixiviação doméstica, depósitos de lixo, urbanização, derramamento de produtos químicos e óleo (BONDIN et al., 2013)

O alumínio (Al) é um metal que constitui 7% da crosta terrestre, com participação na estrutura de vários minerais primários (LYNDSAY, 1979). Em solos ácidos, o Al é solubilizado em formas tóxicas, como  $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ , geralmente referido como  $Al^{3+}$  (DARKÓ et al., 2004).

O Al pode ser relativamente abundante nos solos do manguezal (NAIDOO e RAIMAN, 1982) e as condições ácidas dos sedimentos podem resultar na mobilização do alumínio para níveis tóxicos. Em termos nutricionais, em geral, o excesso do Al fixa o fósforo em formas menos disponíveis nos solos e interfere na captação, no transporte e no uso de nutrientes essenciais. Também diminui as trocas gasosas das raízes com o sedimento. Em nível

celular inibe a divisão celular das raízes, principal e lateral, provoca aumento da rigidez da parede celular por acréscimo de depósitos de pectinas, reduz a replicação do DNA e compromete a atividade enzimática (FOY, 1974; 1992).

O dano induzido por concentrações consideradas como tóxicas de metais traço nas plantas pode ter diferentes efeitos que atuam em sinergismo ou não, causando danos diretos ou indiretos por meio de indução do estresse oxidativo (VIEHWEGER, 2014). Os efeitos danosos incluem diminuição da concentração de clorofila (resultante da redução da biossíntese ou aumento da degradação), alteração do equilíbrio hídrico, diminuição da atividade de várias enzimas, fechamento estomático, desaceleração da taxa de fotossíntese e redução da absorção de nutrientes minerais essenciais (NAGAJYOTI et al., 2010).

Os efeitos do estresse (biótico ou abiótico) sobre espécimes vegetais podem ser medidos de duas maneiras: diretamente por medições nas taxas fotossintéticas ou indiretamente por avaliação dos parâmetros de crescimento (TAIZ, 2017).

No que se refere as técnicas empregadas para avaliar diretamente as consequências dos estresses em organismos vegetais pode-se citar a fluorescência transiente da clorofila *a*. Essa ferramenta, não destrutiva, garante coleta de dados relativamente rápida, o que permite entender as interferências sobre as reações fotoquímicas, ou seja, aquelas dependentes da luz (PAPAGEORGIOU e GOVINDJEE, 2011; KALAJI et al., 2016) para produção primária. Por meio da análise da curva de fluorescência transiente da clorofila *a* (OJIP) é possível avaliar o estado dos componentes do fotossistema II (FSII), bem como a cadeia transportadora de elétrons, permitindo inferir sobre a condição fisiológica dos indivíduos (KALAJI et al., 2016). As análises das reações que ocorrem nas membranas dos tilacóides são possíveis graças a modelos matemáticos confiáveis (teste JIP), desenvolvidos por Strasser et al. (2004), possibilitando a compreensão em detalhes da condição e função do sistema antena, dos centros de reações e dos aceptores e doadores do FSII. A eficiência no uso da água vem sendo aplicada principalmente em estudos relacionados ao estresse hídrico e salino cujo diagnóstico de dano também é imediato (PASCOALINI et al., 2022).

*Rhizophora mangle* L. pertence à família *Rhizophoraceae* e possui distribuição pantropical (TOMLINSON, 1986), sendo a espécie dominante nos manguezais brasileiros (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 1990). Este domínio se deve a sua tolerância para diferentes condições de salinidade e temperatura (SOARES et al., 2015), entre outras adaptações, como por exemplo, viviparidade (FARNSWORTH, 2000), flutuabilidade e longevidade dos propágulos (RABINOVITZ, 1978). Estes caracteres permitem sua dispersão, estabelecimento e crescimento nesse ecossistema.

Diversos pesquisadores realizaram estudos empregando cultivo de propágulos, comparando as respostas fisiológicas e morfológicas com fatores abióticos como salinidade (BALL et al., 1984; BALL, 2002; TAFFOUO et al., 2009; BOMPY et al., 2014;), alagamento (YE et al., 2003), luminosidade (KRAUSS e ALLEN, 2003) e metais (ALONGI, 2010; CHENG et al., 2012; ARRIVABENNE et al., 2016).

A avaliação integrada das respostas morfológicas e fisiológicas dos indivíduos em fase de plântula é essencial para a manutenção do ecossistema tendo em vista que a fase de plântula é considerada a mais vulnerável no ciclo de vida das plantas no manguezal (JIMÉNEZ, 1985). Sendo esta etapa na qual o indivíduo está mais suscetível aos tensores naturais e externos, estes podem induzir rapidamente o consumo das reservas dos cotilédones antes do indivíduo ser fotossinteticamente apto (MCKEE, 1995; RAVEN et al., 2014). As respostas induzidas pelo contaminante poderão ser usadas para subsidiar a gestão costeira em áreas degradadas e o uso de *R. mangle* em áreas em processo de recuperação.

Diante do exposto este estudo tem como objetivo averiguar o papel do Al no crescimento, desenvolvimento e fisiologia em plântulas de *Rhizophora mangle* cultivadas *ex situ*. Tendo como hipótese que o aumento da concentração deste metal irá afetar em diferentes intensidades a capacidade fotoquímica das plântulas o que acarretará na redução do crescimento e desenvolvimento das plântulas de *R. mangle*.

## 2. Metodologia

As etapas descritas abaixo ocorrem posteriormente aquelas descritas na metodologia geral desta tese.

### 2.1 Implementação dos tratamentos com Alumínio

Para avaliar a toxicidade do Al o desenvolvimento e na fisiologia das plântulas de *R. mangle*, (aquelas previamente estabelecidas no período de adaptação), estas foram aleatorizadas de acordo com os tratamentos definidos por diferentes concentrações de Al: foram selecionadas 140 plântulas subdivididas em 5 tratamentos com 7 réplicas (Figura 1). Foram adicionados à solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) diferentes concentrações de Al na forma de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), resultando os seguintes tratamentos: (1) - controle ( $0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); (2) -  $190 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (3) -  $370 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (4) -  $1100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , e (5) -  $2220 \mu\text{mol L}^{-1}$ .



Figura 1: Plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas em solução de Hoagland e Arnon (1950) distribuídas nos tratamentos com Al aos 95 dias de cultivo.

### 2.2 Dados morfológicos

Para avaliar o desenvolvimento das plântulas de *R. mangle* ao longo do experimento. O comprimento do epicótilo foi medido quinzenalmente com auxílio do paquímetro digital (King Tools  $\pm 0,01\text{mm}$ ) e número de folhas foi obtido por contagem manual, processo descrito no capítulo anterior. A partir dos valores do crescimento do epicótilo foi calculada a taxa de crescimento (TC) pela fórmula:  $\text{TC} = \Delta\text{C}/\Delta\text{T}$ , onde  $\Delta\text{C}$  corresponde à variação da altura (em cm) e  $\Delta\text{T}$  (tempo em dias) refere-se ao intervalo entre as observações.

Após 270 dias de cultivo as plântulas foram levadas ao laboratório de Ecologia de Manguezal CEUNES/UFES onde foram subdivididas em compartimentos (folhas, epicótilo, hipocótilo e raiz) para serem pesadas em balança de precisão. O comprimento do epicótilo (cm) e hipocótilo (cm) foram medidos com auxílio de uma trena calibrada. A área foliar (cm<sup>2</sup>) foi obtida com auxílio do escâner portátil (ADC modelo AM350). As amostras dos compartimentos foram secas em estufa a 60° durante 72 horas até atingir o peso constante sendo então pesadas e os resultados obtidos foram utilizados para cálculo da aquisição de biomassa (g) e da taxa de crescimento relativo. A taxa de crescimento relativo (TCR), diferentemente da TC, leva em consideração o peso dos indivíduos, sendo balizada como:  $TCR = [(\ln Ps1 - \ln Ps2) / (Ti - Tf)]$ ; onde Ps1 e Ps2 correspondem, respectivamente, ao peso seco em gramas do indivíduo no início e ao final do experimento, isto é, em Ti e Tf (MCKEE, 1995). O peso seco inicial (Ps1) empregado foi obtido pela equação obtida com base nos 217 propágulos que não foram utilizados no experimento. Estes 217 propágulos remanescentes foram encaminhados ao laboratório de análises agronômicas Fullin para a determinação dos macros e micronutrientes.

### 2.3 Fluorescência transiente da clorofila *a*

A fluorescência transiente da clorofila *a* foi medida ao final do experimento. As medidas foram feitas em 14 plantas por tratamento sempre no segundo par foliar totalmente expandido. As folhas foram previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos utilizando clips foliares (Hanstech) para a oxidação completa do sistema fotossintético. Os transientes foram induzidos com 1s de iluminação por um pulso de luz saturante com intensidade máxima de 3000  $\mu\text{mol}$  (fótons)  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  em uma área foliar de 4 mm de diâmetro utilizando-se um fluorômetro portátil (Handy PEA, Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK). A emissão de fluorescência transiente foi, então, registrada de 10 ms a 1 s com 120 pontos de fluorescência. A partir da curva de fluorescência transiente OJIP, o teste JIP foi avaliado com base na Teoria de Fluxo de Energia em Biomembranas (STRASSER e STRASSER, 1995; STRASSER et al., 2004) considerando-se os parâmetros citados no apêndice 2.

### 2.4 Assimilação de Carbono

A taxa de assimilação líquida de carbono ( $A$   $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e a concentração de CO<sub>2</sub> intercelular ( $C_i$  vpm) foram obtidas utilizando o sistema portátil ADC, modelo LCi (ADC, BioScientific Ltd. Hoddesdon, England), o IRGA (Infra Red Gases Assimilation). Para esta análise, as leituras foram realizadas durante o período da manhã (entre 8 horas e 10 h e 30 min). As medições foram realizadas para cada tratamento em cinco indivíduos em seis folhas do segundo par foliar completamente expandidas.

## 2.5 Análise estatística

Todos os dados biológicos obtidos neste capítulo foram analisados no período de exposição ao contaminante (i.e.,  $T_i = 95$  a  $T_f = 270$  dias). As avaliações temporais (dias) de comprimento do epicótilo (cm) foram realizadas empregando-se a técnica de regressão, para estimar a forma de crescimento entre os experimentos. As taxas de crescimento (TC) e de crescimento relativo (TCR), bem como a incorporação de biomassa (B), os parâmetros morfológicos das folhas, parâmetros derivados do teste JIP e trocas gasosas, após o teste de normalidade e de homocedasticidade, foram submetidas a análise de variância ANOVA One-Way seguida pelo teste de Dunnett com significância de 5%. Os testes estatísticos foram aplicados utilizando os softwares GENES (CRUZ., 2016) e BioEstat5.3 (AYRES et al., 2007).

## 3 Resultados

### 3.1 Parâmetros morfológicos

O valor médio dos propágulos provenientes da foz do rio Itaúnas ( $N = 497$ ) apresentaram comprimento médio de  $25,10 \pm 4,66$  cm e peso médio de  $16,41 \pm 6,49$  g. Os indivíduos utilizados para este experimento ( $N = 180$ ) tiveram comprimento médio  $25,7 \pm 4,2$  cm peso fresco  $16,9 \pm 4,2$  g. O peso seco inicial médio dos propágulos ( $N = 217$ ) foi  $5,8 \pm 3$  g. O cultivo iniciou-se na fase de propágulo e após sete dias registrou-se a emissão de raízes para todos os indivíduos. Cerca de 27 dias após a implantação do experimento, o epicótilo começou a se desenvolver e no momento da troca de solução (80 dias) o comprimento do epicótilo foi similar para todas as plântulas. No 80º dia, o Al foi adicionado à solução de Hoagland e Arnon. A partir deste momento houve aumento no comprimento do epicótilo das plântulas que foram cultivadas em  $370 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Al. Os demais tratamentos mantiveram o crescimento estável estando próximos ao controle ( $0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Al) (Figura 2A).

O crescimento total do epicótilo foi avaliado ao final do experimento sendo o menor (i.e., 7,16 cm) e maior (i.e., 8,56 cm) comprimento do epicótilo observados para os tratamentos com concentrações de 370 e 1100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al respectivamente (Figura 2B).

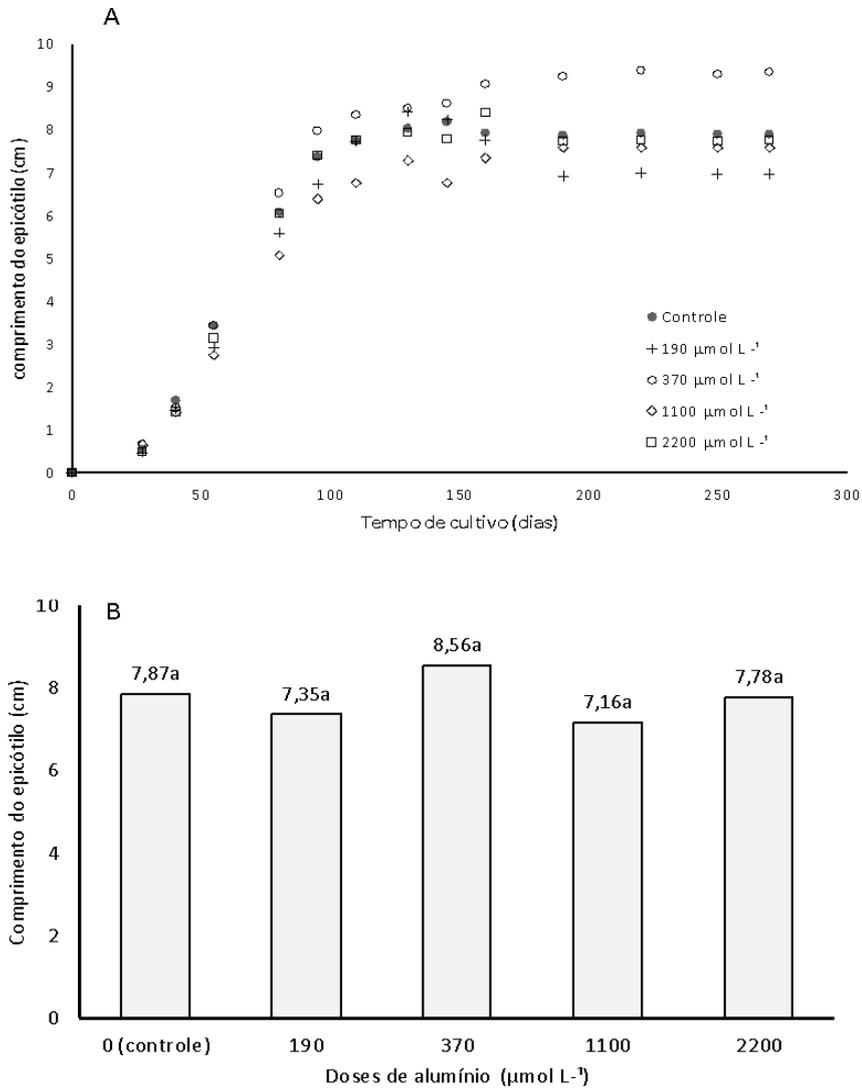


Figura 2: Comprimento (cm) do epicótilo das plântulas de *Rhizophora mangle L.* cultivadas em solução de Hoagland e Arnon (1950). A: Comprimento (cm) do epicótilo ao longo do experimento nos diferentes tratamentos. B: Comprimento médio (cm) do epicótilo ao final do experimento nas diferentes concentrações de Al (médias das avaliações entre os 95 e 270 dias de cultivo). Médias seguidas pela letra a não diferem em relação ao controle pelo teste de Dunet a 5 % de probabilidade.

As taxas de crescimento (TC) variaram entre 0,16 a 0,30( $\text{mm.d}^{-1}$ ) correspondendo aos tratamentos 190 e 1100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente (Figura 3A). Para taxa de crescimento relativo (TCR), a menor (0,05) e a maior (0,008) taxa foi observada, respectivamente, nos

tratamentos 2200 e 1100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al (Figura 3B). Ambas as taxas não apresentaram diferença estatística com relação ao controle.

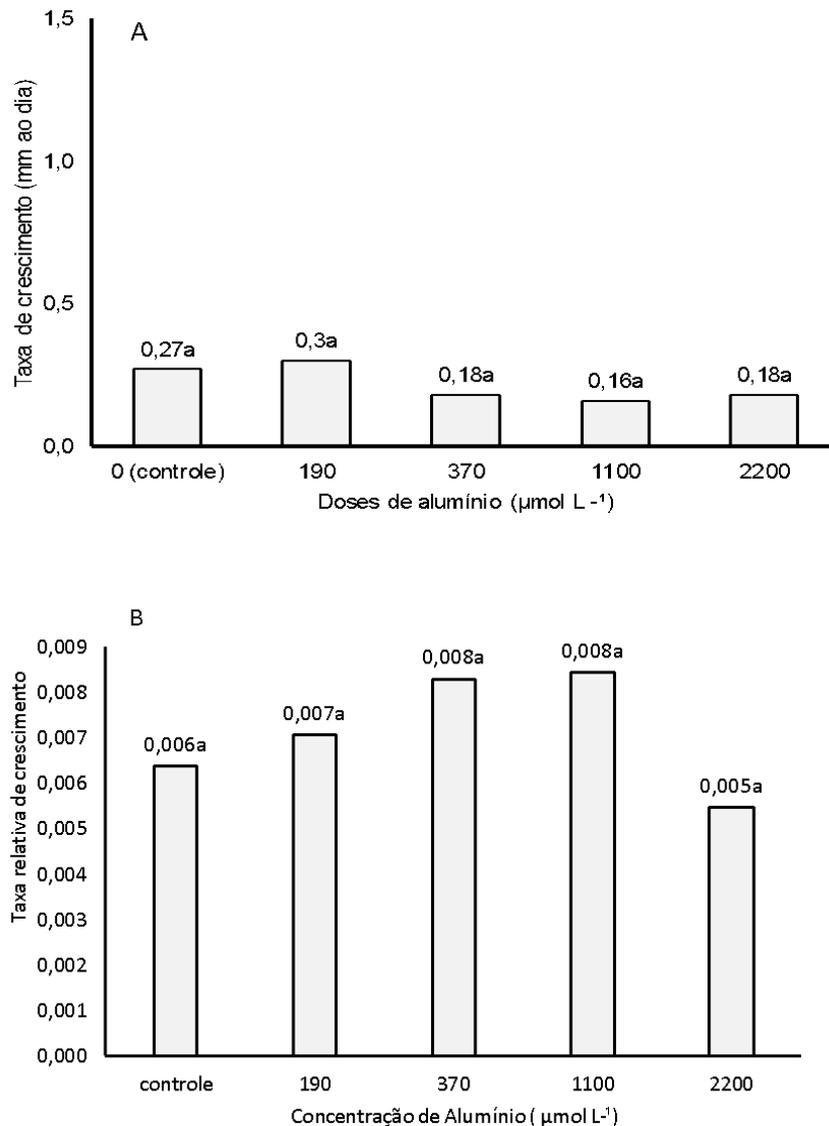


Figura 3: Taxas de crescimento das plântulas de *Rhizophora mangle L.* cultivados em solução de Hoagland e Arnon (1950). A: Avaliação comparativa das taxas de crescimento entre as concentrações de alumínio aos 270 dias; B: Avaliação comparativa da taxa de crescimento relativo entre as concentrações de Al aos 270 dias de cultivo. Médias seguidas da letra a não diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Após 190 dias de exposição ao metal, observou-se uma redução significativa na biomassa da raiz nas plântulas que se desenvolveram em 1100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al. Para os indivíduos cultivados na solução contendo 2200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al houve redução significativa da biomassa foliar (Figura 4).

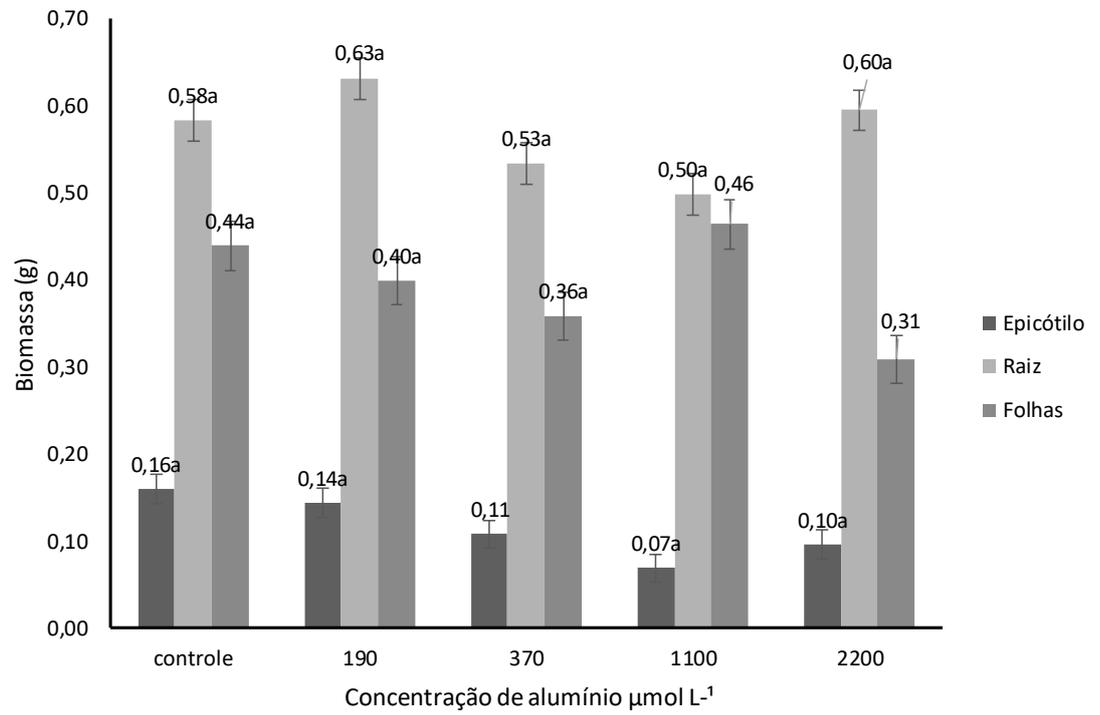


Figura 4: Efeito do alumínio sob o incremento em biomassa (g) das plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas na solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950). Médias seguidas da letra a não diferem do controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

A emissão das folhas iniciou-se após o vigésimo dia de cultivo em todos os tratamentos. No momento de adição do Al à solução nutritiva (i.e., aos 80 dias), as plântulas tinham em média 4 folhas. Diferenças na emissão foliar foram observadas a partir dos 110 dias de cultivo, ou seja, 30 dias após a inserção do Al. As plântulas cultivadas sob 2200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al apresentaram redução no número de folhas (Figura 5).

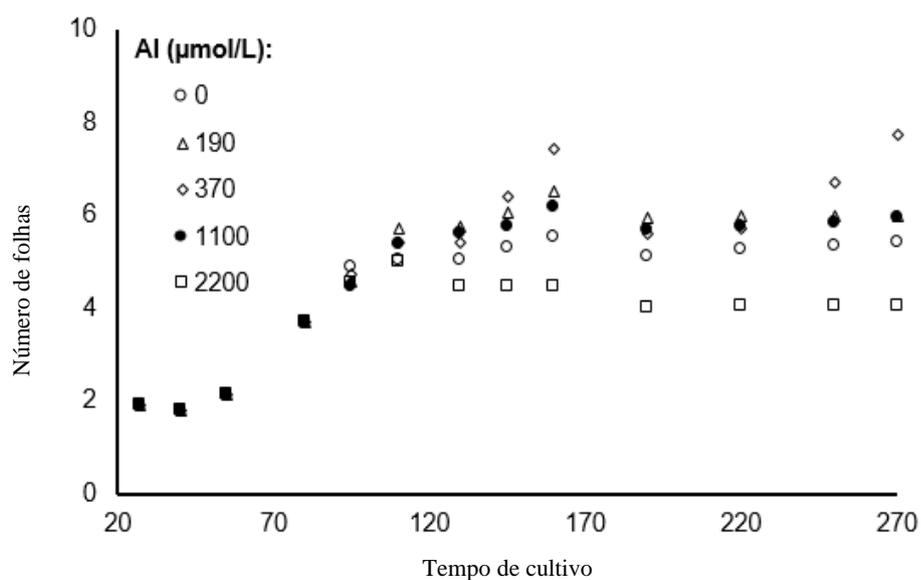


Figura 5: Produção foliar média das plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas em solução de Hoagland e Arnon (1950) em diferentes concentrações de alumínio ao longo de 270 dias.

Com relação aos parâmetros foliares avaliados, as plântulas cultivadas no tratamento com  $1100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Al apresentaram o menor comprimento (9,29 cm), largura (3,6 cm) e área foliar ( $23,9 \text{ cm}^2$ ) (Figura 6).

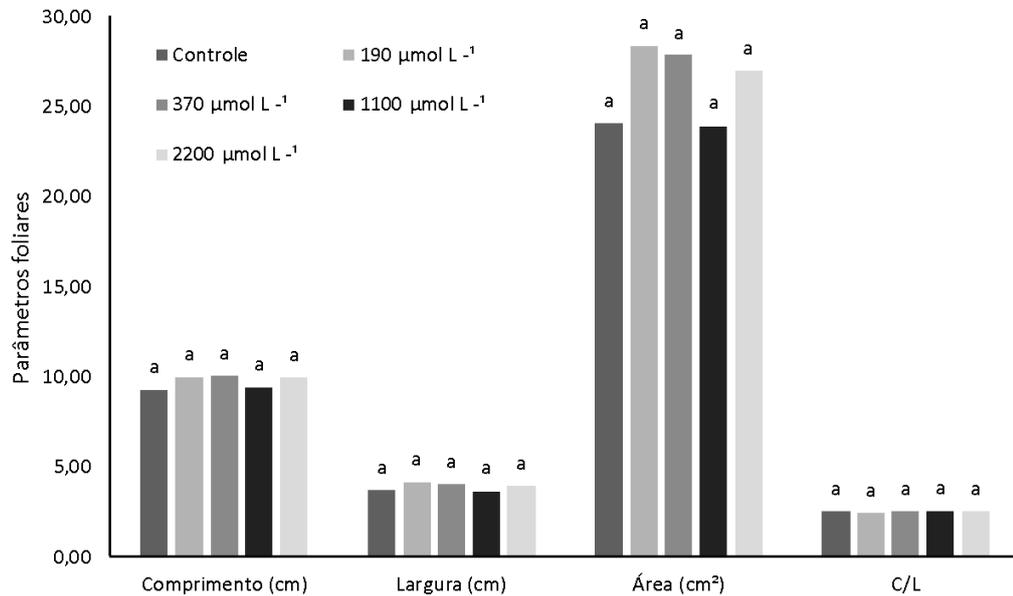


Figura 6: Parâmetros foliares das plântulas de *Rhizophora mangle* L. aos 270 dias de cultivo em diferentes concentrações de alumínio. Médias seguidas pela letra a não diferem do controle pelo teste de Dunett a 5% de probabilidade.

### 3.2 Fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas

As plântulas de *R. mangle* submetidas aos tratamentos com Al em cultivo *ex situ*, independente das concentrações utilizadas, mantiveram-se fotossinteticamente ativas, visto que apresentaram curvas OJIP com aumento polifásico característico (Figura 7A). Após 190 dias de cultivo com Al foi observada a formação da banda K (estabelecida entre 0-2 ms), sendo mais expressiva (maior amplitude) nas amostras cultivadas em  $190$  e  $370 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 7B).

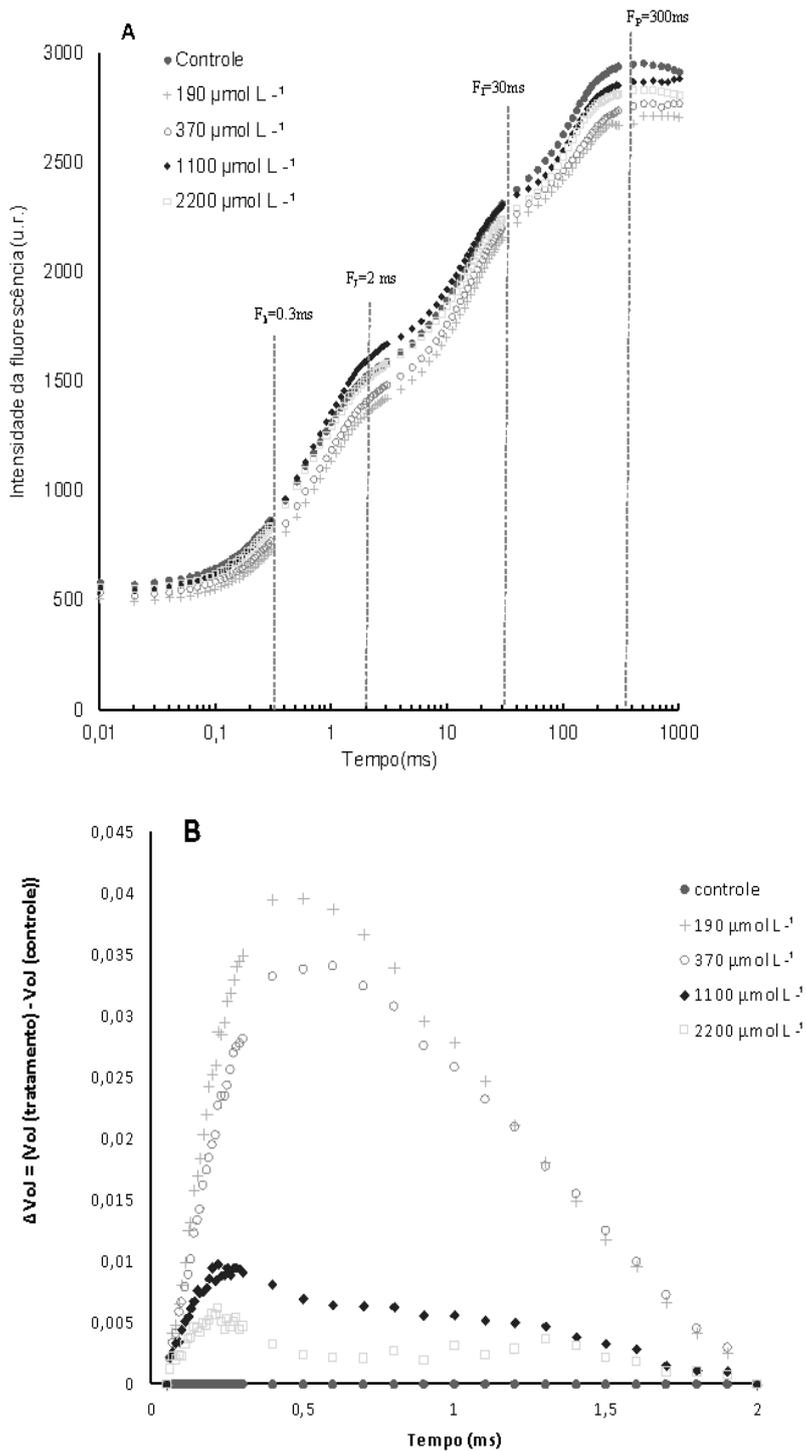


Figura 7:Fluorescência transiente da clorofila a das plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivada em diferentes concentrações de alumínio. A: curva polifásica de emissão da fluorescência da clorofila a; B: variação da banda K (0,3 ms) ou  $\Delta\text{VOJ}$  estabelecida entre 0 e 2 ms, a partir da dupla normalização  $\Delta\text{VOJ} = [\text{VOJ}(\text{controle}) - \text{VOJ}(\text{tratamento})]$ , onde  $\text{VOJ} = (F_t - F_0) / (F_j - F_0)$ .

Os parâmetros do fluxo específico de energia, extraídos do teste JIP, mostram que as plântulas cultivadas em solução contendo Al apresentaram redução na fluorescência inicial ( $F_o$ ) e aumento na fluorescência máxima ( $F_m$ ) nos tratamentos 190; 390; 1100 e 2200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al. Em relação aos fluxos de energia específicos por centro de reação (RC), verificou-se diminuição da absorção (ABS/RC) para os indivíduos cultivados em 190 e 370  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Foram observadas reduções no aprisionamento e no transporte de elétrons, assim como na dissipação de energia (TRo/RC ETo/RC e, DIO /RC) por centro de reação. Entretanto, estes parâmetros não diferiram significativamente em função das concentrações de Al. As plântulas cultivadas com 190  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al exibiram aumento nos índices de performance PI (ABS) e PI (total). Já para os tratamentos 1100 e 2200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al houve redução destes parâmetros (Figura 8).

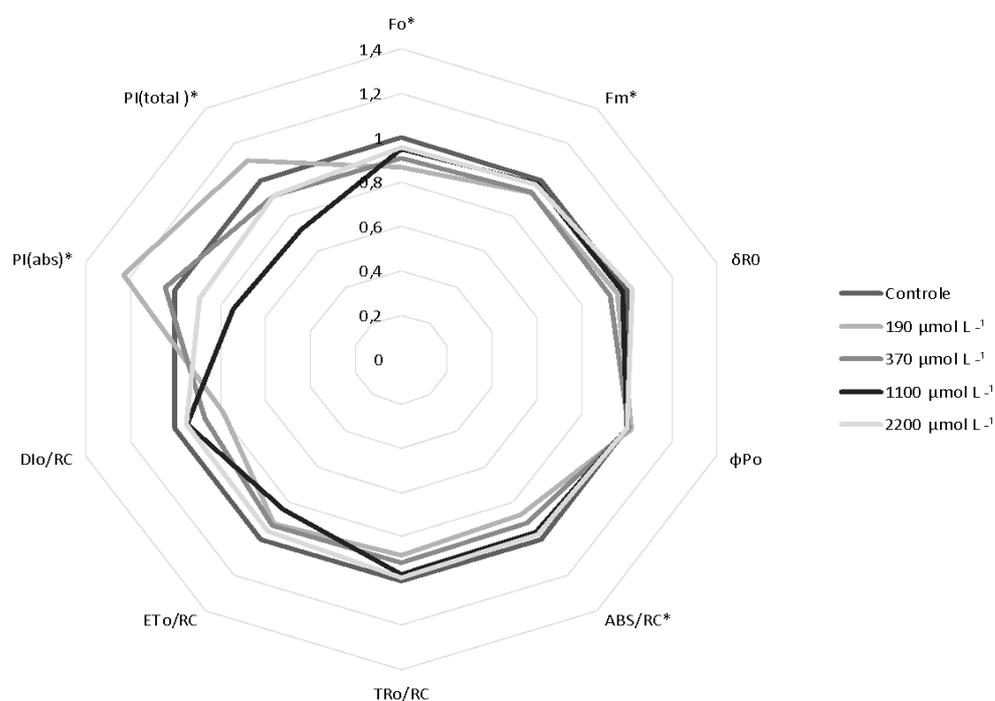


Figura 8: Parâmetros fotoquímicos derivados do teste JIP em plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas sob diferentes concentrações de alumínio. Médias seguidas por (\*) são estatisticamente diferentes ao controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. Todos os parâmetros do teste JIP foram normalizados com relação ao controle (0  $\mu\text{mol Al}=1$ ).

Considerando os parâmetros de trocas gasosas avaliados, o controle apresentou maior taxa de assimilação líquida de carbono ( $A \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e menor concentração de carbono interno ( $C_i \text{ vpm}$ ). O aumento da concentração de Al reduziu a  $A$  ( $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e aumentou de  $C_i$  (vpm), contudo, não houve diferença significativa na eficiência instantânea de carboxilação ( $A/C_i \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros fotoquímicos das plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas em diferentes doses de alumínio após 270 dias de cultivo em solução de Hoagland e Arnon (1950).

Al $\mu\text{mol L}^{-1}$	Parâmetros fotoquímicos		
	A ( $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Ci (vpm)	A/Ci ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	11,46 $\pm$ 0,9a	269 $\pm$ 6,4a	0,042 $\pm$ 0,003a
190 $\mu\text{mol L}^{-1}$	7,2 $\pm$ 0,8	263,28 $\pm$ 6,4a	0,031 $\pm$ 0,003a
370 $\mu\text{mol L}^{-1}$	3,26 $\pm$ 1,2	299,85 $\pm$ 7,2	0,00832 $\pm$ 0,002a
1100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	6,66 $\pm$ 1,16	296,85 $\pm$ 8,8	0,019 $\pm$ 0,003a
2200 $\mu\text{mol L}^{-1}$	9,555 $\pm$ 0,7a	279 $\pm$ 3a	0,0367 $\pm$ 0,001a

Médias seguidas da letra a não diferem do controle pelo teste de Dunett a 5% de probabilidade.

### 3.3 Análise nutricional

A contração média inicial de Al foi calculada a partir dos propágulos não utilizados no experimento. O valor médio obtido foi de 3,18  $\pm$  1,5 não apresentando diferença estatística com a concentração do tratamento controle.

A incorporação de Al nos compartimentos aéreo e de raiz das plântulas de *R. mangle* foi maior no tratamento 2200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al. Nas concentrações 190  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al a concentração do metal foi similar entre os compartimentos, no entanto, a partir de 370  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Al ocorreu maior acúmulo nas raízes (Figura 9).

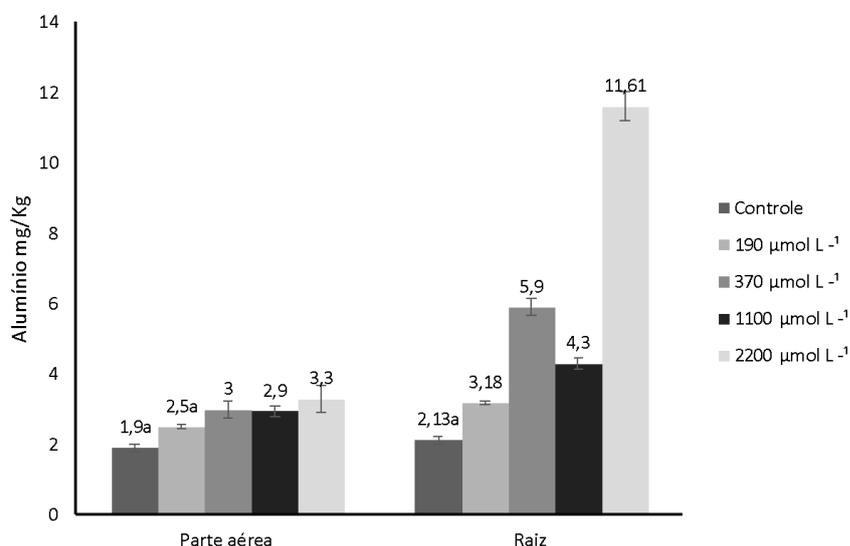


Figura 9: Concentração de alumínio nas partes área e de raiz, após 270 dias, em plântulas de *Rhizophora mangle* L. cultivadas em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com diferentes concentrações de alumínio. Médias seguidas da letra a não diferem significativamente ao controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

## 4. Discussão

Após início do desenvolvimento do epicótilo foi observada crescimento acentuado do epicótilo em todos os tratamentos, que se estabilizou após 180 dias de cultivo, este padrão é reportado para espécies de mangue em experimentos *in situ* (BARCELOS, 2017; LIMA et al., 2018) e *ex situ* (BALL, 2002; AMORIM, 2014; BARCELOS, 2017). Os propágulos de *R. mangle* possuem grande quantidade de reserva energética fornecida pelos cotilédones, desta forma, a redução da taxa de crescimento após o período de implantação é decorrente do consumo destas reservas nutritivas (SMITH e SNEDAKER, 2000).

Em todos os tratamentos, as plântulas não apresentaram diferença significativa em relação ao comprimento do epicótilo e, também, no que diz respeito as taxas de crescimento final e relativo durante a exposição ao Al. Estudos mostram que *R. mangle* é uma espécie que possui adaptações morfológicas e fisiológicas que permitem que a espécie colonize e se estabeleça sob influência de fatores limitantes tais como luminosidade (BALL, 1980; DUKE E ALLEN, 2006), salinidade (BOMPY et al., 2014), herbivoria (SOUZA e SAMPAIO, 2011) dentre outros. Embora o Al não seja considerado elemento essencial para espécies vegetais, em baixas concentrações ele pode estimular o crescimento de algumas plantas. Salvador et al. (2000) relataram que, em solução nutritiva, o Al em pequenas concentrações induziu o crescimento da goiabeira. Foy (1974) também menciona que, em solução nutritiva, baixas concentrações de Al (0,25 a 0,30 mg L<sup>-1</sup>) estimularam o crescimento de milho. Estudos avaliando as respostas morfológicas em plântulas de *R. mangle* cultivadas *ex situ* sob estresse luminoso, nutricional e salino não observaram reduções significativas da taxa de crescimento e na incorporação de biomassa (MCKEE, 1995; BOMPY et al., 2014). Alongi (2010) avaliou o efeito do excesso do Fe em sete espécies de mangue dentre elas *R. apiculata*; a espécie foi capaz de manter o crescimento do epicótilo nas concentrações baixas e intermediárias do metal, apresentando queda acentuada apenas na concentração mais alta.

Com relação a alocação da biomassa, houve redução significativa da biomassa radicular das plântulas cultivadas em 1100 µmol L<sup>-1</sup> e um aumento, embora não significativo, na maior concentração de Al; estes dados contratantes podem ser explicados pelo tipo de raiz desenvolvido pela planta. As raízes presentes nos tratamentos acima de 370 µmol L<sup>-1</sup> de Al eram primárias usadas para sustentação (Apêndice 3). Um dos primeiros sintomas de toxidez do Al é observado nas raízes, haja vista que o metal inibe a expansão e alongação das células neste órgão e, depois, a divisão celular também passa a ser inibida (KOCHIAN, 1995; MATSUMOTO, 2000).

Apesar de não exibir grandes mudanças morfológicas, o excesso do Al afetou o desempenho fotoquímico das plântulas de *R. mangle*. Neste estudo houve a formação da banda K positiva para todos os tratamentos. A banda K positiva indica falta de integridade do complexo de evolução do oxigênio (CEO), inviabilizando a doação de elétrons, via oxigênio do complexo manganês ( $Mn_4CaO_5$ ) para o FSII (GURURANI et al., 2012).

Os parâmetros do teste JIP, derivados dos transientes OJIP, podem ser usados para caracterizar o comportamento e a atividade do FSII, do intersistema e FS I (STRASSER et al., 2004). Esses parâmetros são considerados eficazes para localizar diferentes sítios de ação, bem como para identificar a heterogeneidade do FSII (APPENROTH et al., 2001; KALAJI et al., 2016). Houve redução da fluorescência inicial ( $F_o$ ) e da fluorescência máxima ( $F_m$ ). A fluorescência inicial ( $F_o$ ) representa a emissão de luz pelas moléculas de clorofila *a* excitadas antes da energia ser dissipada para o centro de reação do FSII (KRAUSE e WEIS, 1991). A redução da  $F_o$  também foi observada em plântulas de *R. mangle* situadas em áreas com salinidade elevada por Falqueto (2002).

A redução da  $F_m$  pode indicar inibição no transporte de elétrons do lado doador do FSII resultando em acúmulo de P680 e/ou diminuição do *pool* de quinona  $A^-$  (MEHTA et al., 2010). A redução da fluorescência máxima foi observada em plantas de *R. mangle* sob estresse salino (LOPES et al., 2019; PASCOALINI, 2022) e metais traço (MACFARLANE, 2003).

Os parâmetros que caracterizam a transdução de energia por centro de reação do FSII são a absorção (ABS/RC), captura (TR0/RC) e transporte de elétrons (ET0/RC). Neste estudo o excesso do Al não levou a nenhuma alteração destes parâmetros.

Os índices de vitalidade ( $PI_{ABS}$  e  $PI_{Total}$ ) representam o produto de alguns parâmetros funcionais e estruturais independentes (STRASSER et al., 2004; KALAJI et al., 2016). Maiores valores de PI indicam incrementos na habilidade potencial de conservação de energia do aparato fotossintético (YUSUF *et al.*, 2010). Neste estudo foi observado o aumento destes índices para os tratamentos 190, 390 e 2200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al e redução no tratamento 1100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

O aumento da concentração do Al levou à redução na taxa de assimilação do  $CO_2$  ( $A$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) nos tratamentos 190, 390 e 1100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al. Redução neste parâmetro é reportado para espécies de mangue em situações de estresse salino (MARTIN et al., 2010; REEF e LOVELOCK, 2015; LOPES et al., 2019). Associações ao estresse salino indicam que a planta apresenta deficiência de prótons derivados da hidrólise da água no FSII, o que não é o caso nos tratamentos do presente trabalho, uma vez que o meio de cultivo era substituído a cada 30 dias. Isso poderia indicar ineficiência no processo de transporte de elétrons entre o FSII como observado para os dados de  $F_m$ .

As respostas fisiológicas mais acentuadas nos tratamentos com menor concentração de Al, isto é, 190 e 390  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , podem ser reflexo da quantidade de metal absorvido pela planta, tendo em vista que na maior concentração (2200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), 79% do metal foi incorporado às raízes. Estes resultados indicam que a espécie possui auto regulação e tolerância ao stress causado por metais traço.

A acumulação e translocação de metais traço em espécies de mangue foi avaliada em estudos *in situ* de Mejais et al. (2013); os autores observaram que das espécies avaliadas *R. mangle* foi a que teve a menor taxa de translocação entre os tecidos radiculares e foliares, acumulando preferencialmente os metais nas raízes. Ramos e Geraldo (2007) obtiveram resultados similares aos de Mejias et al. (2013), pois os autores encontraram uma relação linear entre a concentração dos metais avaliados (Cd, Cr, Cu, Pb e Zn) com a concentração dos mesmos na biomassa vegetal o que mostra a capacidade de incorporação dos metais na biomassa vegetal.

A tolerância a altas concentrações de Al já foi relatada para algumas espécies vegetais. Plantas de soja crescem normalmente sob estresse de 10 a 75  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Al (CAKMAK e HORST 1991), plantas de chá (*Camellia sinensis*) pode tolerar concentrações de 0,5 a 4,0 mmol  $\text{L}^{-1}$  Al (MORITA et al., 2008). Plantas lenhosas como *Cryptomeria japonica* e *Pinus thunbergii*, nativas de solos ácidos, desenvolveram várias estratégias para superar o estresse causado pelo Al (BRUNNER e SPERISEN, 2013). Alguns estudos mostram que as espécies do gênero *Rhizophora* parecem absorver metais em menor extensão que outras espécies de mangue (PETERSON., et al 1979; LACERDA et al 1986; CHENG et al 2012; MEJIAS et al., 2013). Este comportamento leva a constatação de que a espécie possui mecanismos de defesa para impedir a entrada de metais sobretudo quando estes estão em concentrações elevadas. O processo de ultrafiltração dos sais em nível do sistema radicial (SCHOLLANDER, 1968) é bastante eficiente para as espécies desta família (TOMLINSON, 1983). Provavelmente, este processo possa ser um mecanismo também eficaz de retenção dos metais com carga iônica e tamanho molecular similar ao Na e Cl.

## 5. Considerações finais

Os resultados apresentados neste estudo indicam a plasticidade fotoquímica e morfológica de *R. mangle* frente ao excesso de Al. As concentrações avaliadas neste estudo tiveram como base experimentos em cultivares agrícolas e apesar de serem observados efeitos na eficiência fotoquímica e redução da biomassa radicular e foliar em plântulas de *R. mangle*

em resposta ao excesso de alumínio avaliações com concentrações maiores são necessárias para dimensionar a toxicidade deste metal ao fotossistema, crescimento e desenvolvimento das plântulas de *R. mangle*.

## 6. Referências

ALONGI, D. M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environ. Conserv.**, v.29, p. 331–34, 2002.

ALONGI, D. M. Paradigm shifts in mangrove biology. **Coastal Wetlands an Integrated Ecosystem Approach. Elsevier. Amsterdam, Países Baixos** p, p. 615-640, 2009.

ALONGI, D. M. Dissolved iron supply limits early growth of estuarine mangroves. **Ecology**, v. 91, n. 11, p. 3229-3241, 2010.

AMORIM, K. D. S. P. **Cultivo ex situ de Propágulos de *Rhizophora mangle* L. em diferentes concentrações salinas.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, 2015.

APPENROTH, K. J.; STÖCKEL, J.; SRIVASTAVA, A.; STRASSER, R.J. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurement. **Environmental Pollution**, v. 115, p. 49–64. 2001.

ARRIVABENE, H. P., CAMPOS, C. Q., DA COSTA SOUZA, I., WUNDERLIN, D. A., MILANEZ, C. R. D., MACHADO, S. R. Differential bioaccumulation and translocation patterns in three mangrove plants experimentally exposed to iron. Consequences for environmental sensing. **Environmental Pollution**, 215, 302-313,2016.

BALL, M. C. Patterns of secondary succession in a mangrove forest of southern Florida. **Oecologia**, v. 44, n. 2, p. 226-235, 1980.

BALL, M. C., FARQUHAR, G. D. Photosynthetic and stomatal responses of two mangrove species, *Aegiceras corniculatum* and *Avicennia marina*, to long term salinity and humidity conditions. **Plant Physiology**, v. 74, n. 1, p. 1-6, 1984.

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

BARCELOS, U. D., **Efeito da densidade sobre o desenvolvimento de plântulas de *Rhizophora mangle* L. em cultivo in situ e ex situ.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, 2017.

BODIN, N., N'GOM-KÂ, R., Kâ, S., THIAW, O. T., de MORAIS, L. T., LE LOC'H, F., e CHIFFOLEAU, J. F. Assessment of trace metal contamination in mangrove ecosystems from Senegal, West Africa. *Chemosphere*, 90(2), 150-157, 2013.

BOMPY, F. L.; FELIX, G.; IMPERTY, D.; DULORMNE, D. Increasing fluctuations of soil salinity affect seedling growth performances and physiology in three Neotropical mangrove species. *Plant and Soil*, V. 380(1-2), P. 399-413, 2014.

CAKMAK, I. HORST, W. J. Effect of aluminium on net efflux of nitrate and potassium from root tips of soybean (*Glycine max L.*). *Journal of plant physiology*, v. 138, n. 4, p. 400-403, 1991.

CHENG, H., CHEN, D. T., TAM, N. F. Y., CHEN, G. Z., LI, S. Y., YE, Z. H. Interactions among  $Fe^{2+}$ ,  $S^{2-}$ , and  $Zn^{2+}$  tolerance, root anatomy, and radial oxygen loss in mangrove plants. *Journal of Experimental Botany*, 63(7), 2619-2630, 2012.

DARKÓ, É., AMBRUS, H., STEFANOVITS-BÁNYAI, É., FODOR, J., BAKOS, F., BARNABÁS, B. Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. *Plant Science*, 166(3), 583-591 2004.

DUKE, N. C., BALL, M. C., ELLISON, J. C. Factors influencing biodiversity and distributional gradients in mangroves. *Global Ecol. Biogeogr.*, v. 7, p. 27-47, 1998.

DUKE, N.C., ALLEN, J.A., *Rhizophora mangle*, *R. samoensis*, *R. racemosa*, *R. × harrisonii*(Atlantic-East Pacific red mangroves), in: Elevitch, C.R. (Ed.), Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. **Permanent Agriculture Resources (PAR)**, Hōlualoa, Hawai‘I, pp. 1-18, 2006.

DUKE, N. C., MEYNECKE, J. O.,DITTMANN, S., ELLISON, A. M., ANGER, K.,BERGER, K., CANNICCI, S.,DIELE, K., EWEL, K. C., FIELD, C. D.,KOEDAM, N., LEE, S. Y.,

FALQUETO, A. R., SILVA, D. M., FONTES, R. V. Photosynthetic Performance of Mangroves *Rhizophora mangle* And *Laguncularia racemosa* Under Fields Conditions. *Revista Árvore*, V. 32, P. 577-582, 2008.

FARNSWORTH, E., The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 31, 107-138, 2000.

FELLER, I. C.; LOVELOCK, C. E.; BERGER, U.; MCKEE, K. L.; JOYE, S. B.; BALL, M. C. Biocomplexity in mangrove ecosystems. **Ann. Rev. Mar. Sci.**, v. 2, p. 395-417, 2010.

FOY, C.D. Effects of aluminum on plant growth. In: CARSON, E.W. (Ed.). *The plant root and its environment*. Charlottesville: University Press of Virginia. p.60 1 -642, 1974.

FOY C.D., Soil chemical factors limiting plant root growth, in: Hatfield J.L., Stewart B.A. (Eds.), *Advances in Soil Sciences: Limitations to Plant Root Growth*, Vol. 19, **Springer** Verlag, New York, pp. 97–149, 1992.

GIRI, C.; OCHIENG, E., TIESZEN, L. L., ZHU, Z., SINGHS, A., LOVELANDS, T., MASEK, J., DUKE, N. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecol. Biogeogr.**, v. 20, p.154-159, 2011.

GUREVITCH, J., SCHEINER, S. M., FOX, G. A. **Ecologia Vegetal** Artmed Editora, 2009.

GURURANI, M. A., VENKATESH, J., GANESAN, M., STRASSER, R. J., HAN, Y., KIM, J. I., LEE, H. Y., SONG, P. S. In Vivo Assessment of Cold Tolerance through Chlorophyll-*a* Fluorescence in Transgenic Zoysiagrass Expressing Mutant Phytochrome A. **PLoS ONE**, v. 10. 2015.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. *The water culture method for growing plants without soils*. Berkeley: California **Agricultural Experimental Station**, 1950.

HOGARTH, J. P. Mangrove ecosystems. In: LEVIN, S. A. (Ed.). *Encyclopedia of biodiversity*. San Diego: **Academic Press**. p. 10-22,2013.

JIMENEZ, J. A., LUGO, A. E., CINTRON, G. Tree mortality in mangrove forests. **Biotropica**, p. 177-185, 1985.

KALAJI, H. M., JAJOO, A., OUKARROUM, A., BRESTIC, M., ZIVCAK, M., SAMBORSKA I. A. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiol. Plant.** 38 102 10.1007/s11738-016-2113-y, 2016.

KOCHIAN, L. V., JONES, D. L. Aluminum toxicity and resistance in plants. In: YOKEL, R.; GOLUB, M. S. *Research Issues in Aluminum Toxicity*. Bristol: Taylor and Francis Publishers p.69-90, 1997.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual review of plant biology**, v. 42, n. 1, p. 313-349, 1991.

KRAUSS, K. W.; ALLEN, J. A. Influences of salinity and shade on seedling photosynthesis and growth of two mangrove species, *Rhizophora mangle* and *Bruguiera sexangula*, introduced to Hawaii. **Aquatic Botany**, v. 77, p. 311–324, 2003.

KRUITWAGEN, G., PRATAP, H. B., COVACI, A., WENDELAAR BONGA, S. E. Status of pollution in mangrove ecosystems along the coast of Tanzania. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 56, p. 1022-1031, 2008.

LACERDA, L. D., REZENDE, C. E., JOSÉ, D. V., & FRANCISCO, M. C. F. Metallic composition of mangrove leaves from the southeastern Brazilian coast. **Revista brasileira de biologia**, 46(2), 395-399, 1986.

LARCHER, Walter; PICCIONI, Marcello. **Ecofisiologia vegetal**. Edagricole, 1993.

LIMA, K. O., TOGNELLA, M. M. P., CUNHA, S. R., DE ANDRADE, H. A. Growth models of *Rhizophora mangle* L. seedlings in tropical southwestern Atlantic. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 207, 154-163, 2018.

LOPES, D. M. S. et al. Salinity variation effects on photosynthetic responses of the mangrove species *Rhizophora mangle* L. growing in natural habitats. **PHOTOSYNTHETICA**, v. 57, n. 4, p. 1142-1155, 2019.

LINDSAY, E.L.L. Chemical equilibria in soils. New York: Wiley- Interscience, 1 499p, 1979.

MACFARLANE, G.R., KOLLER, C.E., BLOMBERG, S.P. Accumulation and partitioning of heavy metals in mangroves: a synthesis of field-based studies. **Chemosphere**, v. 69, n. 9, p. 1454-1464, 2007.

MARCHAND, C., NORDHAUS, I., DAHDOUH-GUEBAS, F. A world without mangroves? **Science**, 317, p. 41-42, 2000.

MARCHAND, C., LALLIER-VERGÈS, E., BALTZER, F., ALBÉRIC, P., COSSA, D., BAILLIF, P. Heavy metals distribution in mangrove sediments along the mobile coastline of French Guiana. **Marine chemistry**, 98(1), 1-17, 2006.

MARTIN, K. C., BRUHN, D., LOVELOCK, C. E., FELLER, I. C., EVANS, J. R., & BALL, M. C. Nitrogen fertilization enhances water-use efficiency in a saline environment. **Plant, Cell e Environment**, 33(3), 344-357, 2010.

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review Cytology**, San Diego, v.200, p.1-46, 2000.

MCKEE, K.L., Interspecific variation in growth, biomass partitioning, and defensive characteristics of neotropical mangrove seedlings: response to light and nutrient availability. **Am. J. Bot.** 82, 299-307, 1995.

MEHTA, P. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. **Plant Physiology and biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 16-20, 2010.

MEJÍAS, C.L., MUSA, J. C., OTERO, J. Exploratory evaluation of retranslocation and bioconcentration of heavy metals in three species of mangrove at Las Cucharillas marsh, Puerto Rico. **Journal of Tropical Life Science**, v. 3, n. 1, p. 14-22, 2013.

MORITA, Akio et al. Mechanism for the detoxification of aluminum in roots of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 147-153, 2008.

NAIDOO, G.; RAIMAN, F. Some physical and chemical properties of mangrove soils at Sipingo and Mgeni, Natal. **South African Journal of Botany**, v. 1, n. 4, p. 85-90, 1982.

NAGAJYOTI, P. C<sup>‡</sup>; LEE, K. D<sup>‡</sup>; SREEKANTH, T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental chemistry letters**, v. 8, n. 3, p. 199-216, 2010.

NATH B, CHAUDHURI P, BIRCH G. Assessment of biotic response to heavy metal contamination in *Avicennia marina* mangrove ecosystems in Sydney Estuary, Australia. **Ecotoxicol Environ Saf.** 2014; 107:284-290. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.06.019.

PASCOALINI, S. S. **Absorção de carbono em um manguezal no sudeste do brasil: perspectiva de análise dos serviços ecossistêmicos** Tese de doutorado. Universidade Federal do Espírito Santo, 2019.

PASCOALINI, S., TOGNELLA, M., FALQUETO, A., SOARES, M. Photosynthetic efficiency of young *Rhizophora mangle* L. in a mangrove in southeastern Brazil. **Photosynthetica**, 60(3), 337-349. 2022.

PAPAGEORGIOU G. C.; GOVINDJEE. Photosystem II fluorescence: slow changes—scaling from the past. **J Photochem Photobiol B** 104(12):258–270, 2011.

PETERSON, P. J., BURTON, M. A. S., GREGSON, M., NYE, S. M., e PORTER, E. K.. Accumulation of tin by mangrove species in West Malaysia. *Science of the Total Environment*, 11(2), 213-221,1979.

RABINOWITZ D., Mortality and initial propagule size in mangrove seedlings in Panama. **J Ecol** 66:45-51,1978.

RAMOS, M. G. M., GERALDO, L. P.. Avaliação das espécies de plantas *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle* como bioindicadoras de poluição por metais traço em ambientes de mangues. **Engenharia sanitária e ambiental**, v. 12, n. 4, p. 440-445, 2007.

RAVEN, Peter H. et al. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 2014.

REEF, R., LOVELOCK, C. E. Regulation of water balance in mangroves. **Annals of botany**, v. 115, n. 3, p. 385-395, 2015.

RIVERA-MONROY, V.H., DAY, J.W., TWILLEY, R.R., VERA-HERRERA, F., CORONADO-MOLINA, C., Flux of nitrogen and sediment in a fringe mangrove forest in Terminos Lagoon, Mexico. **Estuar. Coast. Shelf Sci.** 40, 139–160, 1995.

SAENGER, P., MCCONCHIE, D., e CLARK, M. W. Mangrove forests as a buffer zone between anthropogenically polluted areas and the sea, 1991.

SALVADOR, J. O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, e.; CABRAL, C. P. Influência do alumínio no crescimento e na acumulação de nutrientes em mudas de goiabeira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.24, n.4, p.787-796, 2000.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y., CINTRON-MOLERO, G., ADAIME, R.R., CAMARGO, T.M., Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian coast. **Estuaries** 13, 204-218,1990.

SMITH, S.M., SNEDAKER, S. C. Hypocotyl Function in Seedling Development of the Red Mangrove, *Rhizophora mangle* L. 1. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 677-685, 2000.

SOARES, M.G., TOGNELLA, M.P., CUEVAs, E., MEDINA, E., Photosynthetic capacity and intrinsic water-use efficiency of *Rhizophora mangle* at its southernmost western Atlantic range. **Photosynthetica** 53, 464-470, 2015.

SOUZA, M. MA., SAMPAIO, E. VSB. Predation on propagules and seedlings in mature and regenerating mangroves in the coast of Ceará, Brazil. **Hydrobiologia**, v. 661, n. 1, p. 179-186, 2011.

SPALDING, M.; KAINUMA, M.; COLLINS, L. World atlas of mangroves. London: *Earthscan*, Smith, S.M., Snedaker, S.C., 2000. Hypocotyl Function in Seedling Development of the Red Mangrove, *Rhizophora mangle* L. **Biotropica** 32, 677-685, 2010.

STRASSER, R. J., SRIVASTAVA, A., & TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*, 445-483, 2000.

STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Analysis of fluorescence transient, In: G. Papageogiou, Govindjee (eds.), Chlorophyll Fluorescence: a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration, *Springer*, Dordrecht, v. 19, p. 321-362, 2004.

QIU, Y. W., YU, K. F., ZHANG, G., WANG, W. X. Accumulation and partitioning of seven trace metals in mangroves and sediment cores from three estuarine wetlands of Hainan Island, China. **Journal of Hazardous Materials**, 190(1-3), 631-638,2011.

QIU, Y. W., QIU, H. L., ZHANG, G., & LI, J. (2019). Bioaccumulation and cycling of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and dechlorane plus (DP) in three natural mangrove ecosystems of South China. **Science of The Total Environment**, 651, 1788-1795,2019.

TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TAFFOUO, V. D., WAMBA, O. F., YOUMBI, E., NONO, G. V., & AKOA, A. Growth, yield, water status and ionic distribution response of three bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) landraces grown under saline conditions. **International Journal of Botany**, 6(1), 53-58,2010.

TOMLINSON, P.B., 1. The Botany of Mangroves. Cambridge University Presss, Cambridge, pp. 419, 1986.

TÓTH, S. Z., NAGY, V., PUTHUR, J. T., KOVÁCS, L., & GARAB, G. The physiological role of ascorbate as photosystem II electron donor: protection against photoinactivation in heat-stressed leaves. **Plant Physiology**, 156(1), 382-392, 2011.

VIEHWEGER, K. How plants cope with heavy metals. **Botanical Studies**, v. 55, n. 1, p. 35, 2014.

YE, Y., TAM, N.F.Y., LU, C.Y., WONG, Y.S., Salinity on germination, seedling growth and physiology of three salt-secreting mangrove species. **Aquat. Bot.** 83,193-205, 2005.

YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; Strasser, R. J.; Tsimilli-Michael, M.; Govindjee; Sarin, N. B. 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**, V. 1797, P. 1428-1238, 2010.

WU, Q., TAM, N. F., LEUNG, J. Y., ZHOU, X., FU, J., YAO, B., ... & XIA, L. Ecological risk and pollution history of heavy metals in Nansha mangrove, South China. **Ecotoxicology and environmental safety**, 104, 143-151, 2014.

7.

## CAPÍTULO 3:

### **Experimentos *ex situ* de *Rhizophora mangle*: Qual o tamanho ideal da amostra e da parcela?**

#### **Resumo**

Duas das questões pertinentes nos experimentos envolvendo propágulos de *Rhizophora mangle* L. são: o tamanho da amostra e tamanho da parcela. Este estudo propôs-se responder estas incógnitas. Para o dimensionamento amostral considera-se os casos cujo experimento não envolve delineamento experimental e o tamanho ótimo de parcela (top) para os casos em que a pesquisa envolva delineamentos experimentais. As análises foram realizadas com número amostral de 1.724 propágulos coletados em seis diferentes anos no mesmo manguezal. A massa fresca (g) individual foi obtida e as variáveis comprimento (cm) e diâmetro (cm) foram registradas nas posições apical, mediana e basal de cada propágulo. Após a realização das estatísticas descritivas, associadas com análises de correlação linear e teste de normalidade, houve a definição das metodologias do dimensionamento amostral e do top. Para a instalação de experimentos com propágulos da espécie *Rhizophora mangle* L. sem envolver delineamentos experimentais, a quantidade de material propagativo é determinada por estimação intervalar bootstrap; para estas pesquisas é apresentado um ábaco e também equações para o tomador de decisão realizar o dimensionamento amostral em função dos erros tolerados em torno da média.

Concernente ao tamanho ótimo da parcela, O método Hatheway foi empregado nos Delineamentos Inteiramente Casualizados e em Blocos Casualizados, o número de plântulas por parcela foi definido em função do número de tratamentos, repetições e precisão assumida.

Palavras chave: Planejamento experimental, delineamentos experimentais, precisão experimental, variabilidade, manguezal.

## 1. Introdução

*Rhizophora mangle* é uma espécie amplamente distribuída nos manguezais do novo mundo. Desempenha um importante papel ecológico e econômico. Sua ampla distribuição e a contínua produção de propágulos faz com que a espécie seja amplamente utilizada em diversos experimentos *in situ* e *ex situ*. Os propágulos de *R. mangle* apresentam uma baixa variabilidade genética tanto entre plantas no mesmo estuário (HOGARTH, 2007), quanto ao longo de gradiente latitudinal (PIL et al., 2011). Contudo os propágulos possuem uma grande variabilidade morfológica apresentando comprimento, diâmetro e pesos variados (MCKEE, 1995; SMITH; SNEDAKER, 1995; SIMPSON et al., 2017). Esta alta variabilidade pode contribuir para o aumento do erro não controlado em análises experimentais, uma vez que os propágulos maduros de *R. mangle* possuem entre 10 a 50 cm de comprimento (DeYoe et al. 2020). Esta amplitude no tamanho envolvendo as variáveis comprimento, diâmetro e massa possui diversas causas, dentre elas, destaca-se os estudos que avaliaram as respostas aos danos causados por insetos (MCKEE, 1995; BAENA et al., 2020), herbivoría por caranguejos (DANGREMOND, 2015), além de influências abióticas como as variações climáticas impostas durante a ontogênese do embrião (PEEL et al., 2019) e de fatores endógenos como a idade fisiológica dos propágulos (SMITH e SNEDAKER, 2000).

Há evidências científicas que mostram que o tamanho (SOUZA et al., 2003; DANGREMOND, 2015) e a massa (LIN e STERNBERG 1995; SMITH e SNEDAKER, 2000) do propágulo tem efeito significativo no crescimento inicial de *R. mangle*. Souza et al. (2003) concluíram que propágulos maiores proporcionam plantas com maior comprimento e número de folhas, além de maior massa seca. Para estes autores a variação natural do comprimento dos propágulos traduz diferenças significativas no desempenho das plântulas em termos de estabelecimento e/ou crescimento inicial, que poderiam influenciar a dinâmica da floresta.

Recomendações para minimizar o erro experimental envolvem a utilização de propágulos com a mesma idade fisiológica (SMITH e SNEDAKER, 2000), livre de danos aparentes (MCKEE, 1995; BOEHM et al. 2016) e com medidas de comprimento e peso uniformes (SMITH e SNEDAKER, 2000; KRAUSS e ALLEN, 2003; SIMPSON et al. 2017). Smith e Snedaker (2000) tomaram o cuidado adicional de, após separar os propágulos para os tratamentos e por experimento, realizarem a análise de variância para as variáveis: comprimento, diâmetro e massa, assumindo seu Delineamento como Inteiramente Casualizado (DIC) e verificaram se a hipótese de nulidade era aceita. De fato, ao adotar o modelo experimental DIC, parte-se do pressuposto que o material experimental é uniforme, haja vista

que neste tipo de delineamento experimental não há controle sobre o efeito local (GOTELLI e ELLISON, 2013).

Em função do tipo de experimento e da quantidade de propágulos necessários, nem sempre é possível uniformizar os propágulos por comprimento e peso (DANGREMOND, 2015; LUNA et al., 2019). Sob o ponto de vista de análises estatísticas paramétricas não há proibição no uso dos propágulos sem prévia uniformização por tamanho ou massa, pois, sabe-se que, ao compor as parcelas, a uniformização pode ser feita dentro dos blocos experimentais, no caso de experimentos delineados em Blocos Casualizados (PIMENTEL-GOMES, 2009; ZAR, 2010) ou nas linhas e colunas de experimentos em Quadrado Latino, apesar deste tipo de experimento ser menos usado por ecólogos (GOTELLI e ELLISON, 2013).

Dentre os trabalhos experimentais que envolvem o uso de propágulos de *R. mangle*, independente da uniformização ou não do comprimento e massa, encontram-se diferentes tamanhos de parcela, envolvendo desde cinco propágulos (KOCK e SNEDAKER, 1997; LUNA et al., 2019; ZHOU et al. 2021), oito (ELLISON e FARNSWORTH, 1997), nove (BOEHM et al., 2016), dez (SMITH e SNEDAKER, 1995, 2000; FARNSWORTH et al., 1996; KRAUSS e ALLEN, 2003; BAENA et al., 2020), dezesseis (ELLISON e FARNSWORTH, 1993; DANGREMOND et al., 2015) e até dezoito propágulos por parcela (SIMPSON et al., 2017). Desta forma, não há padronização para se definir o tamanho da parcela e este é assumido arbitrariamente, muito embora, ao que parece, a maioria dos pesquisadores optem por usar 10 propágulos em cada parcela experimental.

Em situações onde na pesquisa não exista delineamento estatístico envolvido, especialmente nos casos da existência de apenas dois tratamentos, o foco do pesquisador, ao instalar o experimento, não está no tamanho da parcela, mas no tamanho da amostra que compõe cada tratamento. Nesta ótica, as análises estatísticas empregadas podem ser o teste paramétrico de t de Student, para amostras independentes ou para dados pareados, e testes não paramétricos de Mann-Whitney.

Em geral, estudos que não envolvem delineamentos experimentais não possuem uma abordagem assertiva para se definir o tamanho amostral. Os estudos envolvendo experimentos com propágulos de *R. mangle* sem delineamento possuem diversidade no tamanho amostral indo desde 10 exemplares (BOMPY et al., 2014; FARNSWORTH, 1996; KRAUS e ALLEN, 2003), 16 (ELLISON e FARNSWORTH, 1993), passando por 17 (SMITH e SNEDAKER, 2000), 30 (FEBLES-PATRÓN, 2007), 40 (WALSH et al., 1979), 50 e 60 (DANGREMOND, 2015) até 80 propágulos por grupo amostral (RABINOWITZ, 1978).

As recomendações estatísticas em relação ao tamanho de amostra salientam que este é diretamente proporcional à variabilidade dos dados e a confiabilidade desejada na estimativa, sendo inversamente proporcional ao erro de estimação permitido *a priori* pelo pesquisador,

embora não de forma linear (COCHRAN, 1977; ZAR, 2010). Neste caso, a variabilidade dos dados também não é linear (KHAN et al., 2017). Tem-se demonstrado, por ensaios em branco, que quanto menor o tamanho da parcela, maior o coeficiente de variação (CV). E à medida que o tamanho da parcela aumenta, o CV diminui e esta relação descreve modelo potencial e não linear. Portanto, há indicações para se determinar o tamanho ótimo de parcela por meio de análises estatísticas (MEIER e LESSMAN, 1971).

A abordagem estatística empregada para se determinar o tamanho ótimo de parcelas experimentais e o tamanho significativo da amostra são diferentes (LÚCIO et al., 2012). Existem várias metodologias para se determinar o tamanho de parcelas, sendo de uso bem vasto a de Hatheway (1961). Outras análises empregadas são da máxima curvatura modificada (MEIER e LESSMAN, 1971) e da máxima curvatura do coeficiente de variação (PARANAÍBA et al., 2009). Dentre estas três metodologias, a de Hatheway (1961) tem a vantagem de contemplar o tamanho da parcela em função do número de repetições, de tratamentos, da precisão experimental desejada e do delineamento experimental usado. A proposta feita por Celanti et al. (2016a) contempla os casos em que não seja possível estabelecer a vizinhança nos testes em branco, aspecto que acontece com os propágulos de *Rhizophora mangle*, pois não existe uma identificação árvore- mãe propágulo produzido.

Concernente ao dimensionamento amostral, via de regra se tem usado a metodologia segundo Cochran (1977) baseada na semi-amplitude do intervalo de confiança, ou por apoio de simulações *bootstrap* percentil quando os dados amostrais não apresentam distribuição normal (SCHMILDT et al., 2017; CHIRARA; HESTERBERG, 2019). Desta forma, este estudo tem como objetivo determinar os tamanhos de amostra e de parcela necessários para avaliar experimentos utilizando propágulos de *Rhizophora mangle* L. envolvendo uma ou mais variáveis.

## 2. Material e Métodos

Os propágulos foram coletados aleatoriamente na foz do manguezal localizado em latitudes medianas (18°S) em diferentes meses e anos, aplicados nos estudos de Amorim (2015) e de Barcelos (2017). O clima da região onde se localiza o manguezal (Parque Estadual de Itaúnas – ES) é classificado de acordo com Koppen como tropical com estações bem definidas, sendo o período úmido de outubro a março e o inverno, estação seca de abril a setembro.

A precipitação anual situa-se entre 1.000 a 1.400 mm (ALVARES et al., 2014). Em laboratório, os propágulos foram desinfetados com água destilada e detergente neutro sendo suas medidas de comprimento, massa fresca e diâmetro obtidas com paquímetro digital e fita

métrica calibrada (TOGNELLA et al., 2019). O diâmetro do hipocótilo do propágulo foi obtido em três regiões, basal, média e superior. Os resultados obtidos de massa fresca e as medidas de comprimento e diâmetro de cada propágulo nas várias datas de coleta estão sendo apresentados neste estudo.

Os dados biométricos dos propágulos foram submetidos à análise estatística para caracterização das amostras por meio de medidas de posição central (média), dispersão (desvio padrão, coeficiente de variação), além dos valores mínimo e máximo para definir o intervalo de confiança dos dados. Os dados foram testados quanto à normalidade pela análise de Shapiro-Wilk. Estimativas de correlação entre as características avaliadas (comprimento e diâmetro; comprimento e massa fresca) foram determinadas pela Correlação Linear de Pearson. Essas estatísticas foram empregadas com a finalidade de caracterizar o banco de dados e verificar a sua adequação para o estudo do dimensionamento amostral por método determinístico ou a necessidade de uso de método por simulação *bootstrap* (SCHMILDT et al., 2017; CHIRARA e HESTERBERG, 2019)

## 2.1 Dimensionamento amostral

Considerando que a maior parte das amostras dos propágulos não apresentou distribuição normal dos dados, os dados de massa fresca, comprimento e das medidas de diâmetro dos propágulos foram empregados na simulação *bootstrap*, técnica estatística mais apropriada (CHIRARA e HESTERBERG, 2019). O tamanho amostral inicial para a simulação foi considerado como adequado de acordo com critério estabelecido por Good (2013) no qual o autor estabelece que o tamanho da amostra para estudos confiáveis aplicando simulação *bootstrap* deve ser de no mínimo 100 observações.

Para as simulações, envolvendo cada característica dos propágulos e para cada época de coleta, utilizou-se a estimação intervalar via *bootstrap* pelo ou por intervalo percentil (GOOD, 2013; CHIRARA e HESTERBERG, 2019). Foram planejados 40 tamanhos de amostra para cada característica envolvendo cada data de coleta, sendo o tamanho de amostra inicial estimado para aplicação em dez propágulos, a partir deste valor foram realizados incrementos de dezena a dezena até atingir 400 propágulos.

Foram realizadas 4.000 simulações para cada tamanho de amostra planejado em cada caracter, executadas por meio de reamostragem e atendendo às recomendações de Rosner (2016). Para cada amostra simulada foi estimada a sua média. Assim, foram obtidas 4000 estimativas da média. Em seguida, calculou-se a amplitude do intervalo de confiança em 95% (IC 95%), determinado pela diferença entre o percentil 97,5% e o percentil 2,5% para cada tamanho de amostra, sendo estes resultados plotados graficamente. O próximo procedimento

determinou o tamanho de amostra (número de propágulos) para a estimação da média de cada característica para cada época de coleta. Para essa simulação empregando o tamanho inicial (dez propágulos), considerou-se como tamanho de amostra o número de propágulos a partir do qual as médias se mantiveram dentro do limite do intervalo de confiança à 95% (QIAN, 2017).

Finalmente, foi realizada a Análise de Covariância para dados linearizados da equação com modelo potencial da relação entre o tamanho amostral e o coeficiente de variação a fim de verificar se as diferentes características usadas como covariável não alteravam o intercepto e a inclinação da curva. Verificando-se que os dois parâmetros da equação não são alterados pelas covariáveis. Portanto utilizou-se, conjuntamente, medidas dos CVs e dos tamanhos de amostra para construção do ábaco a partir do qual o pesquisador pode determinar o tamanho amostral para sua pesquisa.

As análises estatísticas e os gráficos foram realizados com auxílio do programa R versão 4.2.0 (R Development Core Team, 2022).

## 2.2 Tamanho ótimo de parcela

Para a determinação do tamanho ótimo de parcela ( $top = X_0$ ) utilizou-se o método proposto por Hatheway (1961), conforme equação a seguir, aplicando-o apenas os dados de massa fresca dos propágulos.

$$X_0 = \sqrt[3]{2(t_1 + t_2)^2 CV^2 / Jd^2} \quad (\text{Equação 1})$$

Na Equação 1, os valores do coeficiente de heterogeneidade (**b**) de Smith (1938) e o coeficiente de variação (**CV**) foram obtidos por simulação bootstrap, com 4000 reamostragens, conforme Celanti et al. (2016a). A variável **d** corresponde a precisão experimental e compreende a diferença entre as médias dos tratamentos detectadas como significativas em nível de 5% de probabilidade e expressa em porcentagem da média geral. O  $t_1$  é o valor tabelado de t para testes de significância (teste bilateral a 5%), com gl graus de liberdade;  $t_2$  é o valor tabelado de t, bilateral, correspondente a um erro de 2 (1- p), com gl graus de liberdade, sendo  $p = 0,80$ , a probabilidade de se obter resultados significativos (Schmidt et al. 2016). Os valores tabelados da distribuição de t foram obtidos com gl graus de liberdade do resíduo, em função dos I tratamentos e J repetições, sendo  $gl = (I)(J - 1)$  para experimento em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) e  $gl = (I - 1)(J - 1)$  para experimentos em Delineamento em Blocos Casualizados (DBC).

Nas simulações, os critérios para as combinações determinaram como o menor número de tratamentos sendo igual a três ( $I = 3$ ), este valor mínimo de tratamentos foi selecionado considerando que, a detecção de diferença entre duas médias já possa ser feita pela análise de variância ou pelo teste t de Student, abordado no dimensionamento amostral desta pesquisa;

como o menor número de repetições igual a 2 ( $r = 2$ ), por ser este o mínimo para se detectar o erro experimental; e, os I tratamentos e as J repetições foram combinados de tal forma a proporcionar no mínimo 20 parcelas por experimento, conforme recomendado por Pimentel Gomes (2009). Seguindo os pressupostos descritos anteriormente a primeira simulação foi composta por: I = 3 tratamentos e J = 7 repetições, o que forneceu 21 parcelas experimentais.

Em algumas situações experimentais, há necessidade de se avaliar mais de um parâmetro. Para isto, o pesquisador lança mão do esquema experimental fatorial para o delineamento experimental, via de regra, DIC ou DBC. Salienta-se que o top num DIC será o mesmo para experimentos com um fator ou mais de um fator avaliado porque os valores de t tabelados serão os mesmos nos dois casos. Pelo método de Hatheway (1961), os valores de t dependem dos gl do resíduo, que no caso serão os mesmos já que os gl dos I tratamentos são iguais ao somatório dos gl dos fatores e suas interações (PIMENTEL-GOMES, 2009; ZAR, 2010). O mesmo raciocínio vale para os casos de experimentos em DBC. Entretanto, reforçamos que, os esclarecimentos feitos para experimentos em esquemas fatoriais não são válidos para experimentos em esquema de parcelas divididas, pois nestes há mais de um resíduo experimental o que aumenta a complexidade, não sendo alvo desta publicação.

Quando o pesquisador avaliar o experimento, ele poderá analisar vários caracteres, destrutivos e/ou não destrutivos. Cada característica poderá demandar um tamanho de parcela ( $X_0$ ) diferente, (BOYHAN, 2013; CELANTI et al., 2016a; CELANTI et al., 2016b; SCHMILDT et al. 2016), e, portanto, avaliando-se várias características haverá diversos tamanhos de parcela. No entanto, quando o pesquisador instala o experimento, ele terá que se definir por apenas um tamanho de parcela. Neste trabalho, a definição sobre a tomada de decisão para o tamanho de parcela se dá em função do valor do CV da amostra de propágulos. A determinação do  $X_0$  foi feita para apenas uma característica, isto é, a de maior CV dentre aquelas analisadas. Isto é válido porque usando o método de Hatheway (1961), com simulação bootstrap, a única incógnita será o CV contido na Equação 1. Este depende de qual característica está em avaliação, visto que a precisão (d) e o número de repetições (J) são definidos pelo pesquisador. Os valores de t são tabelados e fixos em função do número de tratamentos e repetições e, o valor do índice de heterogeneidade (b) é igual à unidade, conforme demonstrado por Celanti et al. (2016a).

Os dados foram analisados utilizando-se os recursos computacionais do software R versão 4.2.0 (R Development Core Team, 2022). Por envolver uso de simulações, aplicou-se o comando *set.seed* a fim de garantir que o mesmo propágulo fosse usado para cálculo do top em DIC e em DBC. Por se tratar de uma variável aleatória discreta, o top foi apresentado por número inteiro, adotando-se o arredondamento para inteiro superior (CELANTI et al., 2016b).

### 3. Resultados e Discussão

As medidas de tendência central, de variabilidade e o teste de normalidade de Shapiro-Wilk resultantes da avaliação das cinco características de propágulos maduros de *Rhizophora mangle* L. coletados em seis diferentes épocas são apresentados na Tabela 1. O comprimento médio dos propágulos esteve em torno de 26 cm para todas as épocas de avaliação, com valor mínimo de 11,7 cm e máximo de 44,0 cm. Valores estes verificados na coleta realizada em fevereiro de 2019, época que também apresentou a maior variabilidade dos dados com CV em torno de 20 %. Apesar da média de comprimento se manter constante nas diferentes coletas, a variabilidade foi diferente, o que também foi verificado em outros estudos. Simpson et al. (2017) observaram CV em torno de 10,0% para os manguezais da Flórida, distinto da variação reportada por Smith e Snedaker (1995) de 15,40% de variação nesta mesma região. Por outro lado, Rabinowitz (1978), nos seus estudos no Panamá, registrou o maior coeficiente de variação, isto é, 24,28%.

Para a massa fresca dos propágulos, a maior variabilidade também se deu nos propágulos na coleta de fevereiro de 2019 com CV de 43,85% (Tabela 1), semelhante à variabilidade verificada por Rabinowitz (1978). A massa fresca média foi muito variável em função da época de coleta, sendo o valor mínimo registrado de 13,57 g na coleta de novembro de 2018 e o máximo de 22,24 g na coleta de abril de 2016. Apesar desta discrepância nos valores médios, a mesma se encontra dentro do esperado para a dinâmica populacional da espécie *R. mangle*, pois a massa média pode variar de acordo com a época do ano (TYAGI, 2003). Rabinowitz (1978) também registrou massa média em torno de 14 g para propágulos coletados no Panamá, resultado obtido no período chuvoso daquele país, entre abril e novembro. A maioria dos autores, no entanto, tem verificado peso fresco médio em torno de 20 g (MCKEE, 1995; SMITH; SNEDAKER, 1995; SIMPSON et al., 2017), semelhante ao observado neste trabalho para a maioria das épocas de coleta.

Em relação ao diâmetro dos propágulos avaliados neste estudo, os maiores valores médios se situam na base (diâmetro basal) sendo em torno de 1,4 cm (Tabela 1), semelhantes ao verificado por Smith e Snedaker (1995) e Profitt e Travis (2010).

Ainda referente à análise descritiva dos dados, o teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostra que apenas o diâmetro basal apresentou distribuição normal dos dados nas diferentes épocas de coleta (Tabela 1). Diante deste diagnóstico, a determinação do tamanho da amostra envolveu a simulação bootstrap percentil como recomendado por Schmildt et al. (2017) e o tamanho ótimo de parcela pelo método de Hatheway (1961), também empregando simulação bootstrap.

A Figura 1 mostra que existe correlação linear significativa (Correlação de Pearson,  $p$  valor  $< 0,01$ ) entre as características medidas e, especialmente  $r > 0,70$ , entre as medidas do diâmetro nas diferentes posições do propágulo (mediana, basal e apical). Estes resultados nos levam a concluir que não há necessidade de se aferir os diâmetros nestas três porções do propágulo por ocasião da caracterização das amostras, sendo necessária apenas uma das três medidas de diâmetro; recomendamos a porção mediana. A correlação entre massa e comprimento de propágulos também se mostrou significativa ( $r = 0,823$ ,  $p < 0,01$ ), semelhante ao observado por Souza et al. (2003) que encontraram correlação de 0,97 e significativa ( $p < 0,01$ ).

Tabela 1: Descrição do tamanho da amostra de campo (n) com os valores de mínimo (Min), máximo (Max) e as análises estatísticas envolvendo a média (X), desvio padrão (s), coeficiente de variação (CV) e teste de normalidade de Shapiro-Wilk (SW) para cinco características avaliadas em propágulos maduros de *Rhizophora mangle* L. coletados em diferentes épocas na foz do rio Itaúnas

Comprimento (cm)							
Época de coleta	N	Min	Max	X	s	CV (%)	SW <sup>1/</sup>
Abril de 2014	132	16,50	34,60	25,77	3,50	13,58	0,3673
Março de 2015	551	12,30	41,50	25,04	4,81	19,19	< 0,05
Abril de 2015	248	13,00	42,00	26,31	4,85	18,44	< 0,05
Abril de 2016	200	15,50	39,00	27,15	3,89	14,32	< 0,05
Novembro de 2018	96	20,00	35,05	25,88	3,35	12,95	< 0,05
Fevereiro de 2019	497	11,70	44,00	25,18	4,91	19,51	0,1974
Massa fresca (g)							
Época de coleta	n	Min	Max	X	s	CV (%)	SW <sup>1/</sup>
Abril de 2014	132	7,50	29,50	18,14	4,45	24,51	0,7515
Março de 2015	551	5,50	46,90	18,17	6,40	35,24	< 0,05
Abril de 2015	248	6,00	49,00	19,99	6,60	33,02	< 0,05
Abril de 2016	200	8,31	39,50	22,24	5,98	26,87	< 0,05
Nov. de 2018	96	7,85	23,79	13,57	4,01	29,54	< 0,05

Fev. de 2019	497	3,04	39,50	16,01	7,02	43,85	< 0,05
-----							
Diâmetro da base (mm)							
-----							
Época de coleta	n	Min	Max	X	s	CV (%)	SW1/
Abril de 2016	200	10,40	18,00	14,29	1,21	8,44	0,1414
Fev. de 2019	497	5,30	18,20	10,64	1,84	17,31	0,1956
-----							
Diâmetro do meio (mm)							
-----							
Época de coleta	n	Min	Max	X	s	CV (%)	SW1/
Abril de 2016	200	9,80	16,20	12,82	1,35	10,54	0,4440
Fev. de 2019	497	6,10	14,30	9,57	1,72	18,01	< 0,05
-----							
Diâmetro da ponta (mm)							
-----							
Época de coleta	n	Min	Max	X	s	CV (%)	SW1/
Abril de 2016	200	5,60	10,60	7,27	1,37	15,64	< 0,05
Fev. de 2019	497	3,50	8,50	6,01	0,76	12,65	< 0,05

1/ Valor p do teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

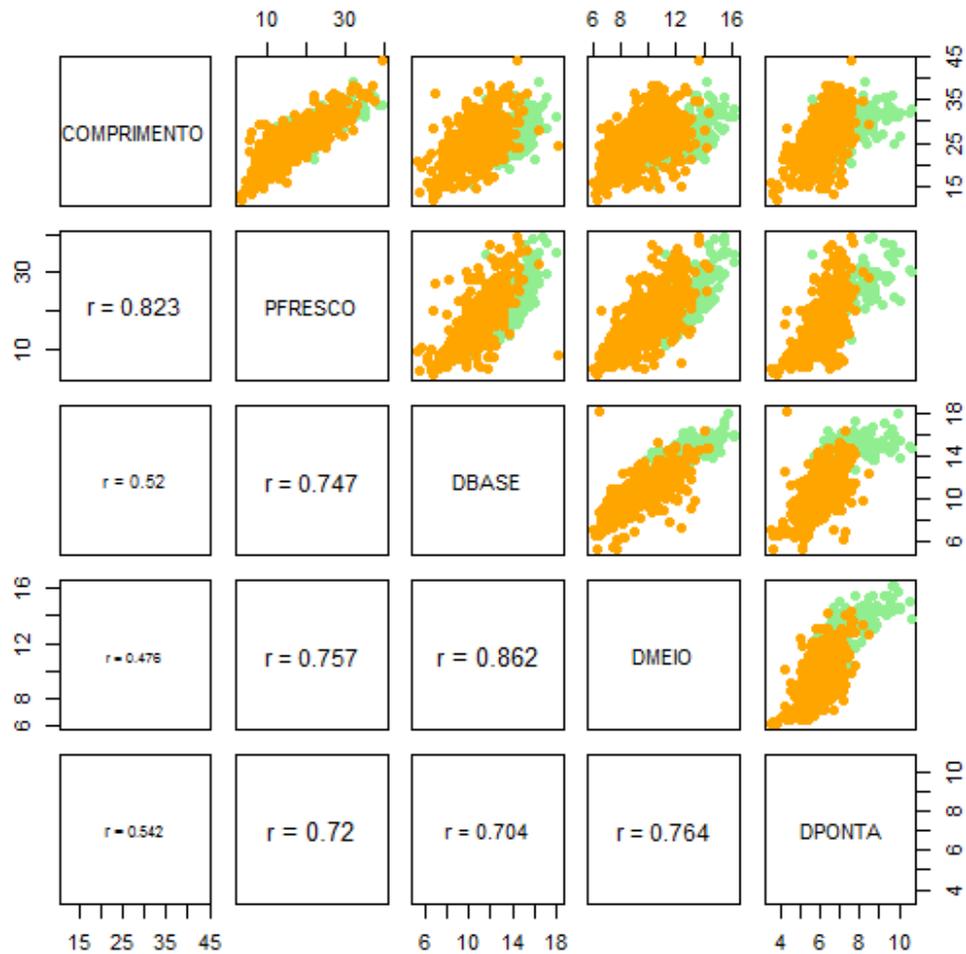


Figura 1: Coeficiente de Correlação de Pearson (diagonal inferior) e diagrama de Dispersão (diagonal superior) dos dados de comprimento, massa fresca e diâmetros dos propágulos de *Rhizophora mangle* L. Círculos em verde correspondem aos dados de 200 propágulos coletados em abril de 2016 e aqueles em laranja aos 497 propágulos coletados em fevereiro de 2019.

### 3.1 Dimensionamento amostral

Para a demonstração do tamanho amostral em função das diferentes precisões amostrais simuladas, utilizou-se a característica massa fresca. O tamanho da amostra para massa fresca de propágulos coletados em fevereiro de 2019, com erro assumido de 10% em torno da média, é de 75 propágulos (Figura 2). A amplitude do intervalo de confiança de 95% diminuiu gradativamente com o acréscimo do tamanho da amostra (número de propágulos), o que revela aumento da precisão na estimação da média. Nota-se também que a média *bootstrap* estimada para cada tamanho de amostra é invariável (CHIRARA; HESTERBERG, 2019), o que credencia a análise gráfica para determinação do tamanho da amostra de cada caractere, para diferentes erros amostrais assumidos em torno da média.

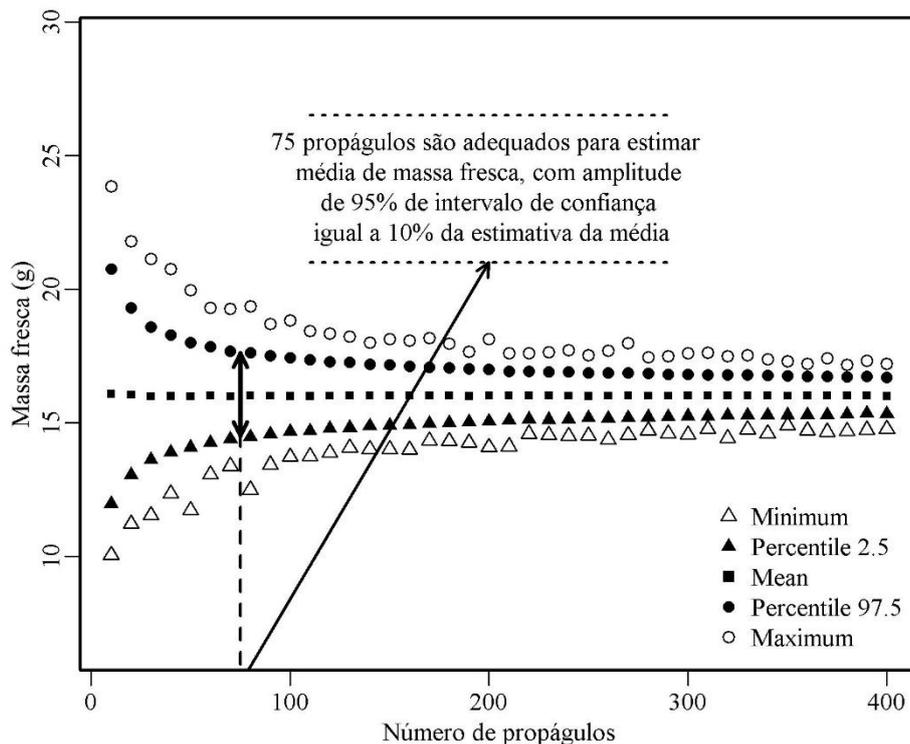


Figura 2: Descrição do comportamento da simulação dos valores de massa fresca (g) dos propágulos de acordo com valores:  $\triangle$  Mínimo,  $\blacktriangle$  Percentil 2,5%,  $\blacksquare$  Média,  $\bullet$  Percentil 97,5% e  $\circ$  Máximo das 4.000 médias de massa fresca de propágulos, obtidos por amostragens em diferentes tamanhos de amostra (10, 20, 30, ... 400 propágulos) a partir de 497 propágulos de *Rhizophora mangle* L.

Os tamanhos de amostra a partir do intervalo de confiança do *bootstrap* percentil das 4,000 estimativas de média para os diferentes erros em torno da média são apresentados na Tabela 2. Como demonstrado, o tamanho da amostra diminui com redução da precisão, isto é, ocorre aumento do erro em torno da média (Figura 2). Desta forma, avaliando os propágulos coletados em fevereiro de 2019, ao ampliar a margem de erro aceitável de 10% para 15%, o tamanho da amostra requerido decresce de 75 para 33 propágulos. Comportamento similar foi registrado também na avaliação da massa fresca de frutos de maracujá silvestre (SCHMILDT et al., 2017) e em caracteres vegetativos e reprodutivos de plantas de linho (CARGNELUTTI Filho et al., 2018).

Na comparação entre as características avaliadas, o tamanho da amostra requerido é maior para massa fresca em relação às medidas de comprimento e diâmetro, dentro da mesma faixa de erro amostral. O mesmo comportamento fora observado por Cargnelutti Filho et al. (2012) na avaliação para a massa fresca e medidas de comprimento e diâmetro de feijão de porco e mucuna cinza.

Tabela 2: Tamanho de amostra experimental (número de propágulos) para estimação da média de cinco características de propágulos maduros de *Rhizophora mangle* L., para as amplitudes do intervalo de confiança de 95% considerando margem de erros de 5 %; 10 %; 15 %; 20 % e 25 % da estimativa da média, com base em propágulos coletados em seis épocas na foz do rio Itaúnas

Época de coleta	Erro (%)				
	5	10	15	20	25
<b>Comprimento(cm)</b>					
Abril de 2014	29	8	4	2	2
Março de 2015	57	15	7	4	3
Abril de 2015	53	14	6	4	3
Abril de 2016	32	8	4	2	2
Novembro de 2018	27	7	3	2	2
Fevereiro de 2019	59	15	7	4	3
<b>Massa fresca (g)</b>					
Abril de 2014	95	24	11	6	4
Março de 2015	192	48	22	12	8
Abril de 2015	170	43	19	11	7
Abril de 2016	113	28	13	8	5
Novembro de 2018	138	35	16	9	6
Fevereiro de 2019	297	75	33	19	12
<b>Diâmetro da base (mm)</b>					
Abril de 2016	12	3	2	1	1
Fevereiro de 2019	47	12	6	3	2
<b>Diâmetro do meio (mm)</b>					
Abril de 2016	18	5	2	2	1
Fevereiro de 2019	50	13	6	4	2
<b>Diâmetro da ponta (mm)</b>					
Abril de 2016	56	14	7	4	3
Fevereiro de 2019	25	7	3	2	1

Somente com os caracteres biométricos (Tabela 2) há dificuldade para se definir o tamanho da amostra empregando-se propágulos de *R. mangle* nos experimentos *ex situ*. Das análises surgem três questionamentos que precisam ser ponderados para as tomadas de decisões e que buscamos responder. O primeiro é definir qual a característica vai balizar o tamanho da amostra. Nesta situação, orientamos que se defina pela característica que apresentar maior variabilidade, que no presente estudo foi a massa fresca, tendo sido também recomendado em outros estudos envolvendo espécies distintas (CARGNELUTTI Filho et al., 2012, 2018; SCHMILDT et al., 2017). Haja vista a distinção entre os tipos de sementes (forma e tamanho) entre todos os estudos, podemos afirmar que a massa fresca é um bom estimador para definir o tamanho amostral com maior assertividade. Sob o ponto de vista experimental não há problemas em se basear na biomassa por se tratar de uma característica com alta correlação linear com os demais aspectos morfológicos avaliados nos propágulos (Figura 1).

A segunda abordagem é sobre qual a precisão deve ser usada para a definição do tamanho amostral. Neste caso, a resposta está nos anseios do pesquisador que irá definir a precisão de acordo com seu interesse (SCHABARUM et al., 2018). Isto envolve decisões éticas em relação às espécies mais vulneráveis, custo do experimento e dificuldades operacionais. Como salientado anteriormente, experimentos mais precisos requerem ampliar o tamanho da amostra, por outro lado, maior será a probabilidade de ocorrer diferenças significativas entre os tratamentos.

A terceira questão envolve a variável climática; nossos resultados apresentam coletas em condições de precipitação diferente (final de período seco, início de período úmido, entre outros) e indicam que o regime de precipitações durante a ontogênese do propágulo implica em variabilidade distinta nos mesmos caracteres morfológicos (Tabela 1), resultando nos diferentes tamanhos de amostra observados para cada período (Tabela 2). Estudos mostram que em regiões tropicais, o desenvolvimento fenológico dos propágulos é controlado principalmente pela precipitação e disponibilidade de água no solo (SINGH e KUSHWAHA, 2005, COURALET et al., 2013). Van der Stocken et al. (2017) avaliaram o período de abscisão dos propágulos das espécies de mangue no mundo. Os resultados encontrados pelos autores mostram que existe uma relação significativa entre a precipitação e temperatura, com os propágulos sendo liberados majoritariamente no período chuvoso. Esta relação entre a abscisão dos propágulos e precipitação também foi relatada nos estudos de Fernandes (1999) e Nadia et al (2012) no Brasil. Tem sido sugerido que os propágulos são liberados durante períodos em que os fatores ambientais são ótimos para o crescimento e desenvolvimento das plântulas (DUKE et al., 1984), que podem ser específicos da espécie e do local. A liberação preferencial na estação chuvosa pode ser considerada uma estratégia vantajosa para a espécie, pois propicia a dispersão dos propágulos por hidrocoria (FERNANDES et al., 2007). Uma vez que as atividades antropogênicas influenciarão

cada vez mais essas características, recomendamos que o fator clima seja levado em consideração para a definição do tamanho amostral. Este aspecto na decisão implicará na variabilidade que o pesquisador terá com a amostra coletada.

Após essas decisões, pode ocorrer ainda que a variabilidade entre as características morfológicas observada por um conjunto de propágulos em outra localidade, medida pelo coeficiente de variação da massa fresca, possa não ser nenhuma das apresentadas nesta pesquisa (Tabela 1). Neste caso, o pesquisador ficaria sem resposta. Desta forma, uma solução pode ser a modelagem estatística (GOTELLI; ELLISON, 2013).

Com base nos 18 valores de CV (Tabela 1) considerados como variável independente e nos 18 valores de cada margem de erro (5%, 10%, 15%, 20% e 25%) como variável dependente (Tabela 2), buscamos o melhor ajuste aos dados e registramos a relação do modelo potencial. Aplicando análise de covariância, após linearização dos dados, verifica-se que o intercepto e a inclinação não se mostram diferentes estatisticamente ( $p > 0,05$ ) usando a massa fresca como variável e as medidas de comprimento e diâmetro como covariável e, assim, pode-se compor o ábaco (Figura 3).

Para exemplificar a utilização do ábaco, uma amostra de propágulos coletados aleatoriamente e considerando o coeficiente de variação igual a 35 %, assumindo erro de 10 %, o tamanho da amostra será de 50 indivíduos. Assim, num experimento com apenas dois tratamentos, desde que não envolva delineamentos experimentais, o consumo será de 100 propágulos.

Além do ábaco, os resultados permitiram a elaboração de equações que auxiliassem nas tomadas de decisões caso haja dificuldades na estimativa do tamanho da amostra experimental pelo uso do ábaco (Figura 3 e Tabela 3). Novamente exemplificando, uma coleta de propágulos envolvendo coeficiente de variação de 32%, a amostra experimental consumiria 159 propágulos por tratamento, caso assumisse alta precisão com 5% de erro em torno da média. Caso o pesquisador tenha coletado apenas 200 propágulos e o experimento constar de dois tratamentos, o número de propágulos será insuficiente, pois serão necessários 318 propágulos, devendo ser complementado com uma nova coleta ou, então, assumir menor precisão. Neste exemplo, alterando a margem de erro para 10% em torno da média, serão requeridos 40 propágulos por tratamento, totalizando 80 propágulos no experimento. Situação semelhante a essa foi relatada por Souza et al. (2003) que coletaram 33 ou 34 propágulos por local de coleta e concluíram que esse tamanho de amostra não era suficiente para uma análise significativa de variação no tamanho dos propágulos e optaram por fazer uma coleta suplementar.

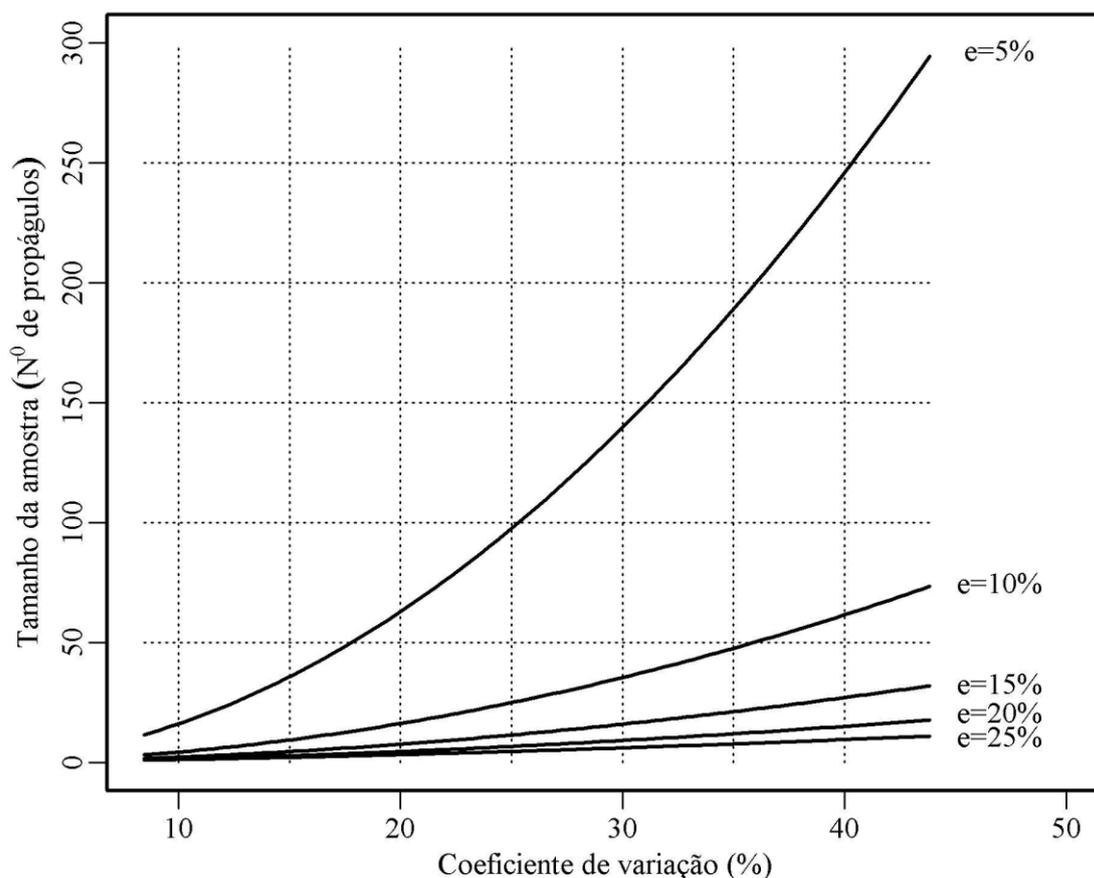


Figura 3: Ábaco da determinação do tamanho da amostra de propágulos de *Rhizophora mangle* L. para instalação de experimentos a partir do coeficiente de variação do peso fresco dos propágulos, considerando erro de estimativa de 5%, 10%, 15%, 20% e 25% em torno da média.

Tabela 3: Equações estimadas para determinação do tamanho da amostra ( $n_{exp}$ ) de propágulos de *Rhizophora mangle* L. na instalação de experimentos para diferentes erros de estimativa (5%, 10%, 15%, 20% e 25%) em torno da média.

Erro (%)	Equação	R <sup>2</sup>
5	$n_{exp(5\%)} = 0,17284CV^{1,96819}$	0,9999
10	$n_{exp(10\%)} = 0,05067CV^{1,92502}$	0,9950
15	$n_{exp(15\%)} = 0,03057CV^{1,83868}$	0,9988
20	$n_{exp(20\%)} = 0,02309CV^{1,75585}$	0,9945
25	$n_{exp(25\%)} = 0,02632CV^{1,59407}$	0,9860

### 3.2 Tamanho ótimo de parcela

O método de Hatheway (1961) foi empregado para a elaboração do tamanho ótimo de parcela (top) com base nos resultados de coleta dos propágulos de *R. mangle* (Tabela 4). A determinação do tamanho ótimo da parcela foi elaborada para experimentos com propágulos levando-se em conta delineamentos inteiramente casualizado (DIC) e em blocos casualizados

(DBC). Exemplificando a utilização da Tabela 4, supondo um experimento em DIC com 10 tratamentos ( $I = 10$ ) empregando seis repetições ( $J = 6$ ) com alta precisão ( $d = 5\%$ ) em torno da média, cada parcela experimental terá top de 201 propágulos e o experimento todo envolverá a coleta de 12060 propágulos, que é o resultado de  $(I)(J)$  (top). Percebe-se que um experimento com esta formulação é praticamente inviável. Se o pesquisador diminuir a precisão, por consequência haverá declínio do top. Caso opte por usar uma precisão de 20%, o top será 13 propágulos por parcela e o experimento todo consumirá 780 propágulos.

Verifica-se que na comparação entre DIC e DBC, para um mesmo  $I$ , mesmo  $J$  e mesma  $d$ , o maior top será para o DBC, para experimentos de tamanho menor, o que também fora constatado por Celanti et al. (2016b). Assim, numa situação com  $I = 4$  tratamentos,  $J = 5$  repetições e com precisão  $d = 5\%$ , usando o delineamento DIC, o top será de 262 propágulos. Enquanto a mesma decisão para o método DBC resultará num top de 274 propágulos por parcela. Entretanto, com o aumento do tamanho do experimento, a diferença nos top entre DIC e DBC é reduzida ou até inexistente. Considerando o exemplo anterior dado para o DIC, com  $I = 10$  tratamentos,  $J = 6$  repetições, precisão de  $d = 5\%$  e, portanto, 60 parcelas no experimento, o top será o mesmo tanto para DIC quanto para o DBC em quaisquer das  $d$  precisões, isto é, desde  $5\%$  até  $25\%$  (Tabela 4).

Os resultados definidos para os top (Tabela 4) implicam em tomadas de decisões para experimentos instalados usando propágulos coletados aleatoriamente em cada sítio e sem prévia seleção para tamanho e peso, apenas selecionados com a eliminação dos propágulos com danos, como já orientado para padronização em pesquisas (SOUZA et al., 2003). A tabela 4 agiliza a execução dos experimentos por ausência de determinação dos caracteres morfológicos e permitindo manter acurácia nas decisões. Recomendamos sua utilização em experimentos em larga escala que demandaria maior esforço na determinação da biometria.

Por outro lado, no caso de experimentos em que haja necessidade de selecionar os propágulos por tamanho ou peso, o top será sempre menor do que os apresentados na Tabela 4, mas servirá como um referencial. Num experimento em esquema fatorial em experimentos DIC, com  $I = 10$  tratamentos (Fator A = 5 níveis e fator B = 2 níveis) e com  $J = 6$  repetições, Simpson et al. (2017) usaram 18 propágulos por parcela, o que, se considerar os resultados desta pesquisa, corresponde a precisão entre 15 e 20% em torno da média. No entanto, como os pesquisadores padronizaram os propágulos por peso, a precisão do experimento foi bem maior, com  $d < 15\%$ .

As análises deste estudo, com base no conjunto de amostras coletadas, contribuem para as tomadas de decisões com maior acurácia no desenvolvimento de experimentos *ex situ* com a espécie *R. mangle*. Dada a similaridade entre os propágulos do

gênero (TOMLINSON, 1986) incentivamos a aplicação das tabelas, ábaco e modelos para as demais espécies da Família *Rhizophoraceae*.

Tabela 4: Tamanho ótimo de parcela, pelo método de Hatheway (1961) para experimentos com propágulos de *Rhizophora mangle* L. em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e em blocos casualizados (DBC) considerando diferentes números de tratamentos (I), repetições (J) e com diferentes precisões (d) em torno da média.

I	J	DIC					DBC				
		d = 5%	d = 10%	d = 15%	d = 20%	d = 25%	d = 5%	d = 10%	d = 15%	d = 20%	d = 25%
3	7	185	47	21	12	8	196	49	22	13	8
4	5	262	66	30	17	11	274	69	31	18	11
4	6	213	54	24	14	9	221	56	25	14	9
4	7	180	45	20	12	8	185	47	21	12	8
5	4	331	83	37	21	14	343	86	39	22	14
5	5	256	64	29	16	11	262	66	30	17	11
5	6	209	53	24	14	9	213	54	24	14	9
5	7	177	45	20	12	8	180	45	20	12	8
6	4	323	81	36	21	13	331	83	37	21	14
6	5	251	63	28	16	11	256	64	29	16	11
6	6	206	52	23	13	9	209	53	24	14	9
6	7	175	44	20	11	7	177	45	20	12	8
7	3	445	112	50	28	18	457	115	51	29	19
7	4	318	80	36	20	13	323	81	36	21	13
7	5	248	62	28	16	10	251	63	28	16	11
7	6	204	51	23	13	9	206	52	23	13	9
7	7	173	44	20	11	7	175	44	20	11	7
8	3	437	110	49	28	18	445	112	50	28	18
8	4	314	79	35	20	13	318	80	36	20	13
8	5	246	62	28	16	10	248	62	28	16	10
8	6	203	51	23	13	9	204	51	23	13	9
8	7	172	43	20	11	7	173	44	20	11	7
9	3	431	108	48	27	18	437	110	49	28	18
9	4	311	78	35	20	13	314	79	35	20	13
9	5	244	61	28	16	10	246	62	28	16	10
9	6	201	51	23	13	9	203	51	23	13	9
9	7	171	43	19	11	7	172	43	20	11	7
10	2	710	178	79	45	29	728	182	81	46	30
10	3	426	107	48	27	18	431	108	48	27	18
10	4	309	78	35	20	13	311	78	35	20	13
10	5	243	61	27	16	10	244	61	28	16	10
10	6	201	51	23	13	9	201	51	23	13	9
10	7	171	43	19	11	7	171	43	19	11	7

I	J	DIC					DBC				
		d = 5%	d = 10%	d = 15%	d = 20%	d = 25%	d = 5%	d = 10%	d = 15%	d = 20%	d = 25%
15	2	661	166	74	42	27	668	167	75	42	27
15	3	412	103	46	26	17	413	104	46	26	17
15	4	302	76	34	19	13	303	76	34	19	13
15	5	239	60	27	15	10	240	60	27	15	10
15	6	198	50	22	13	8	198	50	22	13	8
15	7	169	43	19	11	7	169	43	19	11	7
20	2	638	160	71	40	26	642	161	72	41	26
20	3	405	102	45	26	17	406	102	46	26	17
20	4	299	75	34	19	12	299	75	34	19	12
20	5	229	58	26	15	10	229	58	26	15	10
20	6	190	48	22	12	8	190	48	22	12	8
20	7	162	41	18	11	7	162	41	18	11	7
25	2	625	157	70	40	25	628	157	70	40	26
25	3	401	101	45	26	17	401	101	45	26	17
25	4	297	75	33	19	12	297	75	33	19	12
25	5	236	59	27	15	10	236	59	27	15	10
25	6	196	49	22	13	8	196	49	22	13	8
25	7	168	42	19	11	7	168	42	19	11	7
30	2	617	155	69	39	25	618	155	69	39	25
30	3	398	100	45	25	16	398	100	45	25	16
30	4	295	74	33	19	12	296	74	33	19	12
30	5	235	59	27	15	10	235	59	27	15	10
30	6	195	49	22	13	8	195	49	22	13	8
30	7	167	42	19	11	7	167	42	19	11	7
35	2	611	153	68	39	25	612	153	68	39	25
35	3	396	99	44	25	16	396	99	44	25	16
35	4	294	74	33	19	12	295	74	33	19	12
35	5	235	59	27	15	10	235	59	27	15	10
35	6	195	49	22	13	8	195	49	22	13	8
35	7	167	42	19	11	7	167	42	19	11	7

#### 4. Considerações finais

Os resultados obtidos neste estudo visam auxiliar a definir tamanho amostral e quantidade de propágulos de *Rhizophora mangle* L. a serem utilizados em experimentos *ex situ*.

Pesquisas que não envolvem delineamento experimentais, o gasto de material propagativo é determinado pela estimação intervalar *bootstrap* para saber a quantidade a ser utilizada o pesquisador deve consultar o ábaco e as equações apresentadas neste estudo para que o dimensionamento seja feito em função dos erros tolerados em torno da média.

O método de Hatheway (1961) mostrou-se adequado para a determinação do tamanho ótimo de parcelas para instalação de experimentos nos delineamentos inteiramente casualizados (DIC) e em blocos casualizados (DBC) para experimentos *ex situ* com *R. mangle* e os valores a serem utilizados como referência foram calculados em função do número de tratamentos, de repetições e precisão experimental.

## 5. Referências

ALVARES, C. A., STAPE, J. L., SENTELHAS, P. C., GONÇALVES, J. D. M., & SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6), 711-728, 2013.

AMORIM, K. D. S. P. Cultivo *ex situ* de Propágulos de *Rhizophora mangle* L. em diferentes concentrações salinas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, 2015.

BAENA, M.L.; CHAMORRO-FLORESCANO, I.A.; HUESCA-DOMÍNGUEZ, I.; DELFÍN-ALFONSO, C.A. Characteristics of insect damage in propagules of red mangrove (*Rhizophora mangle*) from the Gulf of Mexico Coast. *Southwestern Entomologist*, v.45, n.1, p.175-184, 2020. <https://doi.org/10.3958/059.045.0119>

BARCELOS, U. D., Efeito da densidade sobre o desenvolvimento de plântulas de *Rhizophora mangle* L. em cultivo *in situ* e *ex situ*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, 2017.

BOEHM, F.R.; SANDRINI-NETO, L.; MOENS, T.; LANA, P.C. Sewage input reduces the consumption of *Rhizophora mangle* propagules by crabs in a subtropical mangrove system. *Marine Environmental Research*, v.122, p.23-32, 2016.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.09.003>

BOLOGNA, P.A.X.; CAMPANELLA, J.J.; RESTAINO, D.J.; FETSKE, Z.A.; LOURENCO, M.; SMALLEY, J.V. Lingering impacts of hurricane Hugo on *Rhizophora mangle* (red mangrove) population genetics on St. John, USVI. *Diversity*, v.11, n.4, p. 65, 2019.

<https://doi.org/10.3390/d11040065>

BOMPY, F.; LEQUEUE, G.; IMBERT, D.; DULORMNE, M. Increasing fluctuations of soil salinity affect seedling growth performances and physiology in three Neotropical mangrove species. *Plant and Soil*, v.380, p.399-413, 2014.

DOI 10.1007/s11104-014-2100-2

BOYHAN, G. E. Optimum plot size and number of replications for determining watermelon yield, fruit size, fruit firmness, and soluble solids. *HortScience*, v. 48, n. 9, p. 1200-1208, 2013.

CARGNELUTTI FILHO, A.; TOEBE, M.; BURIN, C.; FICK, A.L.; ALVES, B.M.; FACCO, G. Sample size for estimating the average length, diameter and weight of seeds of jack bean and velvet bean. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.42, n.9, p.1541-1544, 2012. <http://www.scielo.br/pdf/cr/v42n9/a24612cr6535.pdf>

CARGNELUTTI FILHO, A.; ALVES, B.M.; SANTOS, G.O.; WARTHA, C.A.; KLEINPAUL, J.A.; SILVEIRA, D.L. Sample size to estimate the mean and median of traits in flax. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, Recife, v.13, n.1, e5492, 2018. DOI:10.5039/agraria.v13i1a5492

CELANTI, H.F.; SCHMILDT, E.R.; SCHMILDT, O.; ALEXANDRE S.R.; CATTANEO, F.L. Optimal plot size in the evaluation of papaya scions: proposal and comparison of methods. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 63, n.4, p. 469-476, 2016a. <http://www.scielo.br/pdf/rceres/v63n4/2177-3491-rceres-63-04-00469.pdf>

CELANTI, H. F., SCHMILDT, O., ALEXANDRE, S. R., CATTANEO, F. L., & SCHMILDT, E. R. Plot size in the evaluation of papaya seedlings 'Baixinho de Santa Amália' in tubes. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(3), 1-15. 2016b. <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v38n3/0100-2945-rbf-38-3-e-533.pdf>

CHIHARA, L.M.; HESTERBERG, T.C. *Mathematical statistics with resampling and R*. 2<sup>nd</sup> ed. Hobekan, NJ: John Wiley & Sons, 2019. 541p.

CLARKE, P.J., ALLAWAY, W.G.. The regeneration niche of the grey mangrove (*Avicennia marina*): effects of salinity, light and sediment factors on establishment, growth and survival in the field. *Oecologia* 93, 548-556, 1993.

COCHRAN, W. G. *Sampling techniques*, 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1977. 428 p.

COURALET, C., VAN DEN BULCKE, J., NGOMA, L. M., VAN ACKER, J., & BEECKMAN, H. Phenology in functional groups of central African rainforest trees. *Journal of Tropical Forest Science*, 361-374, 2013.

DAVIS, J; H. The ecology and geologic role of mangroves in Florida. *Papers of the Tortugas Laboratory (Carnegie Institution)*. 1940. 303-412p.

DANGREMOND, E.M. Propagule predation by crabs limits establishment of an endemic mangrove. *Hydrobiologia*, v.755, p.257-266, 2015. DOI 10.1007/s10750-015-2238-9

DANGREMOND, E.M.; FELLER, I.C.; SOUSA, W.P. Environmental tolerances of rare and common mangroves along light and salinity gradients. *Oecologia*, v.179, p.1187-1198, 2015. DOI 10.1007/s00442-015-3408-1

DeYoe, H., Lonard, R. I., Judd, F. W., Stalter, R., & Feller, I. Biological Flora of the Tropical and Subtropical Intertidal Zone: Literature Review for *Rhizophora mangle* L. *Journal of Coastal Research*, 36(4), 857-884, 2020.

ELLISON, A.M.; FARNSWORTH, E.J. Seedling survivorship, growth, and response to disturbance in Belizean mangal. *American Journal of Botany*, v.80, n.10, p.1137-1145, 1993.

ELLISON, A.M.; FARNSWORTH, E.J. Simulated sea level change alters anatomy, physiology, growth, and reproduction of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.). *Oecologia*, v.112, p.435-446, 1997.

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

FEBLES-PATRON, J.L.; LOPEZ, J.N.; SAMPEDRO, E.B. The abiotic factors effects on the development of primary roots, growth and survival of *Rhizophora mangle* L. propagules. *Madera y Bosques*, v.13, n.2, p.15-27, 2007.

FERNANDES, M. EB. Phenological patterns of *Rhizophora* L., *Avicennia* L. and *Laguncularia* Gaertn. f. in Amazonian mangrove swamps. In: *Diversity and Function in Mangrove Ecosystems*. Springer, Dordrecht, 1999. p. 53-62.

FERNANDES, M E. B., NASCIMENTO, A. A. M., CARVALHO, M. L. Estimativa da produção anual de serapilheira dos bosques de mangue no Furo Grande, Bragança-Pará. *Revista Árvore*, v. 31, p. 949-958, 2007.

GIRI, C., OCHIENG, E., TIESZEN, L.L., ZHU, Z., SINGH, A., LOVELAND, T., MASEK, J., DUKE, N. Status and distribution of mangrove forests of the world using Earth observation satellite data. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 20, 154-159, 2011.

GOOD, P.I. *Introduction to statistics through resampling methods and R*. 2nd ed, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2013. 210p.

GOTELLI, N.J.; ELLISON, A.M. *A primer of ecological statistics*. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2013. 614p.

Hatheway, W. H. (1961). Convenient plot size. *Agronomy Journal*, 53(4), 279-280.

HATHEWAY, William H. Convenient Plot Size 1. *Agronomy Journal*, v. 53, n. 4, p. 279-280, 1961.

HOGARTH, P.J. *The biology of mangroves and seagrasses*. Oxford: Oxford University Press, 2007. 273p.

KHAN, M.; HASIJA, R.C.; TANWAR, N. Optimum size and shape of plots based on data from a uniformity trial on Indian Mustard in Haryana. *MAUSAM*, v.68, n.1, p. 67-74, 2017.

[http://metnet.imd.gov.in/mausamdocs/16816\\_F.pdf](http://metnet.imd.gov.in/mausamdocs/16816_F.pdf)

KOCH, M.S.; SNEDAKER, S.C. Factors influencing *Rhizophora mangle* L. seedling development in Everglades carbonate soils. *Aquatic Botany*, v.59, p.87-98, 1997.

KRAUSS, K.W.; ALLEN, J.A. Influences of salinity and shade on seedling photosynthesis and growth of two mangrove species, *Rhizophora mangle* and *Bruguiera sexangula*, introduced to Hawaii. *Aquatic Botany*, v.77, p.311-324, 2003. doi:10.1016/j.aquabot.2003.08.004

LIN, G., e STERNBERG, L. D. S. (1995). Variation in propagule mass and its effect on carbon assimilation and seedling growth of red mangrove (*Rhizophora mangle*) in Florida, USA. *Journal of Tropical Ecology*, 11(1), 109-119.

LÚCIO AD; HAESBAERT FM; SANTOS D; SCHWERTNER DV; BRUNES RR. Sample size and plot size for growth and productivity characteristics of tomato. *Horticultura Brasileira*, v.30, n.4, p.660-668, 2012.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362012000400016>

LUNA, M.M.A.; BERNINI, E.; LAGE-PINTO, F. Photochemical responses by seedlings of two mangrove species grown under diferente light levels. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v.14, n.2, p.86-99, 2019.

MCKEE, K.L. Interspecific variation in growth, biomass partitioning, and defensive characteristics of neotropical mangrove seedlings: response to light and nutrient availability. *American Journal of Botany*, v.82, n.3, p.299-307, 1995.

MEIER, V. D.; LESSMAN, K. J. Estimation of Optimum Field Plot Shape and Size for Testing Yield in *Crambe abyssinica* Hochst. 1. *Crop Science*, v. 11, n. 5, p. 648-650, 1971.

NADIA, L T. MORELLATO, L. P. C., MACHADO, I. C. Reproductive phenology of a northeast Brazilian mangrove community: Environmental and biotic constraints. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, v. 207, n. 9, p. 682-692, 2012.

PARANAIBA, P. F., FERREIRA, D. F., DE MORAIS, A. R. TAMANHO OTIMO DE PARCELAS EXPERIMENTAIS: PROPOSIC AO DE MÉTODOS DE ESTIMAC AO. *Rev. Bras. Biom*, v. 27, n. 2, p. 255-268, 2009.

PEEL, J.R.; GOLUBOV, J.; MANDUJANO, M.C.; LÓPEZ-PORTILLO, J. Phenology and floral synchrony of *Rhizophora mangle* along a natural salinity gradient. *Biotropica*, v.51, n.3, p.355363, 2019. <https://doi.org/10.1111/btp.12644>

PIL, M. W., BOEGER, M. R., MUSCHNER, V. C., PIE, M. R., OSTRENSKY, A., & BOEGER, W. A. Postglacial north-south expansion of populations of *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) along the Brazilian coast revealed by microsatellite analysis. *American Journal of Botany*, 98(6), 1031-1039, 2011.

PIMENTEL-GOMES, F. Curso de estatística experimental. 15. ed., Piracicaba: Fealq, 2009. 451p.

PROFFITT, C. E., TRAVIS, S. E. Red mangrove seedling survival, growth, and reproduction: Effects of environment and maternal genotype. *Estuaries and Coasts*, v. 33, n. 4, p. 890-901, 2010.

QIAN, S.S. Environmental and ecological statistics with R. 2nd ed. New York: Chapman & Hall. 2017. 535p.

R Core Team. (2022). R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

RABINOWITZ, D. Dispersal properties of mangrove propagules. *Biotropica*, v.10, p.47-57, 1978.

ROSNER, B. Fundamentals of biostatistics. 8th ed. Boston: Cengage Learning. 2016. 927p.

SCHABARUM, D.E.; CARGNELUTTI FILHO, A.; LAVEZO, A.; FOLLMANN, D.N.; KLEINPAUL, J.A.; CHAVES, G.G.; PEZZINI, R.V. Sample Size for Morphological Traits of Sunn Hemp. *Journal of Agricultural Science*, v.10, n.1, 2018.

<https://doi.org/10.5539/jas.v10n1p152>

SCHMILDT, E. R., SCHMILDT, O., CRUZ, C. D., CATTANEO, L. F., & FERREGUETTI, G. A. Optimum plot size and number of replications in papaya field experiment. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(2), 1-9, 201, 2000. <http://doi.org/10.1590/0100-2945201637>

SCHMILDT, E. R., OLIARI, L. S., SCHMILDT, O., ALEXANDRE, R. S., & PIRES, F. R. Determinação da área foliar de *Passiflora mucronata* a partir de dimensões lineares do limbo foliar. *Revista Agro@ mbiente On-line*, 10(4), 351-357, 2016.

SCHMILDT, E. R., SILVA, W., DE JESUS AMBROSIO, T., SCHMILDT, O., NASCIMENTO, A. L., & FERNANDES, A. A. Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de alface. *Revista Agro@ mbiente On-line*, 11(4), 290-295, 2017.

SIMPSON, L.T.; OSBORNE, T.Z., FELLER, I.C. Establishment and biomass allocation of black and red mangroves: response to propagule flotation duration and seedling light availability. *Journal of Coastal Research*, v.33, n.5, p.1126-1134, 2017. DOI: 10.2112/JCOASTRES-D-16-00108.1

SINGH, K. P.; KUSHWAHA, C. P. Emerging paradigms of tree phenology in dry tropics. *Current Science*, p. 964-975, 2005.

SMITH, H. F. (1938). An empirical law describing heterogeneity in the yields of agricultural crops. *The Journal of Agricultural Science*, 28(1), 1-23. <https://doi.org/10.1017/s0021859600050516>

SMITH, S.M.; SNEDAKER, S.C. Salinity responses in two population of viviparous *Rhizophora mangle* L. seedling. *Biotropica*, v.27, n.4, p.435–440, 1995.

SMITH, S.M.; SNEDAKER, S.C. Hypocotyl function in seedling development of the red mangrove, *Rhizophora mangle* L. *Biotropica*, v.32, n.4a, p.677–685, 2000.

SOARES, M.L.G., ESTRADA, G.C.D., FERNANDEZ, V., TOGNELLA, M.M.P., Southern limit of the Western South Atlantic mangroves: Assessment of the potential effects of global warming from a biogeographical perspective. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 101, 44-53, 2012.

SOUSA, W.P., KENNEDY, P.G. & MITCHELL, B.J. Propagule size and predispersal damage by insects affect establishment and early growth of mangrove seedlings. *Oecologia* 135, 564–575, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1237-0>

TOGNELLA, M.M.P.; TOSTA, M.D.C.R.; BARROSO, G.F.; HOFFMAN, M.; ALMEIDAFILHO, E. Gestão do ecossistema manguezal no Brasil. NETO, R.T.A.; GALVÃO, J.L.; GALVÃO, D. N. As ciências do mar em todos os seus aspectos. Ponta Grossa, Atena Editora, p. 118-143, 2019. URL: . DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.481190907410>.

TOMLINSON, P.B, The Botany of Mangroves. Cambridge University Presss, Cambridge, pp. 419,1986.

TOMLINSON, P.B., COX, P.A., Systematic and functional anatomy of seedlings in mangrove Rhizophoraceae: vivipary explained? *Bot. J. Linn. Soc.*2000.134, 215-231, 2000.

TYAGI, A.P. Location and interseasonal variation in flowering, propagule setting and propagule size in mangroves species of the family Rhizophoraceae. *Wetlands Ecology and Management*, v.11, p.167–174, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1024251221118>

Qian, J. P., Garofalo, A. M., Gong, X. Z., Ren, Q. L., Ding, S. Y., Solomon, W. M., ... & Wan, B. N. (2017). Advances in the high bootstrap fraction regime on DIII-D towards the Q= 5 mission of ITER steady state. *Nuclear Fusion*, 57(5), 056008.

VAN DER STOCKEN, T., LOPEZ-PORTILLO, J., KOEDAM, N. Seasonal release of propagules in mangroves–Assessment of current data. *Aquatic Botany*, v. 138, p. 92-99, 2017.

WALSH, G.E.; AINSWORTH, K.A.; RIGBY, R. Resistance of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) seedlings to lead, cadmium, and mercury. *Biotropica*, v.11, n.1, p.22-27, 1979.

ZAR, J.H. Biostatistical analysis. 5<sup>th</sup> ed., Upper Saddle River: Pearson, 2010. 944p.

ZHOU, Y. Y; WANG, Y.S; INYANG, Aniefiok Ini. Ecophysiological differences between five mangrove seedlings under heavy metal stress. *Marine Pollution Bulletin*, v. 172, p. 112900, 2021.



## 6. Apêndices

Apêndice 1: Macro e micronutrientes com suas concentrações utilizadas na solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) a meia força.

		Solução estoque	Concentração /L	Volume total de solução nutritiva (½ força)		
				10L	100L	250L
Macronutrientes	Sal	g/L	1mL/L	5 mL	50mL	125mL
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	5mL/L	25mL	250mL	625mL
	KNO <sub>3</sub>	101,11	5mL/L	25mL	250mL	625mL
	CA(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	236,11	2mL/L	10mL	100mL	250mL
	MgSO <sub>4</sub>	246,48	1mL/L	5mL	50mL	125mL
Micronutrientes	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,844	1mL/L	5mL	50mL	125mL
	CuSO <sub>4</sub>	0,075				
	MnSO <sub>4</sub>	2,13				
	NH <sub>4</sub> MO	0,018				
	ZNSO <sub>4</sub>	0,374				
FeEDTA	NaEDTA	33,5	1mL/ L	5mL	50mL	125mL
	FeCL <sub>3</sub>	24,33				

## Apêndice 2:

Termos usados no teste JIP obtidos a partir do transiente de fluorescência da clorofila *a* (O-J-I-P) de acordo com Strasser *et al.*, (2004), Yusuf *et al.*, (2010).

Parâmetros de fluorescência	Descrição
<b>Dados extraídos do transiente de fluorescência OJIP</b>	
F0	Fluorescência mínima
FK = F0,3ms	Intensidade da fluorescência no ponto K aos 300 μs do transiente OJIP
FJ = F2ms	Intensidade da fluorescência no ponto J aos 2 ms do transiente OJIP
FI = F30ms	Intensidade da fluorescência no ponto I aos 30 ms do transiente OJIP
FP = F300ms	Intensidade máxima da fluorescência no ponto P aos 300 ms do transiente OJIP
<b>Parâmetros técnicos</b>	
FO = F0,05ms	Fluorescência inicial
FM	Fluorescência máxima
FV = FM - FO	Fluorescência variável
$M0 = dV/dt0 = [4 (F300\mu s - FO)/(FM - FO)]$	Taxa líquida de fechamento do fotossistema II.
$VJ = (F2ms - FO)/(FM - FO)$	Fluorescência variável normalizada no ponto J (2 ms).
$VI = (F30ms - FO)/(FM - FO)$	Fluorescência variável normalizada no ponto I (30 ms).
<b>Rendimento quântico e eficiências</b>	
$\phi P0 = TR0/ABS = (FM - FO)/FM = 1 - (FO/FM)$	Rendimento quântico fotoquímico máximo para fotoquímica primária.
$\psi E0 = ET0/TR0 = 1 - VJ$	Probabilidade de um éxciton capturado de se mover para além de QA <sup>-</sup>
$\phi E0 = \phi P0 \psi E0 = (TR0/ABS)(ET0/TR0) = ET0/ABS = (1 - FO/FM)(1 - VJ)$	Probabilidade de um fóton absorvido tem de se mover além de QA.
$\phi D0 = DI0/ABS = 1 - \phi P0 = FO/FM$	Rendimento quântico fotoquímico para dissipação de calor.
$\delta R0 = RE0/ET0 = (1 - VI)/(1 - VJ)$	Eficiência/ Probabilidade que um elétron do intersistema mover-se para o lado acceptor do FSI.
$\phi R0 = RE0/ABS = \phi P0 \psi E0 \delta R0$	Rendimento quântico para redução dos aceptores finais do FSI por fóton absorvido.
$RC/ABS = (RC/TR0)(TR0/ABS) = (VJ/M0)(FV/FM)$	Centros e reação redutores de QA por clorofila na antena do FSII.
<b>Fluxos específicos de energia</b>	
$ABS/RC = M0/VJ/\phi P0$	Fluxo de absorção por centro de reação ativo.
$TR0/RC = M0/VJ$	Fluxo de energia capturada por centro de reação ativo.
$ET0/RC = (M0/VJ)\psi E0 = (M0/Vj)(1 - VJ)$	Fluxo de elétrons transportados por centro de reação ativo.
<b>Índices de desempenho</b>	
$PIABS = RC/ABS [\phi P0/(1 - \phi P0)][\psi E0/(1 - \psi E0)]$	Índice de desempenho (potencial) para conservação de energia desde éxcitons capturados até a redução dos aceptores de elétrons do intersistema.
$PITotal = PIABS [\delta R0 / (1 - \delta R0)]$	Índice de desempenho (potencial) para conservação de energia de um éxciton capturado para redução dos aceptores finais do FSI.

Apêndice 3: Ao comparar o desenvolvimento radicular das plântulas de *R. mangle* ao final do experimento não foi observada uma redução significativa da biomassa das raízes, este resultado pode ser explicado pelo tipo de raiz que foram desenvolvidos pelas plântulas nas diferentes concentrações de alumínio (Figura 1), as plântulas que cresceram no tratamento controle tiveram o desenvolvimento normal do Sistema radicular, já as plântulas que cresceram na concentração  $2200 \mu\text{ mol L}^{-1}$  tiveram crescimento excessivo das raízes de sustentação em detrimento das de absorção (Figura 1A-D).



Figura 1: A: Emissão das raízes após 7 dias de cultivo; B: Raízes do tratamento controle após 90 dias de cultivo; C: raízes das plântulas do controle ( $0 \mu\text{ mol L}^{-1}$  de Al) após 270 dias de cultivo; D: raízes das plântulas cultivadas por 270 dias no tratamento  $2200 \mu\text{ mol L}^{-1}$  de Al.