

Geniane Schneider

**Efeitos do aumento de CO₂ na fisiologia, anatomia e
ultraestrutura de *Halodule wrightii* Ascherson**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. José Bonomi Baruffi

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Antunes Horta Junior

Florianópolis, 2014

Schneider, Geniane

Efeitos do aumento de CO₂ na fisiologia, anatomia e ultraestrutura de *Halodule wrightii* Ascherson / Geniane Schneider ; orientador, Ana Claudia Rodrigues - Florianópolis, SC, 2014.

80 p.

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

Inclui referências

1. Biologia Vegetal. 2. Biologia Vegetal . 3. Anatomia. 4. Fisiologia. 5. Ultraestrutura. I. Rodrigues, Ana Claudia . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, meu noivo Alcione Miguel Franz pelo apoio em todos os momentos.

Agradeço aos meus pais e irmãs também pelo apoio.

Agradeço aos meus orientadores José Bonomi Barufi, Ana Claudia Rodrigues e Paulo Horta que me passaram seus conhecimentos, sempre apoiando e sugerindo alternativas frente aos problemas enfrentados na pesquisa. Graças a eles evolui como pessoa e pesquisadora.

Agradeço o professor João Silva pela ajuda. Também as professoras Alessandra Fonseca e Marisa Santos por suas excelentes aulas e por estarem sempre disponíveis para responderem dúvidas.

Agradeço as colegas, em especial, Izabel, Camilla, Márcia e Chirle que me auxiliaram na pesquisa e também por serem grandes amigas.

Agradeço ao CAPES, CNPq e ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pela concessão da bolsa de estudos, pois sem esta ajuda este trabalho não seria possível.

Agradeço ainda, aos Laboratórios que disponibilizaram a estrutura e ajuda técnica para realização de minhas análises, o Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVEG), Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) e Laboratório de Ficologia (LAFIC).

Agradeço a todos os colegas pesquisadores e equipe do Projeto Coral Vivo que me auxiliaram durante todo o período de

experimentação e também forneceram a estrutura para que o estudo fosse realizado.

Agradeço a todos que de uma forma geral ajudaram para que este mestrado fosse possível, pois fazia parte de um grande desafio para mim como pessoa e profissional.

Muito Obrigada!

RESUMO

O aumento dos níveis de CO₂ atmosférico desde o período pré-industrial tem resultando na diminuição do pH dos oceanos. Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos desta redução na fisiologia, anatomia e ultraestrutura da fanerógama marinha *Halodule wrightii*. Para isso, foi realizado um experimento em mesocosmos. Os espécimes foram coletados no Parque Municipal Marinho do Recife de Fora e cultivados durante 30 dias sob diferentes concentrações de CO₂, as quais foram acompanhadas a partir da redução do pH. Isso resultou em quatro condições experimentais: pH similar ao do ambiente (condição controle), pH com redução de 0,3 unidades (-0,3), pH com redução de 0,6 unidades (-0,6) e pH com redução de 0,9 unidades (-0,9), que representam a simulação de uma atmosfera contendo 650, 1350 e 3390 ppm de CO₂, respectivamente. As variáveis abióticas, incluindo o pH, foram monitoradas. Os parâmetros eficiência fotossintética (α_{ETR}) e rendimento quântico efetivo Y(II) praticamente não variaram nos tratamentos com maior concentração de CO₂ (-0,6 e -0,9), mas diminuíram no tratamento -0,3. Esta redução possivelmente ocorreu em função das variáveis abióticas, principalmente luz e temperatura que oscilaram durante o período de experimentação. Acredita-se, que o aumento do CO₂ tenha compensado o estresse, mantendo os parâmetros fisiológicos estáveis nos tratamentos com maior concentração. A anatomia e ultraestrutura das folhas dos espécimes cultivadas tanto no controle como nos tratamentos não demonstraram alterações qualitativas. Quantitativamente, foi possível observar que, no período final de experimentação, a área em secção transversal e largura das folhas foram sensivelmente maiores no tratamento -0,9. Possivelmente, tais resultados teriam sido mais nítidos se o tempo de experimentação fosse mais longo, como observado para plantas terrestres.

PALAVRAS CHAVES: pH. Angiosperma marinha. Acidificação dos oceanos. Mesocosmos. Mudanças climáticas.

ABSTRACT

The increase in atmospheric CO₂ levels since the pre-industrial period has resulted in a decrease in the pH of the oceans. The aim of this work was to determine the effects of lowered pH on the physiology, anatomy and ultrastructure of the seagrass *Halodule wrightii*. A mesocosm study was conducted, where specimens were collected in the Parque Municipal Marinho do Recife de Fora and cultivated for 30 days at different concentrations of CO₂, which caused a decrease in pH. This resulted in four experimental conditions: pH similar to that of the environment (control condition), pH reduced by 0.3 unit (-0.3), pH reduced by 0.6 unit (-0.6) and pH reduced by 0.9 unit (-0.9), which represented the simulation of an atmosphere containing 650, 1350 and 3390 ppm CO₂. The abiotic variables, including pH, were monitored. The parameters photosynthetic efficiency (α ETR) and effective quantum yield Y(II) practically did not vary in the treatments with greater concentration of CO₂ (-0.6 and -0.9), but decreased in the -0.3 treatment. This reduction possibly occurred because of the abiotic variables, mainly light and temperature, which oscillated during the experimentation period. It is believed that the increase in CO₂ compensated for the stress, keeping the physiological parameters stable in the treatments with higher CO₂ concentration. The anatomy and ultrastructure of the leaves of the cultivated specimens in the control as well as the treatments did not demonstrate qualitative alterations. Quantitatively, it was possible to observe that in the final period of experimentation, the cross-sectional area and width of the leaves were appreciably greater in the -0.9 treatment. Possibly, such results could have been clearer if the experimentation time were increased, as observed for terrestrial plants. According to the literature, such modification in leaf structure can be attributed to the influence of CO₂ on cell division and expansion.

KEYWORDS: pH. Seagrass. Ocean acidification. Mesocosm. Climate change.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1 Coleta e preparação do material biológico	18
2.2 Desenho experimental	20
2.2.1 Sistema de mesocosmos marinho.....	20
2.2.2 Tratamentos	22
2.3 Parâmetros ambientais.....	23
2.4 Análises fisiológicas.....	24
2.4.1 Atividade fotossintetizante a partir da fluorescência da clorofila <i>a</i>	24
2.4.2 Determinação de clorofilas e carotenoides.....	26
2.4.3 Extração de açúcares e amido	28
2.4.3.1 Determinação de Açúcares solúveis totais (AST).....	28
2.4.3.2 Determinação do amido	29
2.5 Análises estruturais e ultraestruturais.....	30
2.5.1 Microscopia Óptica (MO): anatomia, testes histoquímicos e análises quantitativas	30
2.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	31
2.6 Análises estatísticas.....	31
3. RESULTADOS	33
3.1 Parâmetros ambientais.....	33
3.2 Análises fisiológicas.....	39
3.3 Microscopia Óptica (MO): anatomia, testes histoquímicos e análises quantitativas	52
3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	59
4. DISCUSSÃO	63
REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

O aumento do dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera teve início com a revolução industrial que intensificou a queima de combustíveis fósseis, e indiretamente o desmatamento para a exploração de matérias primas e produção de alimentos para uma população crescente e para um mercado cada vez mais globalizado. Estes processos elevaram as concentrações de CO₂ de 280 ppm para 379 ppm em 2005, para 390 em 2010 (IPCC, 2007, 2013) e para 411 ppm em 2014 (Apolo 11, 2014), representando 40% de aumento desde o período pré-industrial, o maior já registrado para planeta nos últimos 800.000 anos (Gautier, 2008; Lüthi *et al.*, 2008; IPCC, 2013).

As consequências deste incremento de CO₂ para a biosfera tem sido motivo de preocupação e investigação, uma vez que já se percebe os efeitos sobre o clima mundial, com alteração substancial dos fatores ambientais que determinam as fisionomias de ambientes terrestres e aquáticos. O cenário hoje observado tende a piorar uma vez que os níveis de CO₂ aumentarão ainda mais até o final do XXI (IPCC, 2013).

Apesar dos efeitos diretos mais divulgados do aumento de CO₂ privilegiar o ambiente aéreo, deve-se ressaltar que este gás afeta também os ambientes aquáticos, uma vez que as trocas entre atmosfera e oceanos, resultam na redistribuição das diferentes formas do carbono dissolvido, havendo o decréscimo do pH e do íon carbonato juntamente com o estado de saturação da calcita e aragonita. Este processo é frequentemente referido como acidificação dos oceanos (Schulz *et al.*, 2009).

Espera-se que, até o final do século, o pH dos oceanos reduza entre 0,3 e 0,4 unidades (Caldeira e Wickett, 2005; IPCC, 2013), ou até mesmo 0,3 a 0,6 unidades (Caldeira e Wickett, 2005), dependendo do cenário mundial que se estabelecer. Isso pode significar um aumento de aproximadamente 90% ou mais nas concentrações de íons de hidrogênio na água, baseando-se na premissa de que a redução em 0,1 unidade de pH corresponde a um aumento de 30% no total de prótons dissolvidos, conforme Royal Society (2005).

Estas previsões de acidificação são baseadas em informações do oceano aberto. A alta variabilidade do pH é observada em regiões costeiras, o que dificulta o entendimento sobre o impacto deste estressor nestes importantes ambientes (Duarte *et al.*, 2013). A redução do pH no ambiente natural pode ser encontrada também em zonas de ressurgências com águas profundas acidificadas (por exemplo, o sistema de corrente Califórnia; Feely *et al.*, 2008; Gruber *et al.*, 2012), por subsidência ou o afundamento da água de superfície (downwelling, Findlay *et al.*, 2013), em regiões com presença de CO₂ oriundo de aberturas vulcânicas (por exemplo Hall-Spencer *et al.*, 2008), em função do metabolismo de algumas comunidades (por exemplo, Anthony *et al.*, 2011). Ou seja, o processo de acidificação pode acentuar esta variabilidade natural, intensificando os impactos do processo de acidificação sobre a biologia, especialmente da flora marinha.

Estas respostas dos produtores primários estão relacionadas ao fato de que as mudanças no pH da água afetam diretamente a fotossíntese, uma vez que ocorre o aumento do CO₂, substrato primário deste processo bioquímico. Sabe-se que a Rubisco, enzima primária na fixação do carbono para fotossíntese, utiliza o CO₂ como substrato (Larkum *et al.*, 2006; Campbell e Fourqurean, 2014). Sendo assim, mudanças em sua disponibilidade afetariam diretamente as taxas fotossintéticas das plantas, principalmente na água do mar, aonde as taxas de difusão chegam a ser 10.000 vezes menores que no ar (Hemminga e Duarte, 2000; Sabine e Tanhua, 2009).

As angiospermas marinhas tem sua fotossíntese limitada pela baixa disponibilidade de CO₂ na água do mar (Schwartz *et al.*, 2000; Invers *et al.*, 2001; Larkum *et al.*, 2006). Assim, estas seriam favorecidas com a redução do pH. A literatura aponta aumento na fotossíntese e na biomassa dessas plantas (Zimmerman *et al.*, 1997; Short e Coles, 2001; Zimmermann, 2006; Palacios e Zimmerman, 2007; Jiang *et al.*, 2010; Harvey *et al.*, 2013).

Entretanto, respostas distintas têm sido observadas nos últimos anos. Hall-Spencer *et al.* (2008) não observaram variação nas taxas fotossintéticas com decréscimo do pH em gradiente específico observado na região da Itália (Hall-Spencer *et al.*, 2008). Nestes

ambientes, o incremento do CO₂ resultou na redução de compostos do metabolismo secundário das angiospermas marinhas, que poderia resultar em maior vulnerabilidade a doenças ou a herbívoros (Arnold *et al.*, 2012).

Respostas negativas com relação ao aumento de CO₂ foram verificadas também quando a luz, outro recurso essencial, foi limitado (Palacios e Zimmerman, 2007). Considerando este conhecimento acumulado, a construção de cenários teóricos nos levam a interpretação de que a sinergia entre acréscimo de CO₂ com fatores como aumento do nível do mar, das temperaturas e da severidade das tempestades, identificados por Grech *et al.*(2012), representam potencial de efeito combinado que podem comprometer a biologia das angiospermas marinhas, com a exclusão ou mesmo extinção local dos bancos formado por estas plantas.

Estudos com plantas terrestres demonstraram taxas fotossintéticas mais altas em concentrações elevadas de CO₂, durante certo período (Clough *et al.* 1980). Entretanto, quando as condições de elevação foram mantidas por mais tempo (meses e/ou anos) detectou-se redução ou estabilização, podendo ser um efeito sazonal e/ou possivelmente um processo de aclimação (Epron, 1995; Rey e Jarvis, 1997). Segundo Rey e Jarvis (1997), tal condição alterada por alguns meses levou a redução da atividade da rubisco e/ou decréscimo de compostos fotossintéticos tais como clorofila, proteínas solúveis e concentração de nitrogênio.

Além disso, Streck e Alberto (2006) detectaram em plantas cultivadas que os efeitos positivos do CO₂ são anulados com aumentos de 2, 3 e 6 °C na temperatura. Estes autores criaram diferentes cenários de mudanças climáticas, dobrando a quantidade de CO₂, com diferentes aumentos de temperatura do ar e com aumento e sem aumento da precipitação pluvial. Nas situações que houve aumento da temperatura o rendimento dos grãos diminuíu. Esta redução era ainda mais evidente quanto não havia acréscimo da precipitação pluvial.

Foram observadas ainda, alterações estruturais com relação ao incremento de CO₂ atmosférico em plantas terrestres, estas apresentaram acréscimos no tamanho da folha, da espessura e da área foliar (Radoglou

e Jarvis, 1990, 1992; Epron *et al.*, 1996; Pritchard *et al.*, 1999; Lin e Ceulemans, 2001).

Possivelmente, a maior disponibilidade de CO₂ também poderia resultar em alterações na anatomia dos tecidos e ultraestrutura das células das angiospermas marinhas, uma vez que a divisão, expansão e padrões celulares podem ser afetados, principalmente pelo incremento de sacarose no substrato. Ou ainda, pela expressão diferenciada de genes envolvidos com o ciclo celular (Pritchard *et al.*, 1999; Masle, 2000).

Supondo que o aumento do CO₂ fosse benéfico para as angiospermas marinhas, resultando no aumento da produtividade, há necessidade de levar em consideração que outros fatores podem agir influenciando as respostas fisiológicas e anatômicas, tais como luz, temperatura e nutrientes. Ou ainda, interferência das relações bióticas providas pelos demais seres vivos presentes nos ecossistemas de *H. wrightii*.

Fabricius *et al.* (2011) destacam que em ambientes naturalmente acidificados (> 500 ppm de CO₂) houve aumento das macroalgas e da densidade das angiospermas marinhas, por outro lado houve redução da diversidade dos epífitos e de outros organismos compostos por carbonato de cálcio. De acordo com Martin *et al.* (2008), a redução do pH (7,7) levou a um decréscimo de 90% na massa de epífitos sobre as folhas das angiospermas marinhas. Isso sugere grandes mudanças nos ecossistemas formados por estes organismos.

As consequências da redução do pH para angiospermas marinhas e a influência sobre as interações nos seus habitats são importantes, uma vez que iram afetar principalmente as zonas costeiras aonde estão presentes, sendo estes locais “hotspots” de alta produção e consumo. Assim, torna-se imprescindível entender os fatores que podem interferir e alterar a biodiversidade nestes ecossistemas.

As angiospermas marinhas tem importante função na ciclagem de nutrientes e sequestro de carbono (Orth *et al.* 2006; Greiner *et al.* 2013), podendo até mesmo influenciar na química deste, sustentando maior biodiversidade e conseqüentemente a resiliência ambientes recifais (Chapin III, *et al.* 1998). Destaca-se ainda que a maior abundância destes produtores primários esteja também relacionada à calcificação

destes ambientes, o que reforça sua importância para a manutenção da resiliência nos locais onde estão presentes (Unsworth *et al.*, 2012).

Hofmann *et al.* (2012) demonstraram a existência de variações naturais entre 0,024 a 1,430 unidades no pH da água do mar. Segundo os autores, alguns organismos já vêm experimentando regimes de pH previstos para final do século. Tais variações podem ser diárias ou sazonais e dirigidas por fatores físicos e/ou biológicos. Porém, com incremento do CO₂, o pH tende a diminuir ainda mais essas mudanças são ecologicamente significativas e há necessidade de esforços para compreender as causas e consequências para os ecossistemas marinhos (Wootton *et al.*, 2008).

Muitos estudos para entendimento das mudanças globais sobre as angiospermas marinhas são realizados em mesocosmos (Short, 1987; Zimmerman *et al.*, 1997; Palacios e Zimmerman, 2007; Ehlers *et al.*, 2008) pois nestes laboratórios a céu aberto é possível o controle de variáveis distintas, além proporcionar uma semelhança maior com a complexidade biológica dos sistemas naturais.

Com base no exposto este trabalho teve como objetivo avaliar as respostas fisiológicas, anatômicas e ultraestruturais de *Halodule wrightii* em resposta ao aumento das concentrações de CO₂, por meio da experimentação em mesocosmos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e preparação do material biológico

Exemplares de *Halodule wrightii* foram coletados no Parque Municipal Marinho do Recife de Fora (S16°24'28'' W38°59'35'') a 3 metros de profundidade aproximadamente (Figura 1).

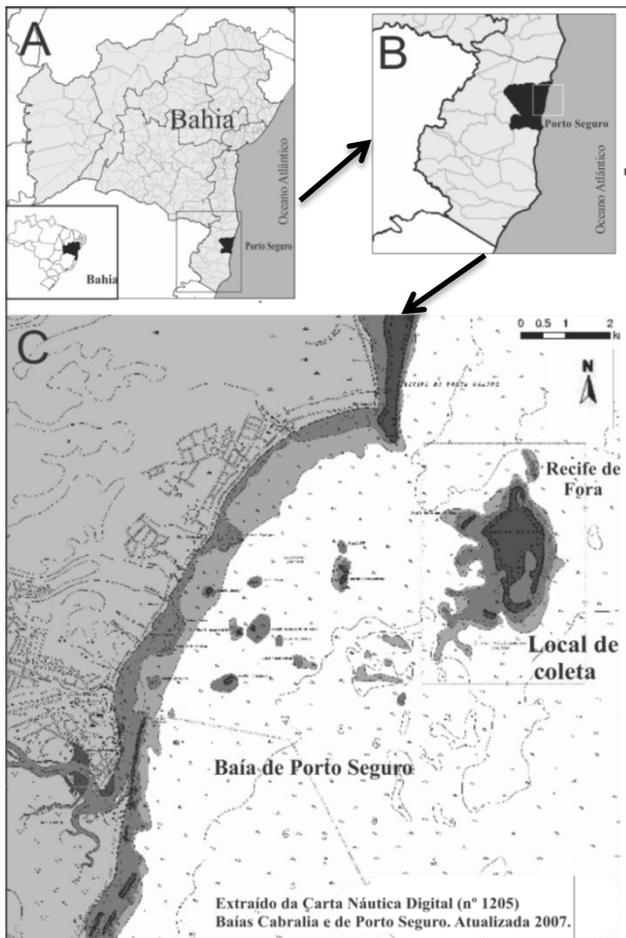


Figura 1. Local de coleta dos espécimes de *Halodule wrightii* Ascherson. (A) Bahia, (B) Porto seguro e (C) Recife de Fora.

Os indivíduos foram removidos cuidadosamente do substrato e colocados em caixas com água do mar. Posteriormente, na base de pesquisa do Projeto Coral Vivo (S16°29'34'' e W39°04'06''), os espécimes foram distribuídos em dezesseis recipientes com volume de 6 a 7 litros. Como as fanerógamas marinhas apresentam rizomas que pode variar em tamanho, estes foram cortados do tamanho dos recipientes, aproximadamente 35 cm. Após foram distribuídos de forma paralela até cobrir o fundo das bandejas. Como substrato foi utilizado areia autoclavada para evitar que variáveis desconhecidas fossem inseridas no experimento. A areia foi colocada sobre os rizomas até cobri-los totalmente (Figura 2). Exsiccatas do material coletado foram confeccionadas e depositadas posteriormente no Herbário FLOR da Universidade Federal de Santa Catarina.



Figura 2. Espécimes de *Halodule wrightii* Ascherson, sendo selecionados para serem colocados nas bandejas (A-B). Detalhe mostrando o rizoma (porção branca) (C). Bandeja com substrato dentro do tanque de experimentação (D).

2.2 Desenho experimental

2.2.1 Sistema de mesocosmos marinho

O experimento foi realizado no Mesocosmos Marinho, estrutura preparada para estudos relacionados às mudanças do clima, localizada em uma das sedes do Projeto Coral Vivo em Arraial d' Ajuda, Porto Seguro, Bahia, Brasil, sob as seguintes coordenadas geográficas S16°29'34'' e W39°04'06''.

O mesocosmos, apresenta quatro cisternas independentes com capacidade para 5000 litros de água. Nessas cisternas chega a água captada do oceano. Cada cisterna é associada a uma caixa elevada de 500 litros que distribui água em quatro dos dezesseis tanques (2,20 m x 0,35 m x 0,1 m) de 120 litros. Um volume médio de 15 m³ de água do mar é bombeado por 500 metros até a estação de pesquisa, sendo distribuída nas cisternas, nas caixas elevadas e posteriormente para cada tanque. Em seguida, a água que passa em cada tanque é devolvida ao oceano (Figura 3).

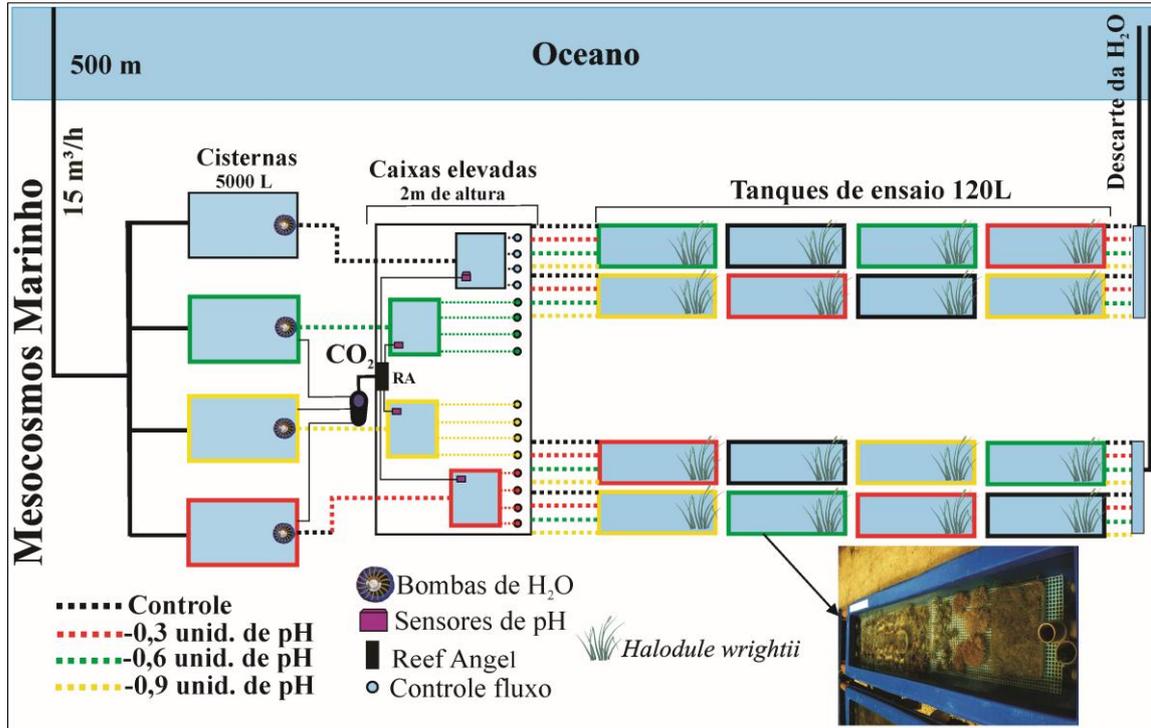


Figura 3. Esquema geral do Mesocosmos Marinho. Mostrando a estrutura de experimentação, localizado na base de pesquisa do Projeto Coral Vivo, Arraial d' Ajuda, Bahia.

A taxa média de renovação da água nos tanques de ensaio foi de cinco vezes seu volume por hora. Para movimentação da água dentro destes foi utilizado um sistema de vai e vem com duas bombas (2.500 litros/hora). A área destinada em cada um dos tanques para realização do presente estudo foi de 0,07 metros quadrados. Os tanques de ensaio foram cobertos por uma tela sombrite 50% que resultou em irradiâncias de $1000 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ às 12h00min.

2.2.2 Tratamentos

As plantas foram submetidas a quatro condições experimentais apresentando diferentes valores de pH, obtidos a partir de adição ou não de CO_2 na água do mar presente nas cisternas. Esta água era distribuída posteriormente aos tanques. Medidas contínuas desse parâmetro foram realizadas por sensores de pH presentes nas caixas elevadas. Os dados de pH obtidos eram enviados para um equipamento Reef Angel (Controlador Open-Source) que controlava a abertura das válvulas que liberavam CO_2 . Deste modo, sempre que necessário, as válvulas eram abertas e CO_2 era adicionado para que o pH diminuísse as unidades desejadas em cada tratamento. Assim, os tratamentos acompanhavam as oscilações da condição controle, composto apenas por água do mar, sem adição de CO_2 . As outras três condições, obtidas com adição de CO_2 na água do mar, foram designadas: -0,3, -0,6 e -0,9. O tratamento -0,3 apresentou uma redução de $0,34 \pm 0,24$ unidades de pH em relação ao controle. No tratamento -0,6, esta variação negativa em relação ao controle foi de $0,59 \pm 0,29$ unidades de pH. Já no tratamento -0,9, esta variação foi de $0,87 \pm 0,36$ unidades de pH. As reduções em -0,3, -0,6 e -0,9 unidades representam uma atmosfera contendo 650, 1350 e 3390 ppm, valores esperados para fim deste século e para o próximo (2100 a 2300 anos), tais previsões são realizadas com base em diferentes cenários mundiais (Caldeira e Wickett, 2005).

O período de aclimação das plantas foi de 10 dias e a duração do experimento com adição de CO_2 foi de 30 dias.

2.3 Parâmetros ambientais

Durante o experimento foram monitorados parâmetros abióticos como pH, temperatura, salinidade, irradiância e nutrientes tanto no controle quanto nos tratamentos. Para monitorar o pH e temperatura foram instalados sensores (Hanna, Gehaka) nas caixas elevadas correspondentes a cada um dos tratamentos (Figura 3). As informações dos sensores eram enviadas para equipamento Reef Angel (Controlador Open-Source), o qual registrava os valores médios de pH e temperatura obtidos em intervalos de 15 minutos.

A salinidade foi monitorada diariamente, realizando-se quatro medidas no mesmo horário, com auxílio do refratômetro portátil (REF211, Salinity/atc 0~100‰). A irradiância, fora da água nos tanques de experimentação, foi obtida por meio do sensor quântico do fluorímetro (Diving PAM, Underwater Fluorometer; Walz, Effeltrich, Germany) onde três medidas eram realizadas antes (08h) e depois (12h) das medidas da fluorescência da clorofila *a* que serão descritas nos próximos itens.

As medidas de nutrientes da água foram realizadas no 13º, 16º, 24º e 27º dias de experimentação, com auxílio do colorímetro (DR/890, HACH, Estados Unidos). Os reagentes utilizados para quantificação do nitrato e do fosfato foram o Nitra Ver® (HACK) e o Phos Ver® 3 (HACK), respectivamente.

Para auxiliar na análise dos dados, medidas de radiação solar e precipitação foram obtidas a partir de uma estação meteorológica localizada em Eunápolis (S16°17'26'' W39° 34' 47''). Os valores de precipitação eram obtidos a cada três horas. A radiação solar apresentou valores acumulados a cada três horas, com integração 1080 amostras obtidas em intervalos de 10 segundos (SINDA, 2013).

2.4 Análises fisiológicas

2.4.1 Atividade fotossintetizante a partir da fluorescência da clorofila *a*

A emissão de fluorescência da clorofila *a* das folhas foi avaliada com auxílio do fluorímetro de pulso com amplitude modulada (Diving PAM, Underwater Fluorometer; Walz, Effeltrich, Germany) equipado com uma fibra óptica de 5,5 mm de diâmetro e um díodo azul (470 nm) como fonte de luz.

Para obtenção das medidas de fluorescência da clorofila *a* foram aplicados pulsos de saturação e curvas de luz, usando as opções “SAT – Pulse” e “Rapid Light Curve” (RLC), pulsos de saturação e curvas de luz na região mediana das folhas de *Halodule wrightii*. Para aplicação dos pulsos, no período matutino, as plantas foram aclimatadas por 20 minutos de escuro, no mínimo. Pulsos de saturação também foram realizados à noite, 1 hora após escurecer (sem aclimatar ao escuro, pois as plantas já estavam no escuro por 1 hora). As curvas de luz foram obtidas com a aplicação de uma série de oito pulsos de luz saturante (LS), cada um deles seguidos de uma exposição de luz actínica (LA) crescente (2–2250 μmol de fótons $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ PAR), sem aclimação prévia ao escuro sempre no período matutino. As medidas foram realizadas uma vez por semana em diferentes intervalos de tempos. Três pulsos e três curvas eram realizados em cada réplica ($n=4$) tanto do controle quanto dos tratamentos.

Foram obtidos os seguintes valores de fluorescência emitidos pelas plantas em diferentes estados fisiológicos (Baker, 2008; Maxwell e Johnson, 2000): F_0 , F_0' (fluorescência mínima após aclimação ao escuro); F_m , F_m' (fluorescência máxima após aclimação as condições de escuro e claro, respectivamente); F_t (nível de fluorescência imediatamente antes do pulso saturante de luz, em condição de luz actínica). Tais medidas foram posteriormente utilizadas para calcular os parâmetros de dissipação fotoquímicos e não-fotoquímicos, conforme descrito a seguir:

- rendimento quântico máximo, refere-se ao potencial do fotossistema II, obtido logo após as condições de pré-aclimatação ao escuro, cuja fórmula é a seguinte (Genty *et al.*, 1989):

$$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$$

- rendimento quântico efetivo, refere-se eficiência do fotossistema II Y(II) quando a planta está aclimatada sob condições de luz, conforme fórmula (Genty *et al.*, 1989):

$$Y(II) = (F_m' - F_t)/F_m'$$

- dissipação regular de energia não-fotoquímica pelo fotossistema II Y(NPQ), refere-se a perda de energia controlada na forma de calor, segundo cálculo de Klughammer e Schreiber (2008):

$$Y(NPQ) = F_t/F_m' - (F_t/F_m)$$

- dissipação não-regular de energia não-fotoquímica pelo fotossistema II Y(NO), corresponde a soma da perda não-regular de energia na forma de calor e a emissão de fluorescência, dada pela equação de Klughammer e Schreiber (2008):

$$Y(NO) = F_t/F_m$$

- taxa de transporte de elétrons (ETR). Segundo Maxwell e Johnson (2000) mudanças relativas no transporte de elétrons podem utilmente monitorar a eficiência do PSII ou servir como um simples parâmetro para medidas de fluorescência, o ETR é obtido pela seguinte equação:

$$ETR = Y(II) \times PFDa \times 0,5$$

Onde PFDa é a luz absorvida pelas folhas da planta (μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que segundo Campbell *et al.* (2006) é 0,70, valor obtido em sua

pesquisa para uma espécie do mesmo gênero. O valor 0,5 corresponde ao fracionamento do total de clorofila *a* entre os PSI e PSII.

Os valores obtidos nos cálculos de ETR foram representados como curvas de ETR x irradiância. As curvas foram ajustadas de acordo com a fórmula de Platt *et al.* (1980), sendo:

$$ETR = ETR_s \cdot [1 - e^{(-\alpha \cdot I/ETR_s)}] \cdot [e^{(-\beta \cdot I/ETR_s)}]$$

Após a realização dos ajustes nas curvas (ETR x irradiância), outros parâmetros foram analisados, tais como ETR_{max} , o valor de α (expressa a eficiência fotossintetizante) e o valor de β (avalia possível regulação negativa do aparato fotossintetizante), por meio do cálculo seguinte (Platt *et al.*, 1980):

$$ETR_{max} = ETR_s \cdot \left\{ \frac{\alpha}{\alpha + \beta} \right\} \cdot \left\{ \frac{\beta}{\alpha + \beta} \right\}^{\beta/\alpha}$$

2.4.2 Determinação de clorofilas e carotenoides

Para determinação de clorofilas e carotenoides amostras de folhas de *Halodule wrightii* de cada réplica (n=4) do controle e tratamentos foram coletadas em três tempos durante o experimento: 1º dia, 15º dia e 30º dia. Aproximadamente 600 mg de amostras foram medidas em uma balança analítica (Bel Engineering, SERIE MARK /0,0001g - 0,1mg) e armazenadas em papel alumínio a -20 °C até serem analisadas. O transporte das amostras até o Laboratório de Anatomia Vegetal – LAVEG da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC ocorreu em gelo seco.

A extração e quantificação dos pigmentos fotossintéticos foram realizadas segundo Ritchie (2006, 2008). As amostras previamente medidas foram colocadas em eppendorfs e maceradas em nitrogênio líquido. Foi acrescentado em cada macerado 1 ml de acetona 90% equilibrada com de hidróxido de carbonato de magnésio (C₄Mg₄O₁₂) utilizado para anular qualquer acidez presente na acetona. As soluções foram centrifugadas por 20 minutos a 3.500 rpm e o sobrenadantes foram transferidos para outros eppendorfs com a adição de mais 2 ml de

acetona 90%. O procedimento foi realizado na ausência de luz e as amostras enquanto processadas foram mantidas em uma caixa térmica com gelo para a estabilização de qualquer processo celular ou reação dos pigmentos à luz.

As leituras de absorvância foram realizadas no espectrofotômetro (Biospectro, SP-220), em 510 nm, 647 nm, 664 nm e 750 nm. A quantificação de clorofilas a (Chl*a*), b (Chl*b*) e carotenoides foi realizada de acordo com as equações estabelecidas por Ritchie (2006, 2008). Os resultados foram expressos em µg/g de massa seca.

Equações:

$$\text{Chl-}a = 11,867 * (A_{664} - A_{750}) - 1,786 * (A_{647} - A_{750})$$

$$\text{Chl-}b = 18,978 * (A_{647} - A_{750}) - 4,895 * (A_{664} - A_{750})$$

$$\text{Carotenoides} = 10 * (A_{480} - A_{750})$$

2.4.3 Extração de açúcares e amido

Para determinação de açúcar e amido amostras foliares de *Halodule wrightii* de cada réplica (n=4), tanto do controle quanto dos tratamentos, foram coletadas em três tempos durante o experimento: 1º dia, 15º dia e 30º dia. Aproximadamente 100 mg de amostras foram medidas em uma balança analítica (Bel Engineering, SERIE MARK /0,0001g - 0,1mg) e armazenadas em pacotes de papel alumínio a -20 °C até serem analisadas. O transporte das amostras até o LAVEG ocorreu em gelo seco.

A preparação dos extratos foi realizada conforme Santos *et al.* (2010). Amostras previamente medidas foram maceradas em almofariz com 1 ml de água, permanecendo em repouso por 30 minutos. Em seguida, os macerados foram aquecidos em banho-maria a 40° C por 30 minutos, sendo transferidos para tubos Falcon, onde foram centrifugados por 20 minutos, a 4.000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para eppendorfs para determinação dos açúcares. Aos resíduos da centrifugação dos extratos brutos foram adicionados 1ml de ácido perclórico para solubilização do amido (Quarmby e Allen, 1989).

2.4.3.1 Determinação de Açúcares solúveis totais (AST)

A metodologia descrita por Yemm e Willis (1954) foi utilizada para determinar o teor de açúcares solúveis totais (AST). A partir dos sobrenadantes obtidos conforme descrito no item 2.4.3 foram retiradas alíquotas de 0,02 ml, sendo adicionados 0,98 ml de água destilada e 2 ml do reagente antrona em tubos de ensaio. A antrona foi preparada de acordo com Trevelyan e Harrison (1950) (0,2 g de antrona, 5 ml de água destilada e 100 ml de ácido sulfúrico concentrado) com modificações. As soluções foram agitadas em vórtex e aquecidas em banho-maria a 90° C por 7 minutos. Posteriormente, foram realizadas as leituras das amostras a 630 nm em leitor de microplacas (TP-READER/THERMO-PLATE). A quantificação dos açúcares solúveis totais foi feita a partir da curva padrão de glucose (0,5 a 8 mg. mL⁻¹ - r²= 0,9964; y = 0,2316x +

0,0343). Os resultados foram expressos em mg de glucose por g de massa seca.

2.4.3.2 Determinação do amido

A determinação do teor de amido foi realizada de acordo com Yemm e Willis (1954). As soluções foram preparadas a partir dos resíduos dos extratos brutos, conforme item 2.4.3, e permaneceram em repouso por 1 hora. Posteriormente, foram centrifugadas e os sobrenadantes foram transferidos para eppendorfs. Em tubos de ensaios foram adicionadas alíquotas de 0,02 ml do sobrenadante, 0,98 ml de água destilada e 2 ml do reagente antrona. As soluções foram agitadas em vórtex e aquecidas em banho-maria a 90°C por 5 minutos. Após, foram realizadas leituras de absorbância em 630 nm no leitor de microplacas (TP-READER/THERMO-PLATE). A quantificação do teor de amido foi feita a partir da curva padrão de glucose (0,5 a 4 mg. mL⁻¹- $r^2= 0,9986$; $y = 0,2428x + 0,0073$). Os resultados foram expressos em mg de glucose por g de massa seca.

2.5 Análises estruturais e ultraestruturais

2.5.1 Microscopia Óptica (MO): anatomia, testes histoquímicos e análises quantitativas

Para Microscopia Óptica foram coletadas folhas de *Halodule wrightii* (n=4) de cada tratamento de pH no 1º dia, 15º dia e 30º dia. As folhas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% e em tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,2, por 24 horas (O'Brian e Feder, 1964). Em seguida, foram lavadas 3 vezes no mesmo tampão, desidratadas em solução crescente de álcool etílico e mantidas em álcool etílico 70° GL até o momento das análises. Posteriormente, amostras das folhas seguiram para desidratação e infiltração em hidroxietilmetacrilato (Historesina Leica), conforme normas do fabricante. As secções transversais foram realizadas com espessura de 5 µm em micrótomo (Leica, RM 2125 RT) do Laboratório de Anatomia Vegetal UFSC. As secções foram colocadas em lâminas de vidro e secas em temperatura ambiente.

Os testes histoquímicos foram realizados utilizando os seguintes reagentes: a) Azul de toluidina 0,05% (ATO), para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia (O'Brien *et al.*, 1964); b) Ácido periódico de Schiff (PAS), usado para identificar a presença de polissacarídeos neutros (Gahan, 1984); c) Azul Brillhante de Coomassie (CBB), usado para visualizar as proteínas totais da célula (Gahan, 1984).

Para as análises quantitativas foram utilizadas lâminas com secções transversais das folhas de *Halodule wrightii*, coradas com ATO. Foram mensuradas a espessura e largura totais da folha, altura da célula epidérmica e espessura do mesofilo, utilizando o microscópio Leica DM2500 com auxílio do *software* LAS 3.7 do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina. Com o auxílio do programa ImageJ 1,47 (National Institutes of Health, USA) foi estimada a área da folha em secção transversal e a área proporcional de aerênquima.

2.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram retiradas amostras de 5 mm das folhas de *Halodule wrightii* em todas as réplicas tanto do controle quanto dos tratamentos no 30 ° dia do experimento. O material foi fixado em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2, por 24 horas. Após esta etapa as amostras foram lavadas quatro vezes no mesmo tampão. Após as lavagens, os materiais foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, durante 4 horas à temperatura ambiente (Bozzola e Russel, 1991). Posteriormente, o material foi lavado três vezes, no mesmo tampão e em seguida em água destilada (30 minutos). Em seguida as amostras foram desidratadas em uma série de soluções crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), em intervalos de 30 minutos para cada etapa; sendo a solução de acetona 100% trocada duas vezes. Após a desidratação, o material foi infiltrado em resina Spurr (Spurr 1969). Após o período de 12 horas da última infiltração, o material foi colocado em moldes horizontais, que por sua vez foram levados à estufa a 70° C para polimerização por 24 h. As secções ultrafinas foram realizadas com ultramicrótomo (Leica EM UC7, Alemanha) acoplado com navalha de diamante. As grades com as secções foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo de acordo com os procedimentos de Reynolds (1963). As amostras processadas foram observadas e fotografadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), marca Jeol, modelo JEM- 1011, do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica - UFSC.

2.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram avaliados quanto à homogeneidade de variâncias pelo teste de Cochran. Uma vez avaliados, os mesmos foram submetidos à análise de variância ANOVA para experimento bifatorial (F-teste 5% de significância). Quando necessário um teste *a posteriori* (Newman Keuls) foi realizado para separação de médias, com um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Além disso, alguns dados foram submetidos a testes de correlação de Pearson. Todas as análises foram realizadas com auxílio dos programas Microsoft Excel e Statistica 8,0.

3. RESULTADOS

3.1 Parâmetros ambientais

Os dados de pH, temperatura, irradiância, nutrientes, radiação solar e precipitação obtidos no controle e em todos os tratamentos durante a realização do experimento estão plotados nas Figuras 4, 5, 6 e 7.

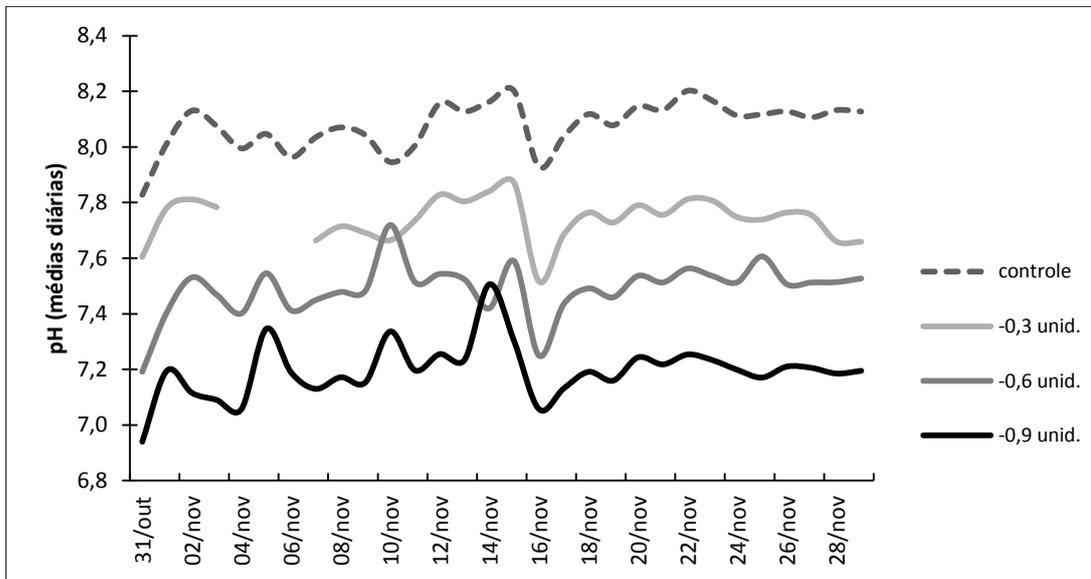


Figura 4. Médias diárias do pH do controle e tratamentos ao longo do período experimental de um mês, entre 31 de outubro e 30 de novembro. As médias foram obtidas a partir de aproximadamente oitenta valores ($n=80$), medidos nas caixas elevadas. A lacuna de dados no tratamento -0,3 ocorreu em função de falhas do sensor de pH.

As oscilações do pH acompanharam o controle, exceto por pequenos desvios ocasionados em curtos períodos quando eram realizadas a limpeza e calibração dos sensores. As reduções no pH dos tratamentos -0,3, -0,6 e -0,9 com respeito à condição controle foram de $0,34\pm 0,24$, $0,59\pm 0,29$ e $0,87\pm 0,36$ unidades, respectivamente (Figura 4).

As medidas de temperatura foram semelhantes entre os tratamentos (Figura 5). As mesmas variaram entre $23,60\pm 0,10^{\circ}\text{C}$ e $27,12\pm 0,29^{\circ}\text{C}$, média geral de $25,12\pm 0,77^{\circ}\text{C}$.

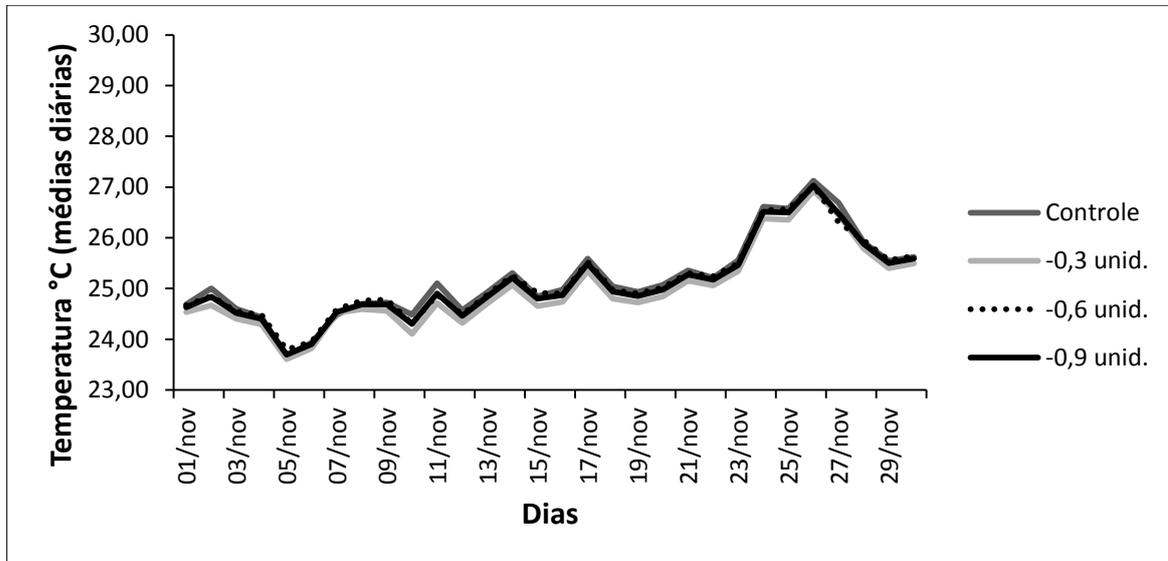


Figura 5. Médias diárias de temperaturas (T°C) obtidas nas caixas elevadas onde foram estabelecidas as quatro condições experimentais (três tratamentos e um controle) ao longo do período experimental de um mês. As médias foram obtidas a partir de aproximadamente oitenta valores (n=80).

As medidas de irradiância foram baixas após aproximadamente 200, 400 e 500 horas de experimento (Figura 6A). Estes períodos coincidiram com dias de chuva que ocorreram na metade do mês de novembro. Os valores de irradiância variaram entre $145,67 \pm 6,02 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $830,00 \pm 26,45 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

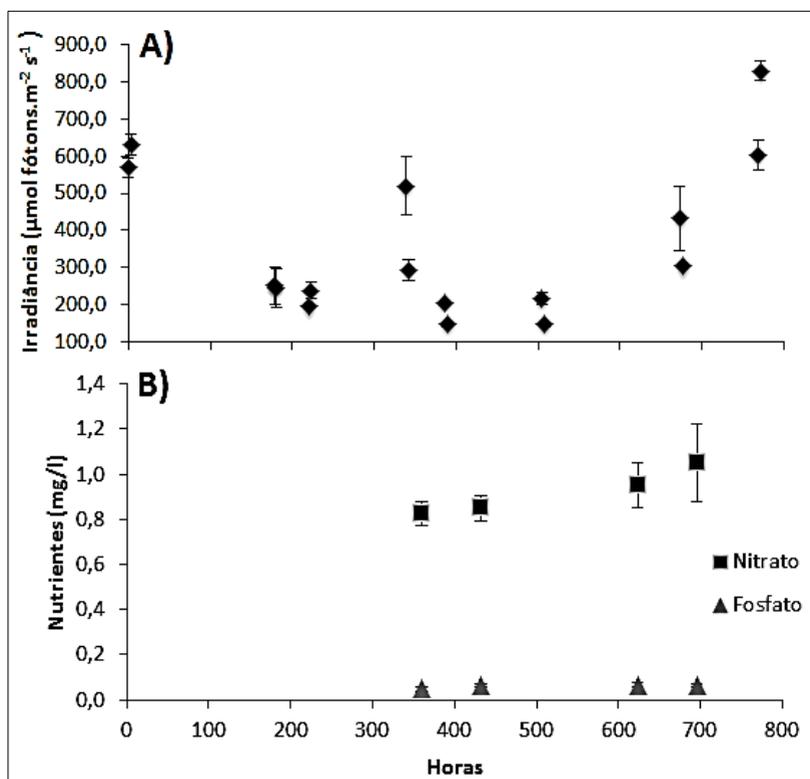


Figura 6. Valores de irradiância ($\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e total de nutrientes medidos na \u00e1gua utilizada para o experimento no sistema de mesocosmos marinho. (A) irradi\u00e2ncias, m\u00e9dias calculadas a partir de tr\u00eas valores de irradi\u00e2ncia obtidos em diferentes hor\u00e1rios ($n=3$). (B) nutrientes (mg/l), m\u00e9dias de nitrato e fosfato obtidas a partir de quatro medidas realizadas no controle e tratamentos ($n=4$).

Com rela\u00e7\u00e3o aos nutrientes, os n\u00edveis de fosfato praticamente n\u00e3o variaram, apresentando valor m\u00e9dio de $0,06 \pm 0,0 \text{ mg/l}$. O nitrato

aumentou levemente no final do experimento, variando entre $0,83\pm 0,05$ e $1,05\pm 0,17$ (Figura 6B).

Para contribuir com as análises, informações adicionais sobre a precipitação e radiação solar foram obtidas na estação meteorológica de Eunápolis (S16°17'26'' W39° 34' 47''), localizada próximo à estação de pesquisa. Os dados referentes ao mês de novembro (período do experimento) estão plotados nas Figuras 7A-B.

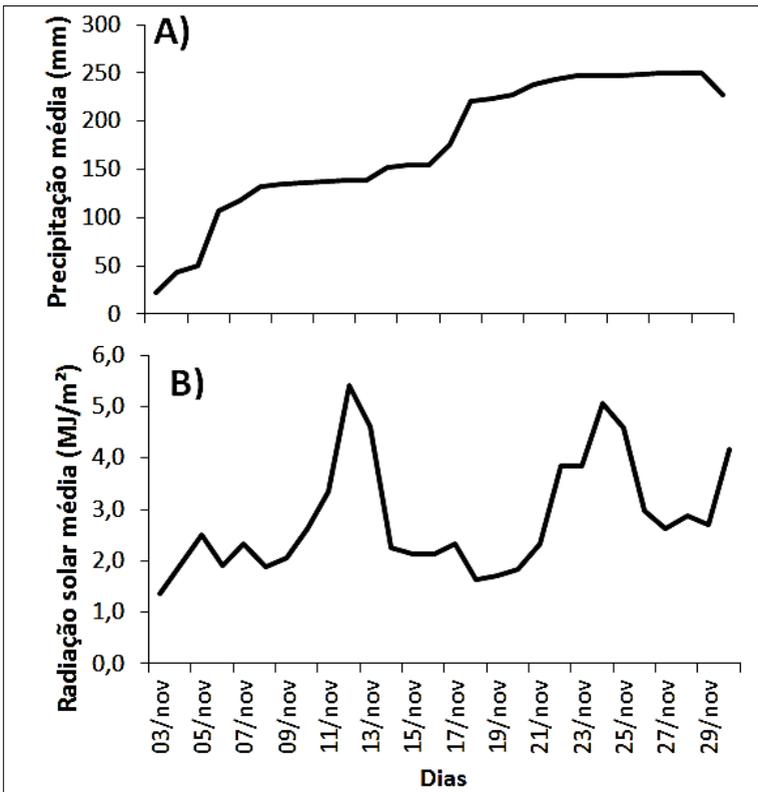


Figura 7. (A) Precipitação média (mm) em Eunápolis, localidade próxima de Arraial d’Ajuda, onde estava instalado o sistema de mesocosmos marinho. Os valores diários foram obtidos a cada três horas. O gráfico apresenta médias diárias. (B) Radiação solar (MJ/m^2) valores acumulados a cada três horas, com integração 1080 amostras obtidas em intervalos de 10 segundos. Fonte: SINDA (2013).

Observa-se que a precipitação diária foi crescente durante todo o mês. A radiação solar apresentou dois picos nítidos. O primeiro foi registrado entre os dias 09 e 14 do mês de novembro e o segundo entre os dias 20 e 26 do mesmo mês.

A salinidade praticamente não variou. No final do experimento todos os tanques de ensaio apresentaram um leve aumento (controle e tratamentos). A menor salinidade registrada foi 34 e a maior foi de 39,5, com valor médio de $35,5 \pm 1,17$.

3.2 Análises fisiológicas

As variáveis fisiológicas avaliadas a partir das folhas de *Halodule wrightii* ao longo do tempo do experimento (30 dias) são apresentadas na Tabela 1 por meio dos valores da análise de variância – ANOVA.

Tabela 1: Resultados das ANOVAs bifatoriais para cada variável dependente, em função das variáveis independentes tempo e tratamento de pH. Os dados foram obtidos para *Halodule wrightii* em diferentes tempos ao logo de 30 dias de experimento. Os efeitos significativos são apresentados pelos valores de F e p ($\leq 0,05$) em negrito. gl. Graus de liberdade. F_v/F_m = rendimento quântico máximo, YII = fotossíntese efetiva, Y(NO) = dissipação não-regular de energia não-fotoquímica, Y (NPQ) = dissipação regular de energia não-fotoquímica, α_{ETR} = eficiência fotossintética, β_{ETR} = regulação negativa do aparato fotossintético, ETR_{max} = taxa máxima de transporte de elétrons, I_k = irradiância de saturação, Chla = clorofila a, Chlb = clorofila b, Chlb/Chla = razão clorofila a e b.

Parâmetros	Tempo			pH			Tempo*pH		
	gl	F	p	gl	F	p	gl	F	p
F_v/F_m	4	9,54	0,00	3	0,37	0,78	12	0,82	0,63
YII	4	18,10	0,00	3	3,74	0,02	12	0,61	0,83
Y(NO)	4	22,17	0,00	3	2,26	0,09	12	1,42	0,18
Y (NPQ)	4	28,12	0,00	3	1,43	0,24	12	0,81	0,64
α_{ETR}	4	14,20	0,00	3	2,72	0,05	12	1,09	0,39
β_{ETR}	4	47,99	0,00	3	0,81	0,50	12	0,85	0,60
ETR_{max}	4	43,40	0,00	3	2,11	0,11	12	0,67	0,77

Parâmetros	Tempo			pH			Tempo*pH		
	gl	F	p	gl	F	p	gl	F	p
Ik	4	41,09	0,00	3	0,59	0,63	12	0,92	0,53
Chla	2	51,58	0,00	3	0,88	0,46	6	2,09	0,08
Chlb	2	151,53	0,00	3	0,51	0,68	6	1,20	0,33
Carotenoides	2	116,33	0,00	3	0,11	0,95	6	1,88	0,11
Chlb/Chla	2	200,46	0,00	3	5,64	0,00	6	4,11	0,00
Açúcar	2	6,87	0,00	3	4,10	0,01	6	0,33	0,92
Amido	2	4,07	0,03	3	1,07	0,38	6	1,29	0,29

Todos os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* variaram significativamente durante o período de experimentação. Respostas em função dos tratamentos de pH foram obtidas através dos valores do rendimento quântico efetivo (YII), da razão clorofila *b* e *a* (Chlb/Chla) e dos níveis de açúcar (Tabela 1).

A regulação negativa do aparato fotossintético (β_{ETR}) foi maior no 7° e no 21° dia de experimentação. Nos mesmos períodos foram observadas menores taxas de transporte máximo de elétrons ETR_{max} e menor irradiância requerida para saturação (I_k) do aparato fotossintético. A eficiência fotossintética (α_{ETR}) quase não variou, apresentando o tratamento -0,9 praticamente constante. Entretanto, os demais tratamentos juntamente com o controle mostraram redução no 7° dia (Figuras 8 e 9).

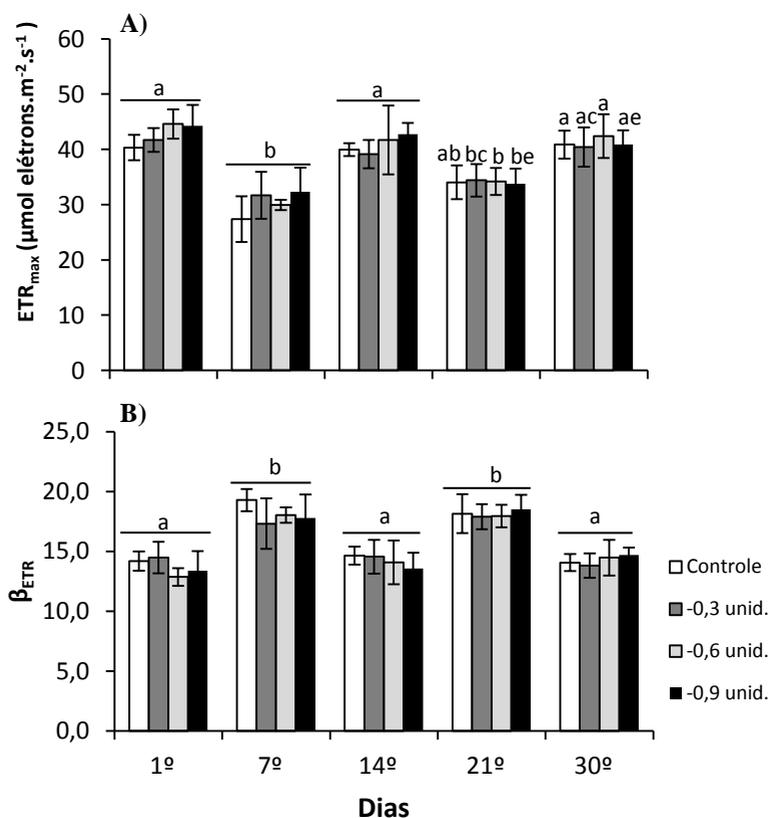


Figura 8. Parâmetros fotossintetizantes de *Halodule wrightii* cultivada em sistema de mesocosmos marinho sob condições de simulação do incremento de CO₂ na água, evidenciado pelo decréscimo dos valores de pH. (A) taxa máxima de transporte de elétrons (ETR_{max}) e (B) regulação negativa do aparato fotossintético (β_{ETR}). As letras indicam diferenças significativas, com nível de significância de 5% (p<0,05) dado pelo teste *a posteriori* Newman Keuls. N=4.

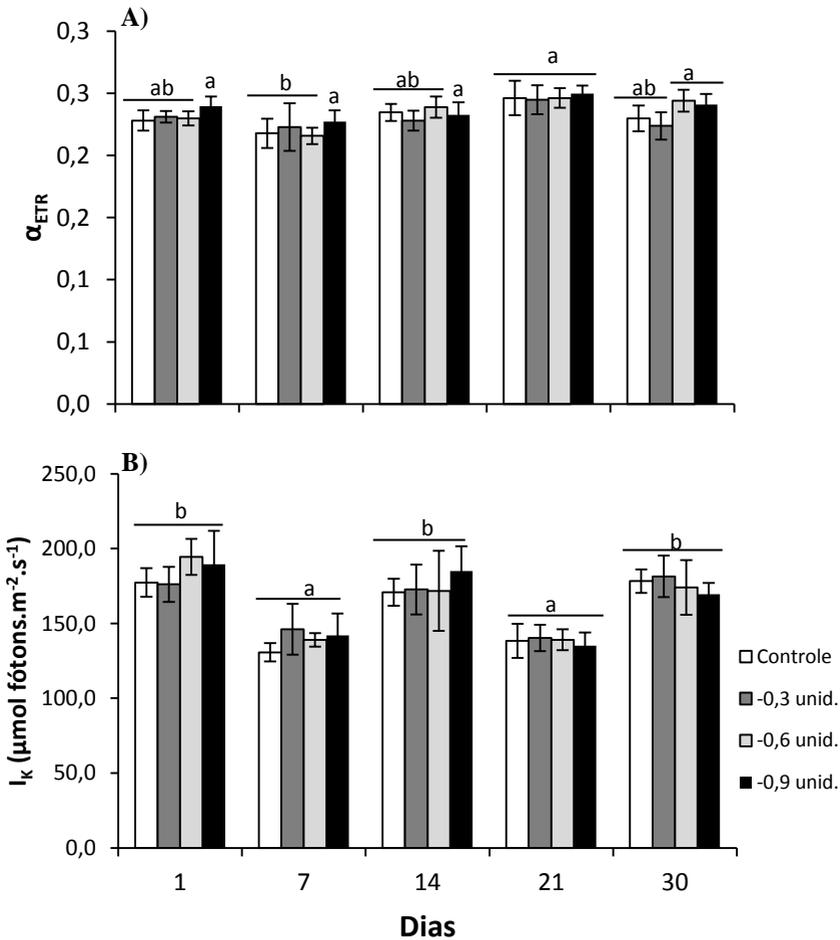


Figura 9. Parâmetros fotossintetizantes de *Halodule wrightii* cultivada em sistema de mesocosmos marinho sob condições de simulação do incremento de CO₂ na água, evidenciado pelo decréscimo dos valores de pH, (A) eficiência fotossintética (α_{ETR}) e (B) irradiância de saturação (I_k) para controle e tratamentos -0,3, -0,6 e -0,9 de pH. As letras indicam diferenças significativas, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) dado pelo teste *a posteriori* Newman Keuls. N=4.

A Figura 10 apresenta o perfil das curvas de fotossíntese obtidas por meio dos cálculos das taxas de transporte de elétrons (ETR) para distintos valores de irradiâncias. A partir dessas foi possível calcular os parâmetros da fotossíntese ETR_{max} , β_{ETR} , α_{ETR} e I_k , já apresentados anteriormente. As curvas foram construídas e ajustadas com base nos dados obtidos nos diferentes períodos do experimento no controle e nos tratamentos de pH. As mesmas praticamente não variaram em função do tempo, demonstrando grande similaridade e quase sobreposição dos diferentes tratamentos e controle no 21º e 30º dia de experimento.

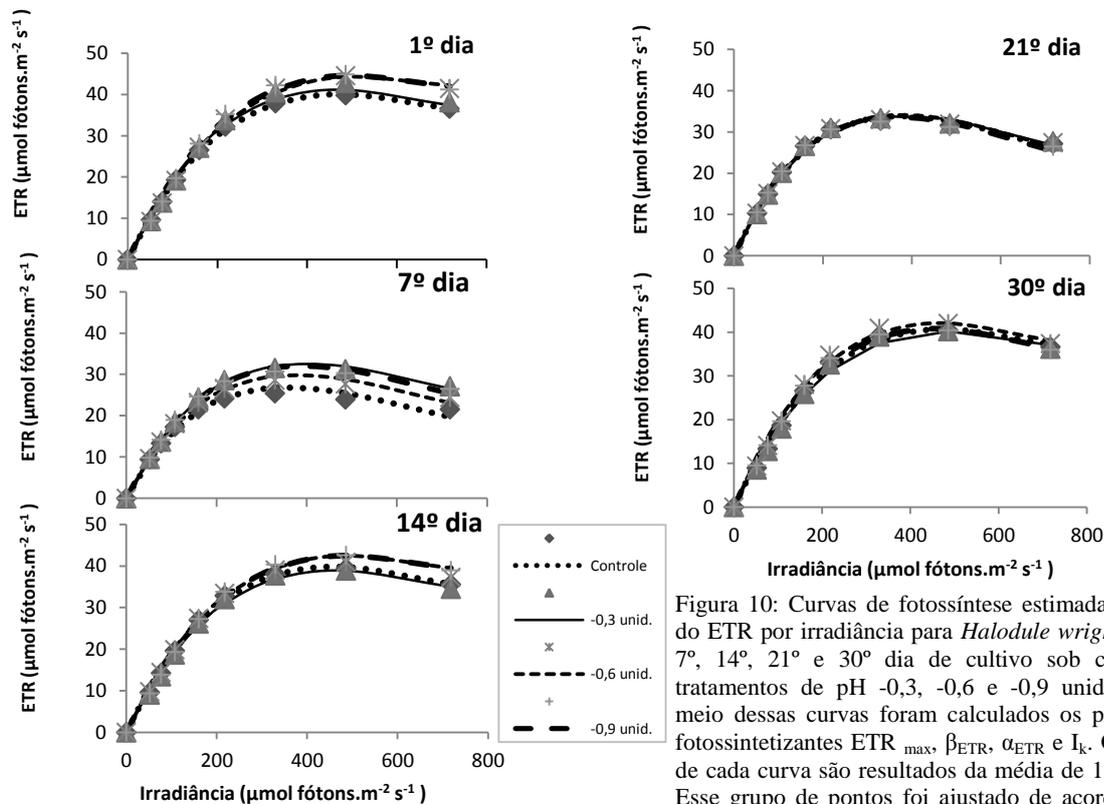


Figura 10: Curvas de fotossíntese estimadas a partir do ETR por irradiância para *Halodule wrightii* no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de cultivo sob controle e tratamentos de pH -0,3, -0,6 e -0,9 unidades. Por meio dessas curvas foram calculados os parâmetros fotossintetizantes ETR_{max} , β_{ETR} , α_{ETR} e I_k . Os pontos de cada curva são resultados da média de 12 valores. Esse grupo de pontos foi ajustado de acordo com a fórmula de Platt *et al.*, 1980.

A fotossíntese efetiva $Y(II)$ diminuiu significativamente no controle e no tratamento -0,3 no 26º e no 30º dia do experimento, respectivamente. Houve também decréscimo significativo da dissipação não-regular de energia não-fotoquímica $Y(NO)$ durante o período, principalmente após 25 dias tanto no controle quanto nos tratamentos. Esta queda foi acompanhada por aumento da dissipação regular de energia não-fotoquímica $Y(NPQ)$. Não houve mudanças significativas no tratamento -0,6. Já o tratamento -0,9 aumentou a $Y(II)$ no 19º dia, apresentando no mesmo período leve queda no $Y(NPQ)$ em comparação com os períodos finais do experimento (Figura 11).

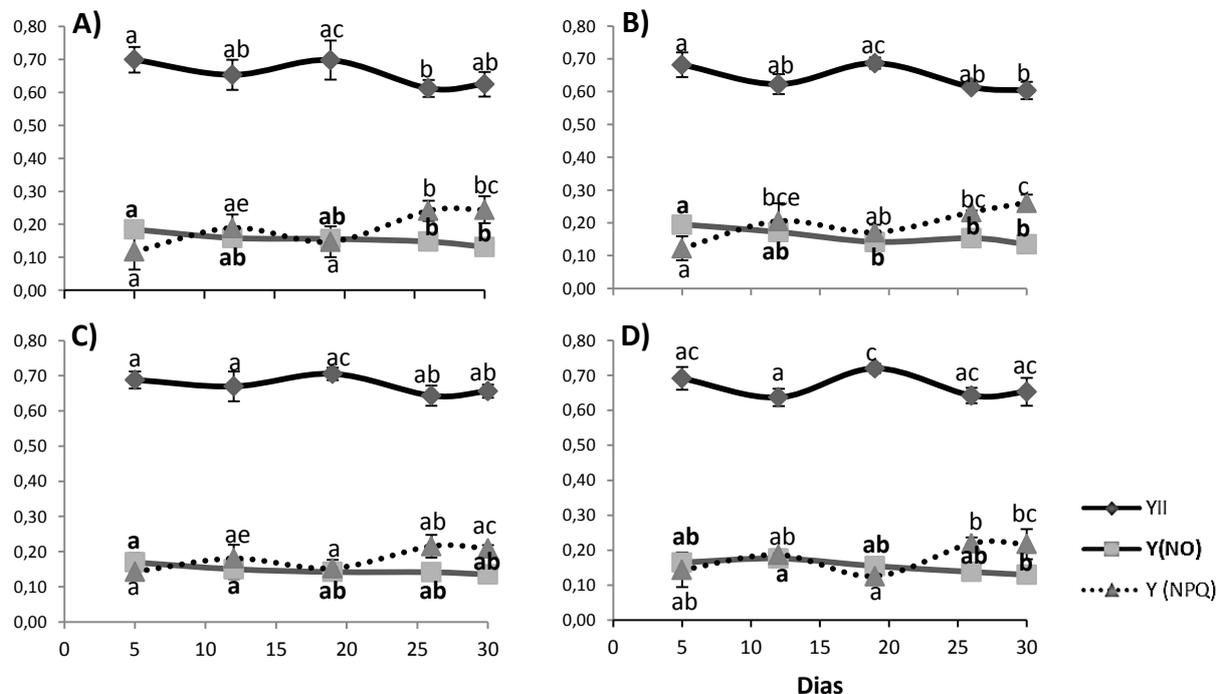
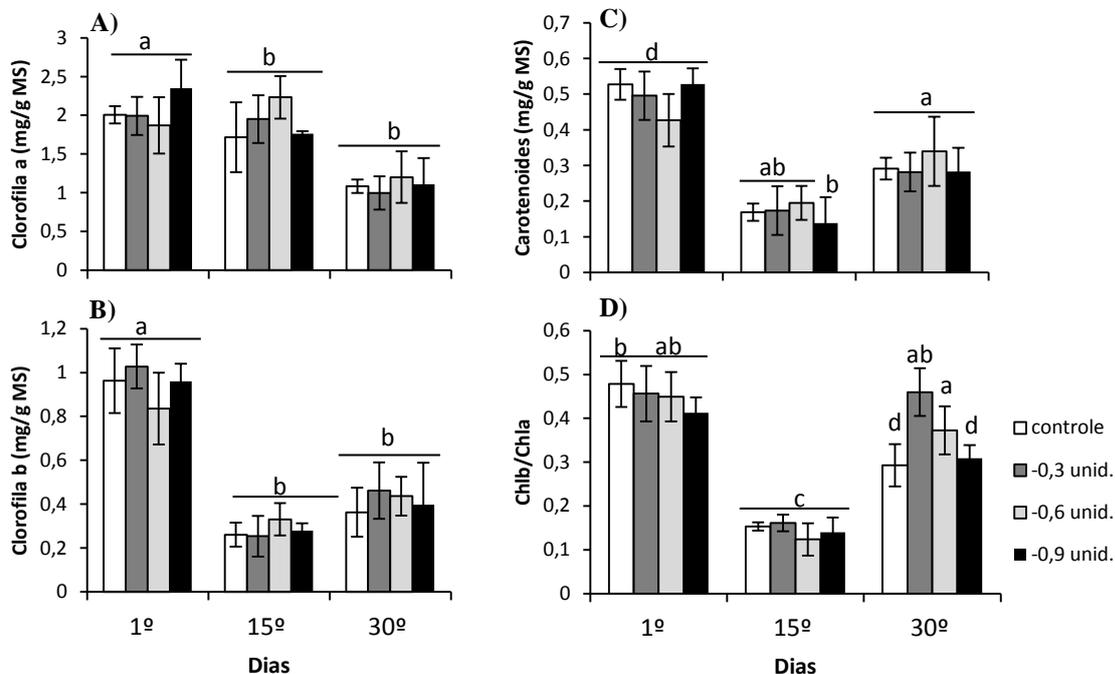


Figura 11. Dissipação da energia da fotossíntese de *Halodule wrightii* submetida a quatro condições com concentrações distintas de CO₂ durante o período experimental de um mês. (A) Controle, (B) tratamento -0,3, (C) Tratamento -0,6, (D) Tratamento -0,9 apresentando os parâmetros rendimento quântico efetivo (YII), dissipação não-regular Y(NO) e regular Y(NPQ) de energia não-fotoquímica. As letras indicam diferenças significativas, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) dado pelo teste *a posteriori* Newman Keuls N=4.

Houve perda significativa de clorofila *a* (Chl*a*), clorofila *b* (Chl*b*) e carotenoides por miligrama de massa seca no período final do experimento para controle e tratamentos. A razão clorofila *b* e *a* (Chl*b*/Chl*a*) foi diferente entre os tratamentos no 30º dia, apresentando valores menores para o controle e o tratamento -0,9 em comparação com demais (Figura 12).



O teor de amido variou em resposta ao tempo de experimentação pela ANOVA, entretanto quanto aplicado o teste de separação de médias (Newman Keuls) não foram detectadas variações significativas. Desta forma, entende-se que os níveis de amido foram praticamente constantes. A quantidade de açúcar por grama de massa seca variou levemente, não houve diferenças entre o controle e os tratamentos nos períodos analisados (Figura 13).

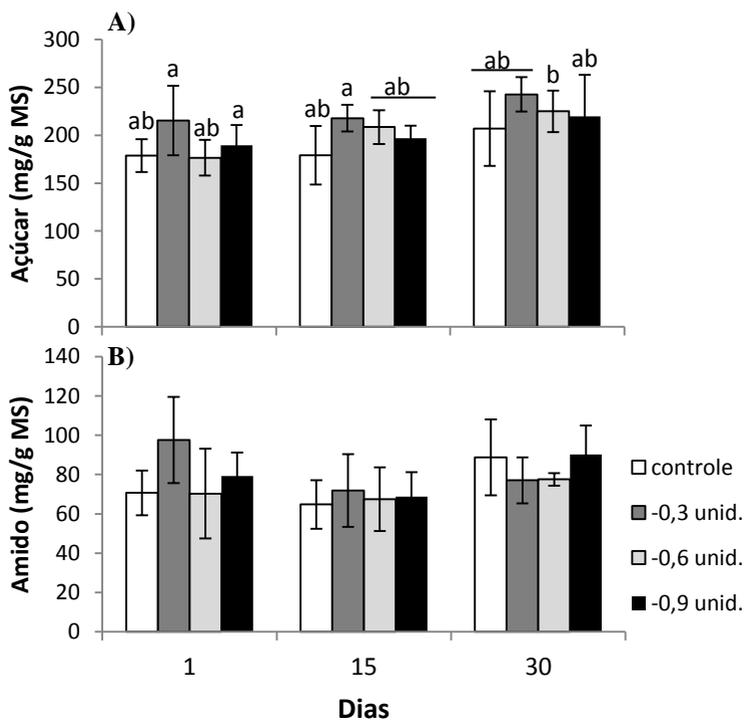


Figura 13. Teor de açúcar e amido por grama de Massa Seca (MS) de *Halodule wrightii* submetida a diferentes tratamentos de incremento de CO₂ representados pela manutenção (controle) e redução de pH em -0,3, -0,6 e -0,9 unidades de pH ao longo do experimento. (A) teor de açúcares. (B) teor de amido. As letras indicam diferenças significativas, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) dado pelo teste *a posteriori* Newman Keuls. N=4.

As variáveis dependentes avaliadas durante o experimento apresentaram correlações, principalmente entre os parâmetros fotossintetizantes, conforme Tabela 2. Houve correlação negativa entre β_{ETR} , α_{ETR} e os pigmentos *Chl**b* e carotenoides. Estes últimos se relacionaram positivamente com ETR_{max} e I_k . As correlações apresentadas podem ser esperadas, uma vez que a redução dos pigmentos acessórios pode levar a regulação negativa do aparato fotossintético e a consequente queda na fotossíntese. Assim como, aumento dos pigmentos pode proporcionar maior taxa de transporte de elétrons e acréscimo na irradiância necessária para saturação.

3.3 Microscopia Óptica (MO): anatomia, testes histoquímicos e análises quantitativas

A lâmina foliar de *Halodule wrightii*, em secção transversal, apresenta formato oval, sem alteração entre os tratamentos (Figura 14). A epiderme é unisseriada com ausência de estômatos, o mesofilo é homogêneo com células parenquimáticas de paredes finas e formato arredondado, as quais delimitam espaços intercelulares conspícuos (Figuras 14-15). O sistema vascular está constituído por três feixes vasculares, um central de maior calibre e dois menores, localizados nas proximidades dos bordos foliares (Figura 14A). O feixe vascular de maior calibre é do tipo colateral, formado por uma lacuna de protoxilema, poucos elementos de tubo crivado e células parenquimáticas, envolto por duas bainhas de células parenquimáticas (Figura 15).

Os testes histoquímicos realizados com Azul de toluidina (ATO), Azul Brillhante de Coomassie (CBB) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) demonstraram reações com os tecidos da lâmina foliar de *H. wrightii*. As paredes das células epidérmicas de ambas as faces, do mesofilo e feixe vascular reagiram fortemente ao ATO e ao PAS indicando a presença de polissacarídeos ácidos e neutros respectivamente (Figuras 15-16). Chama-se a atenção à ausência de reação, nessas paredes, com o CBB, indicando ausência de proteínas (Figura 16).

O conteúdo das células epidérmicas reagiu fortemente ao ATO ao PAS e ao CBB (Figuras 15-16), evidenciando grande concentração de polissacarídeos ácidos, neutros e proteínas nesta região. Já no mesofilo não houve esta reação (Figuras 14-15). O CBB também revelou a presença de poucas organelas citoplasmáticas nas células mesofilo (Figuras 14-15), sendo encontradas em maior quantidade no feixe vascular central (Figura 15). O PAS também reagiu com elementos do floema, evidenciando os elementos de tubo crivados (Figuras 15 A, E e I). As Figuras 15 e 16 demonstram com detalhe a comparação entre o controle e os tratamentos de pH sob a ação de diferentes testes histoquímicos. Qualitativamente não é possível observar variações estruturais ou químicas entre os tratamentos.

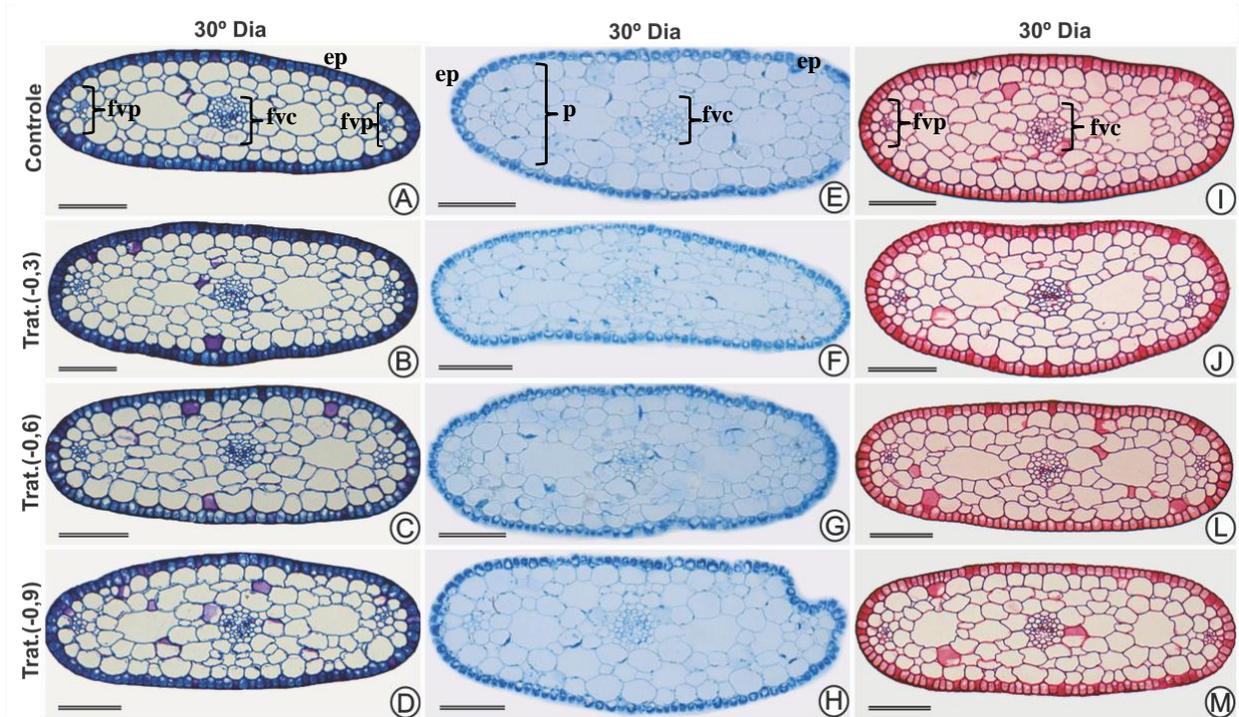


Figura 14. Fotomicrografias de seções transversais da lâmina foliar de *Halodule wrightii*. Testes histoquímicos, reagentes: Azul de Toluidina (ATO) (A-D), Azul Brilhante de Coomassie (CBB) (E-H) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) (I-M). Comparação do controle e dos tratamentos (-0,3), (-0,6) e (-0,9). fvp=feixe vascular periférico, fvc=feixe vascular central, ep=epiderme. **Escala = 100µm**

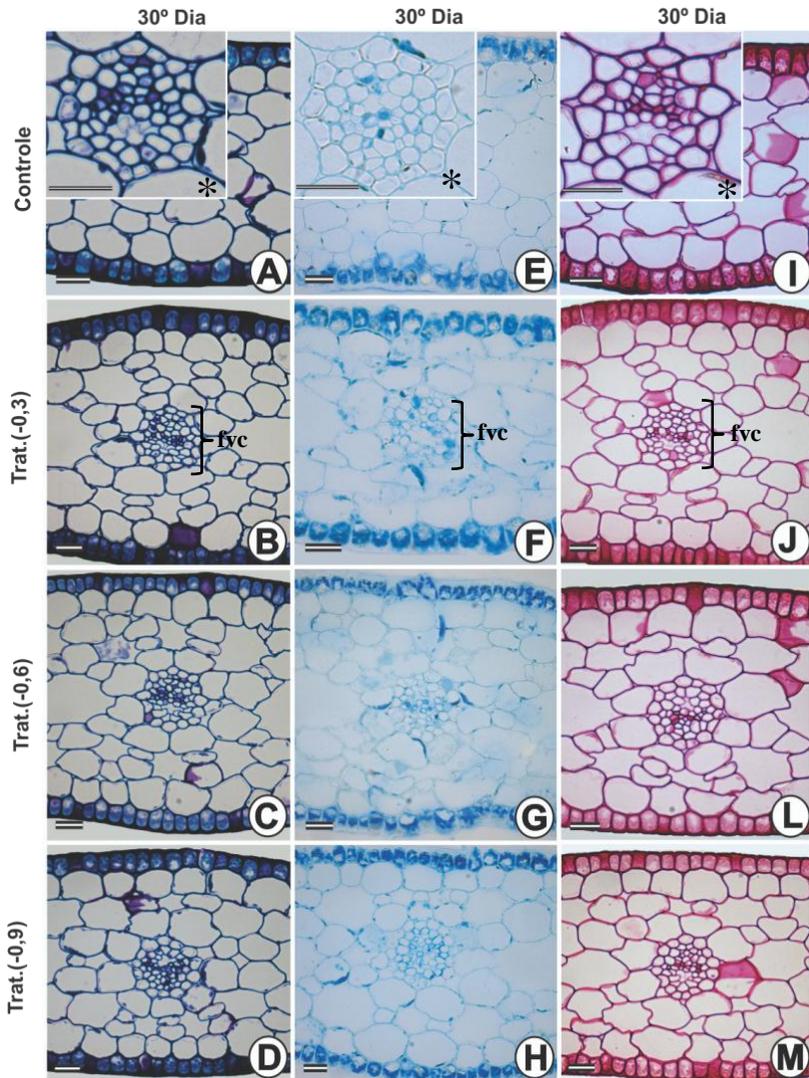


Figura 15. Fotomicrografias de secções transversais da lâmina foliar de *Halodule wrightii*. Testes histoquímicos, reagentes: Azul de Toluidina (ATO) (A-D), Azul Brillhante de Coomassie (CBB) (E-H) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) (I-M). Comparação do controle e dos tratamentos (-0,3), (-0,6) e (-0,9). Detalhes do feixe vascular central (*). fvc=feixe vascular central, ep=epiderme. Escala = 25µm

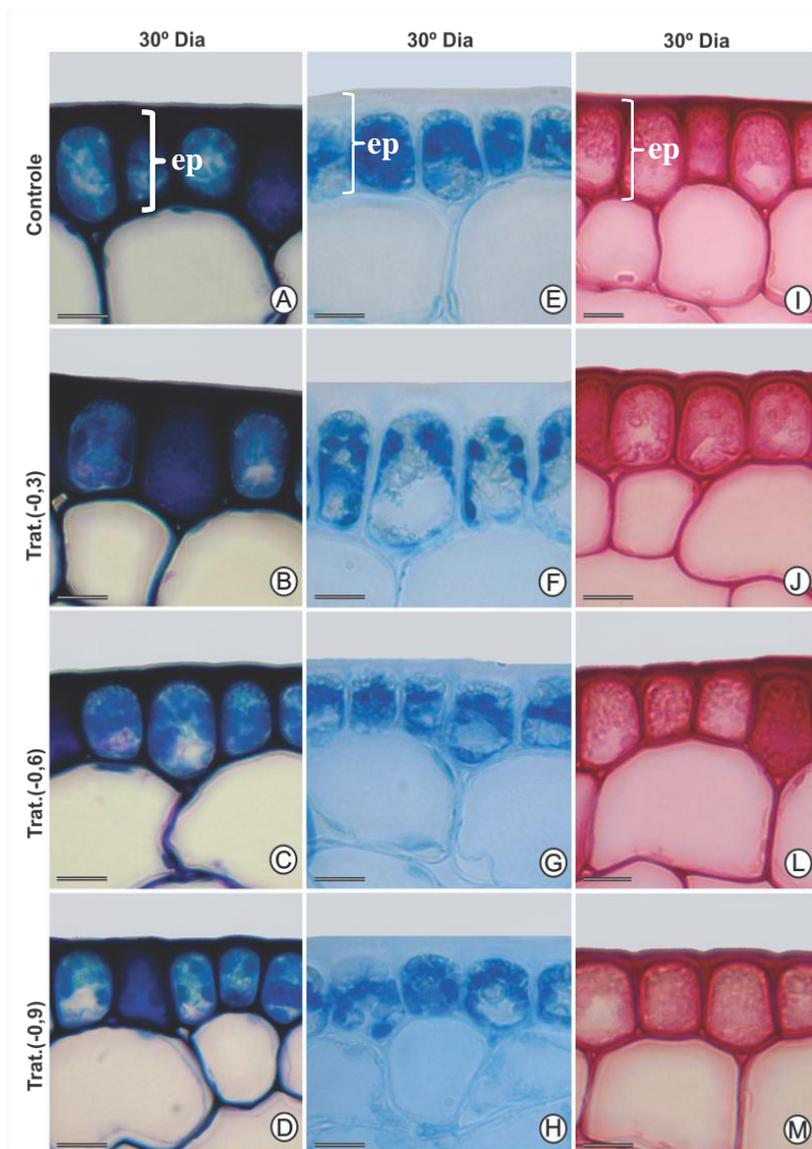


Figura 16. Fotomicrografias de secções transversais das epidermes da folha de *Halodule wrightii*. Testes histoquímicos, reagentes: Azul de Toluidina (ATO) (A-D), Azul Brillhante de Coomassie (CBB) (E-H) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) (I-M). Comparação do controle e dos tratamentos (-0,3), (-0,6) e (-0,9). ep=epiderme. **Escala = 10µm**

Os parâmetros quantitativos obtidos a partir da folha de *Halodule wrightii* são apresentados na Tabela 3 por meio dos resultados da ANOVA bifatorial. As medidas realizadas variaram significativamente durante o tempo de experimentação, mas não foram diferentes entre controle e tratamentos, exceto a área em secção transversal e a largura da folha. Estes parâmetros juntamente com as lacunas de aerênquima responderam também a variável tempo x tratamento.

Tabela 3: Resultados das análises bifatoriais ANOVA para cada variável dependente, em função das variáveis independentes tempo e tratamento de pH. Os parâmetros foliares de *Halodule wrightii* foram obtidos a partir do material coletado no 1º, 15º e 30º do experimento. Os efeitos significativos são apresentados pelos valores de *F* e *p* ($\leq 0,05$) em negrito. Graus de liberdade (gl).

Parâmetros foliares	Tempo			pH			Tempo*pH		
	gl	<i>F</i>	<i>p</i>	gl	<i>F</i>	<i>p</i>	gl	<i>F</i>	<i>p</i>
Largura (μm)	2	38,02	0,00	3	3,40	0,03	6	2,49	0,04
Espessura (μm)	2	27,40	0,00	3	2,59	0,07	6	2,23	0,06
Espessura mesofilo (μm)	2	25,71	0,00	3	1,82	0,16	6	1,87	0,11
Espessura epiderme (μm)	2	5,90	0,01	3	1,58	0,21	6	1,84	0,12
Área secção transversal (mm^2)	2	34,72	0,00	3	2,91	0,05	6	2,92	0,02
Lacunas de aerênquima (%)	2	31,65	0,00	3	1,89	0,15	6	2,84	0,02

A largura foliar foi maior no tratamento -0,9 no 30º dia do experimento. As espessuras da folha e do mesofilo foram menores no tratamento -0,3 durante o período de experimentação. A espessura da epiderme não apresentou diferenças pelo teste de separação de médias, mas foi significativo com relação a variável tempo no teste da ANOVA (Figura 17).

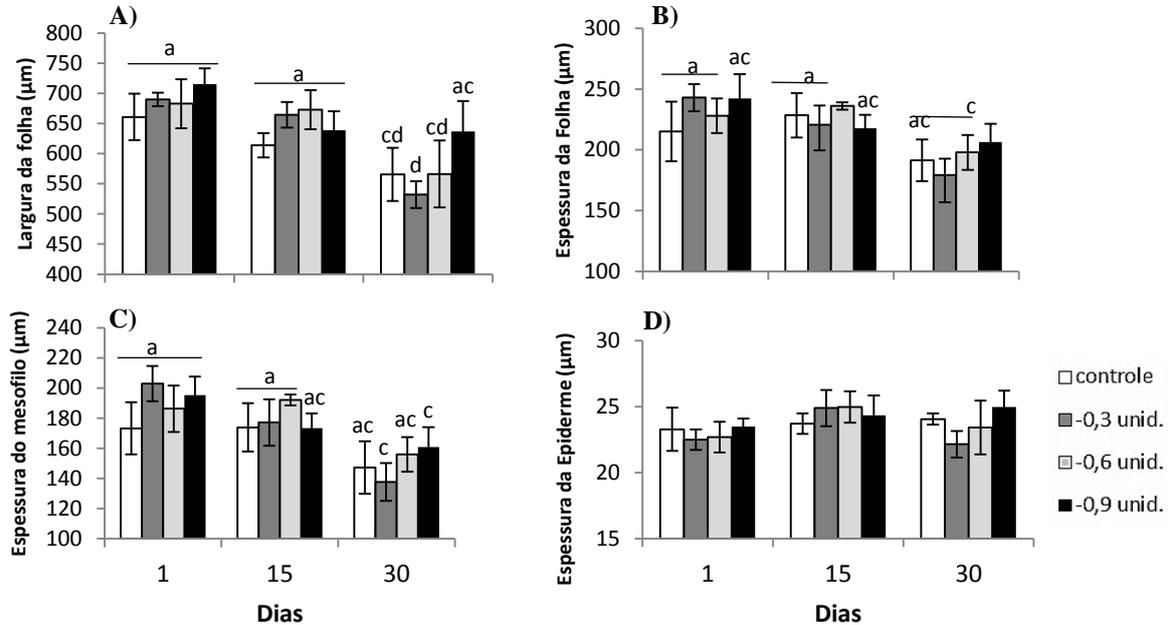


Figura 17. Parâmetros (A) largura, (B) espessura mesofilo, (C) espessura da folha, (D) espessura da epiderme, obtidos a partir das medidas da lâmina foliar de *Halodule wrightii* no 1º, 15º e 30º dia do experimento no controle e nos tratamentos -0,3, -0,6 e -0,9 de pH. As letras indicam diferenças significativas, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) dado pelo teste *a posteriori* Newman Keuls. N=4.

A área foliar em secção transversal e a área proporcional das lacunas do aerênquima diminuíram significativamente no tempo final comparando com o tempo inicial do experimento, tanto para o controle quanto para os tratamentos de pH. Observa-se ainda que a área das folhas em secção transversal foi maior no tratamento -0,9 em comparação com o -0,3 no 30º dia de experimentação (Figura 18).

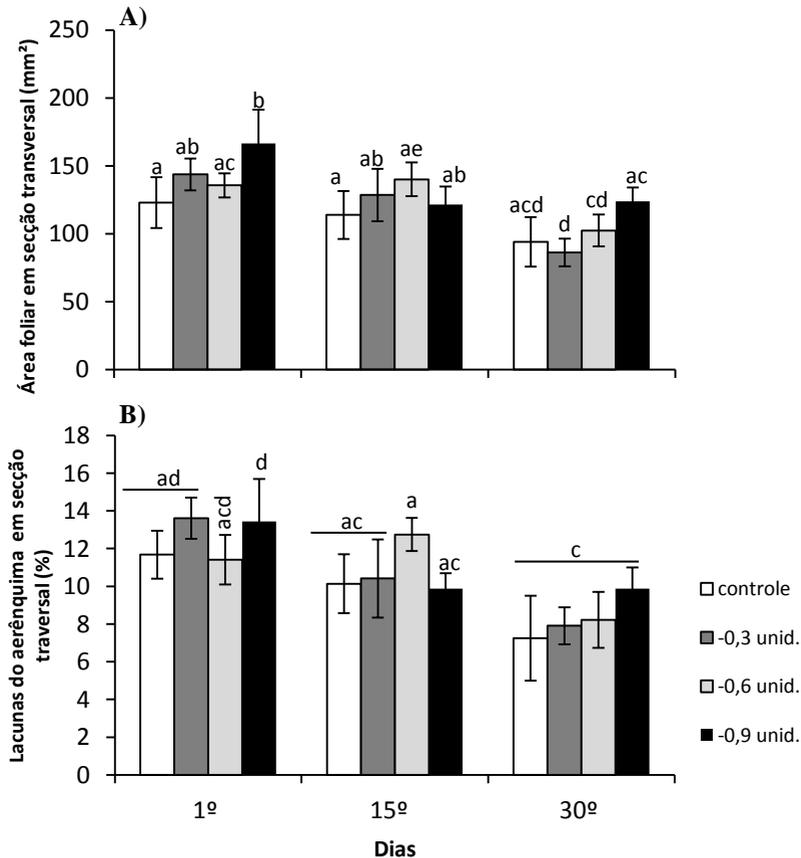


Figura 18. Parâmetros, área foliar (A) e área proporcional de aerênquima (B), obtidos a partir das medidas da lâmina foliar de *Halodule wrightii* no 1º, 15º e 30º do experimento no controle e nos tratamentos -0,3, -0,6 e -0,9 de pH. As letras indicam diferenças significativas, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) dado pelo teste *a posteriori* Newman Keuls. N=4

3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A ultraestrutura foliar de *Halodule wrightii* pode ser observada nas Figuras 19 a 21. Observamos as células epidérmicas, em secção transversal, evidenciando a presença de cloroplastos (Figura 19 A-D) distribuídos em todo citoplasma, grandes vacúolos (Figura 19 C), e núcleo (Figura 19 D). A parede periclinal externa é espessada, possuindo duas zonas distintas, as quais podem ser mais bem visualizadas no tratamento -0,9 (Figura 19 D), sendo em sua porção mais externa, uma camada bastante eletrodensa e a interna lamelada.

Na Figura 19 (E-H) observa-se ainda, tanto no controle quanto nos tratamentos, vesículas que se unem próximo às paredes anticlinais, estas possivelmente acumulam substância de nutrição, entre a membrana plasmática e a parede celular. Grande quantidade de mitocôndrias é possível observar próximo as vesículas, indicando alta atividade metabólica. A cutícula está presente formando uma camada eletrotransparente com presença de microcanais subcuticulares. Estes, provavelmente, são utilizados para a passagem de substâncias para dentro das células (Figuras 19 I-M).

A ultraestrutura dos cloroplastos das células epidérmicas e das células do parênquima da folha mostram variações. Os primeiros apresentam formatos circulares e são maiores que os segundos cujo formato é mais alongado. Ambos apresentaram tilacóides organizados em grana e presença de plastoglóbulos, com tamanhos e números distintos (Figura 20). A ausência de plastoglóbulos na Figura 20L é uma exceção, uma vez que durante as análises eles foram observados em outros cloroplastos do mesmo tecido. Observa-se ainda que os cloroplastos das células epidérmicas apresentam maior quantidade de tilacóides por grana, em relação aos cloroplastos das células parenquimáticas.

A Figura 21 (A-D) apresenta os feixes vasculares no controle e nos diferentes tratamentos. É possível observar detalhes dos elementos de tubo crivado, com paredes celulares espessas do tipo nacaradas (Figura 21 E-H). Alterações visíveis em função do aumento de CO₂ não foram observadas.

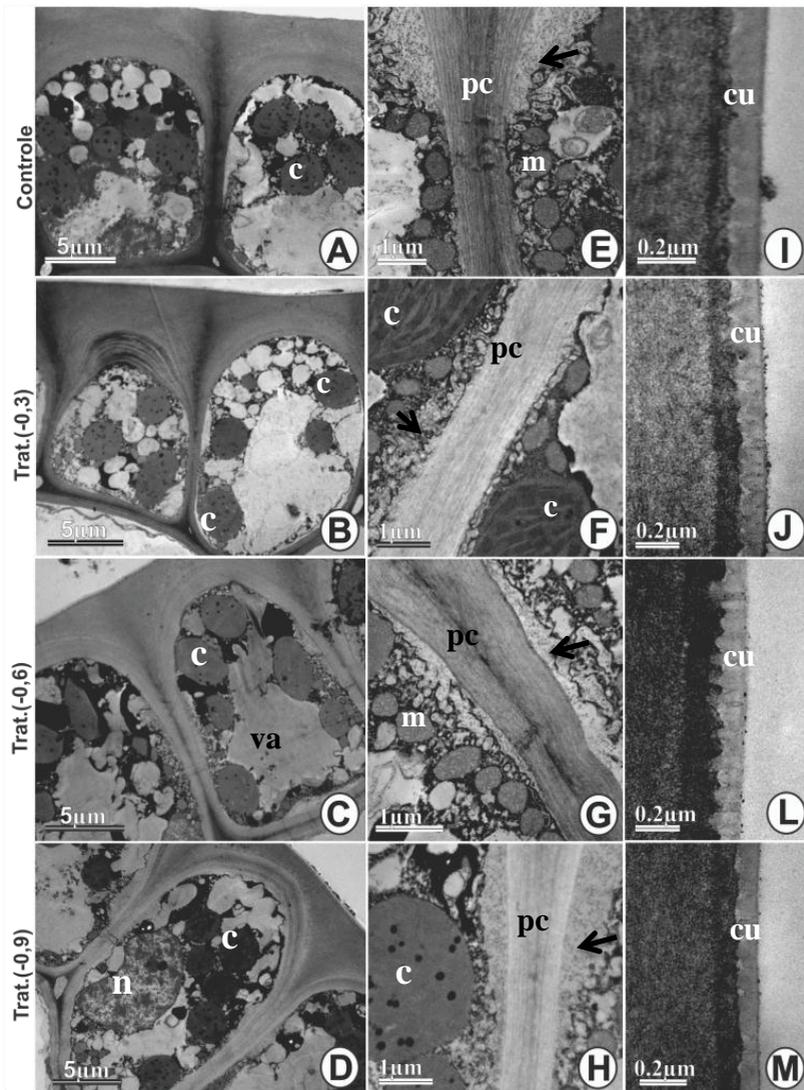


Figura 19. Eletromicrografias de transmissão de seções transversais da epiderme da lâmina foliar de *Halodule wrightii*. Comparação das células epidérmicas (A-D), suas paredes anticlinais (E-H) e cutícula com microcanais (setas) (I-M), no controle e nos tratamentos (-0,3), (-0,6) e (-0,9). Nas células epidérmicas é possível observar cloroplastos espalhados pelo citoplasma e grandes vacúolos. As paredes anticlinais apresentam vesículas (setas) e muitas mitocôndrias. c=cloroplasto, ep=epiderme, va=vacúolo, pc=parede celular, cu=cutícula, m=mitocôndria, n=núcleo.

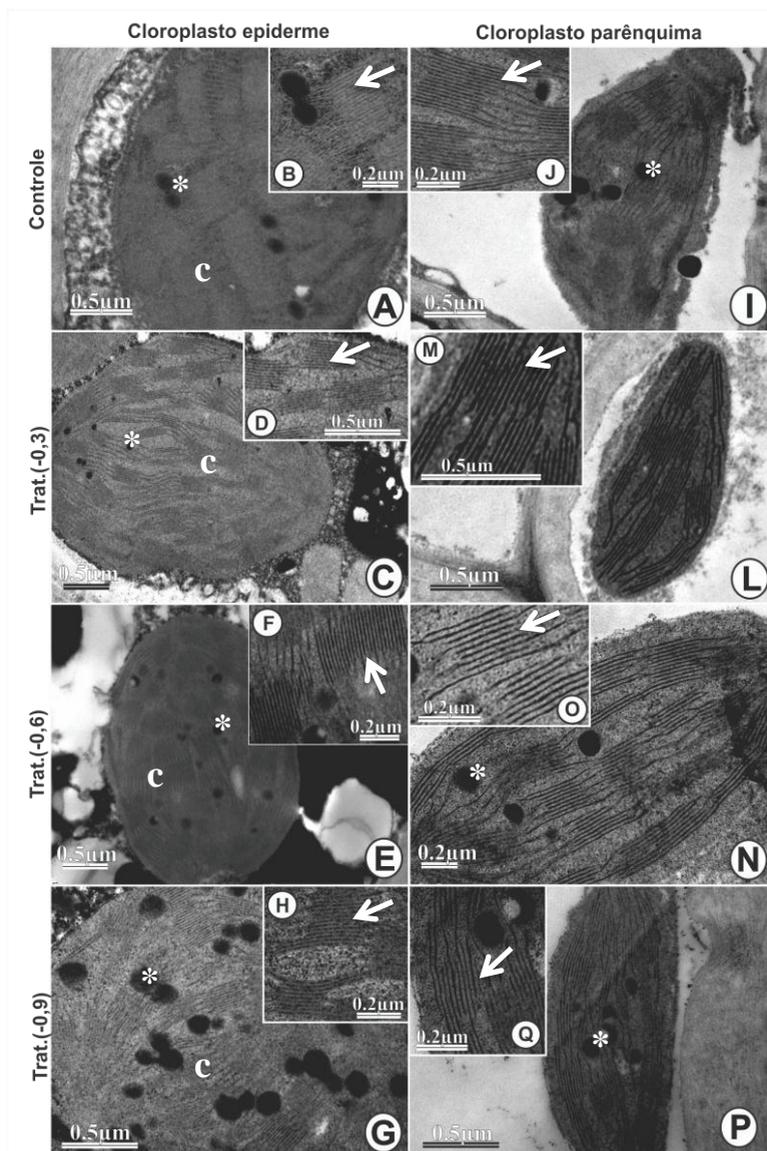


Figura 20. Eletromicrografias de transmissão dos cloroplastos da lâmina foliar de *Halodule wrightii*. Cloroplastos da epiderme (A-H), cloroplastos do parênquima clorofiliano (I-P). Comparação do controle e dos tratamentos (-0,3), (-0,6) e (-0,9). Detalhes dos tilacóides (setas) e dos plastoglobulos (*). c=cloroplasto

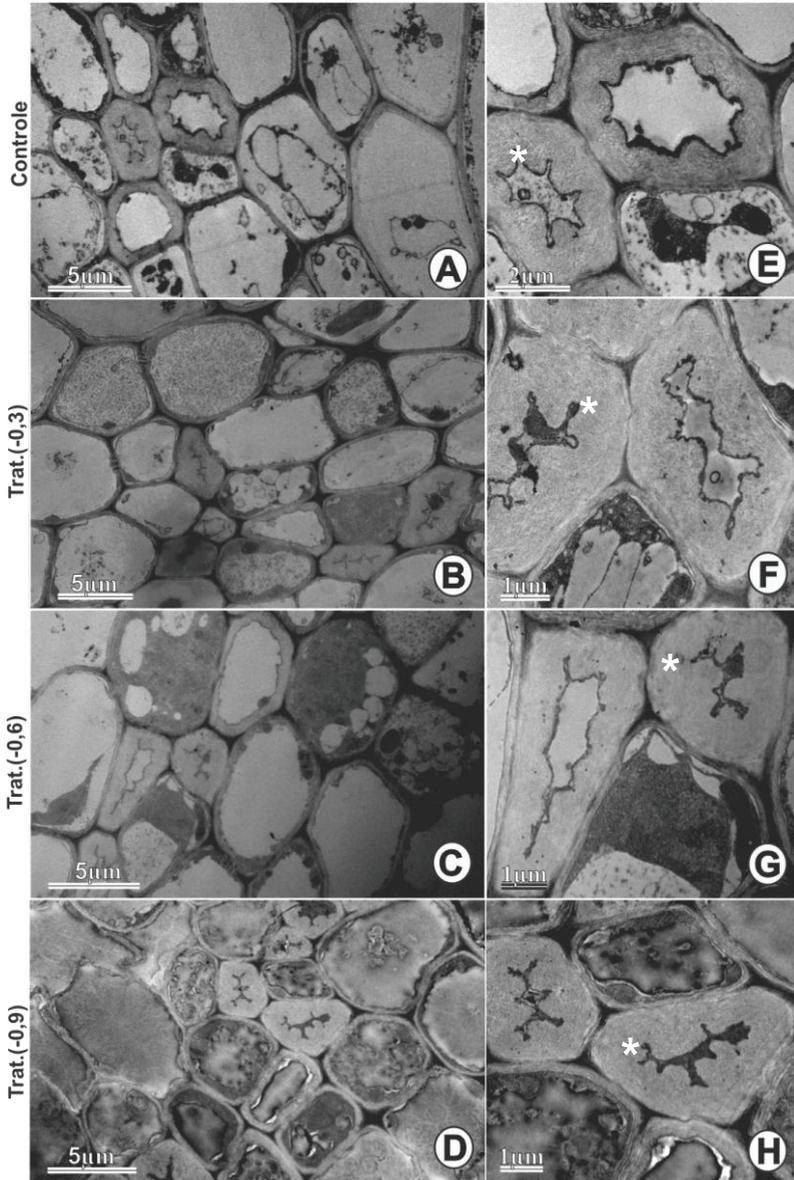


Figura 21. Eletromicrografias de transmissão dos feixes vasculares de *Halodule wrightii*. Comparação do controle e dos tratamentos -0,3, -0,6 e -0,9. Elementos de tubo crivados com paredes celulares espessas do tipo nacaradas (*).

4. DISCUSSÃO

As respostas fotossintéticas apresentaram estreita relação com as mudanças nos parâmetros abióticos durante o período de experimentação, principalmente temperatura e radiação. A luz, por exemplo, é um fator limitante tanto na distribuição quanto no crescimento das angiospermas marinhas (Björk *et al.*, 2008; Duarte, 1991), pois o excesso quanto a limitação de luz podem alterar as taxas fotossintéticas (Ralph e Burchett, 1995; Zimmerman *et al.*, 1997).

As angiospermas marinhas apresentam respostas sazonais em sua produção associadas às mudanças de luz e temperatura ao longo do ano (Dennison, 1987; Romero, 1992; Lee *et al.*, 2007). Valores ótimos e limites máximos e mínimos de luz e temperatura relacionados às taxas fotossintéticas, produção e crescimento são explorados por diversos trabalhos realizados com diferentes espécies de angiospermas marinhas (Dennison, 1987; Evans *et al.*, 1986; Marsh *et al.*, 1986; Bulthuis, 1987; Romero, 1992; Campbell *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007).

A influência destes fatores (luz e temperatura) nas respostas fisiológicas das angiospermas marinhas interagem diretamente com a disponibilidade CO_2 alterando processos metabólicos. Segundo Campbell e Fourqurean (2014), a variação sazonal pode afetar os efeitos da acidificação dependendo da época do período de amostragem.

Durante o período de experimentação os parâmetros fotossintéticos ETR_{max} e I_k apresentaram declínio significativo no 7º de 21º dia do experimento que pode estar relacionado com o decréscimo de temperatura e radiação nos mesmos períodos, especialmente no 7º dia. Já a eficiência fotossintética manteve-se praticamente constante no tratamento -0,9, mostrando declínio dos demais tratamentos e também no controle no 7º dia de experimentação. Deste modo, é possível que a maior disponibilidade de CO_2 talvez tenha compensado o estresse causado pela redução de luz e temperatura. Isso também foi sugerido por Koch *et al.* (2013) e Zimmerman *et al.* (1997). Estes últimos concluíram por meio de seus experimentos que a redução da produtividade da angiosperma marinha era maior quando havia limitação de luz sem o acréscimo do CO_2 .

De acordo com a literatura, a fotossíntese das angiospermas marinhas é limitada pela disponibilidade de CO_2 em seus habitats naturais (Phillips e Meñez, 1988; Heminga e Duarte, 2000; Schwartz *et al.*, 2000; Invers *et al.*, 2001; Larkum *et al.*, 2006). Uma vez que ao contrário dos ambientes terrestres, na água as concentrações de dióxido de carbono são relativamente baixas, pois sua solubilidade é muito maior no ar do que na água (Heminga e Duarte, 2000). Na água, o ácido carbônico (H_2CO_3) juntamente com CO_2 na forma gasosa corresponde a aproximadamente 1%, enquanto que o bicarbonato (HCO_3^-) corresponde a cerca de 90% (Sabine e Tanhua, 2009).

Assim, as angiospermas marinhas desenvolveram ao longo da evolução mecanismos para utilizar o bicarbonato como fonte de carbono para a fotossíntese (Invers *et al.*, 2001; Uku *et al.*, 2005; Larkum *et al.*, 2006; Larkum *et al.*, 2006). De acordo com Uku *et al.* (2005), possivelmente três mecanismos podem operar juntos ou isoladamente para obter carbono por meio do bicarbonato, os quais são diferentemente utilizados, resultando em diferenças quantitativas nas taxas fotossintéticas entre as espécies (Invers *et al.*, 2001). Sendo assim, provavelmente a limitação por CO_2 varia, existindo espécies que são mais limitadas e outras que são menos.

Possivelmente, as respostas com relação ao aumento de CO_2 também iram variar, uma vez que as espécies mais limitadas, pelo uso ineficiente do HCO_3^- , poderão responder com taxas fotossintéticas mais altas. Estudos realizados tem demonstrado significativo aumento das taxas fotossintéticas e da biomassa das angiospermas marinhas em resposta ao aumento das concentrações de CO_2 (Zimmerman *et al.*, 1997; Zimmermann, 2006; Palacios e Zimmerman, 2007; Short e Coles, 2001; Jiang *et al.*, 2010).

Também é possível que espécies mais eficientes na utilização do HCO_3^- respondam ao aumento de CO_2 com taxas fotossintéticas menores em relação às espécies ineficientes. Ou ainda, podem responder com indiferença. Resultados encontrados em ecossistemas naturalmente acidificados demonstraram incremento na biomassa da angiosperma marinha *Posidonia oceanica*, entretanto as respostas fotossintéticas não variaram entre os locais com diferentes valores de pH (Hall-Spencer *et*

al., 2008). Em outro estudo, espécies de algas também não apresentaram alterações significativas nas taxas fotossintéticas em resposta ao aumento de CO₂, provavelmente porque apresentavam eficientes mecanismos de concentração de carbono (Beer e Koch, 1996).

Tais resultados podem ser comparados aos do presente estudo, já que as respostas fotossintetizantes apresentaram pouca variação. Ou possivelmente, a disponibilidade de CO₂ tenha compensado os estresses em função da experimentação e da variação dos fatores abióticos aos quais as plantas ficaram expostas como, por exemplo, a variação de luz e temperatura. Isso pode ser observado no aumento significativo da eficiência fotossintética Y(II) do tratamento -0,9 no 19º dia. Ou ainda, na diminuição do mesmo parâmetro para o controle e o tratamento -0,3 nos últimos dias de experimentação, enquanto os demais tratamentos com concentração maior de CO₂ (-0,6 e -0,9) mantiveram estáveis seus valores.

O aumento pouco significativo da fotossíntese também pode estar relacionado à redução dos níveis de clorofila durante todo o período de experimentação. Além disso, outros estressores podem estar envolvidos como, por exemplo, os epífitos. As angiospermas marinhas proporcionam excelentes substratos para os organismos epifíticos. Estes são um componente integral, complexo e dinâmico dos seus ecossistemas (Borowitzka *et al.*, 2006).

A princípio os epífitos parecem não ter efeitos negativos sobre a comunidade de angiospermas marinhas, porém condições que levem a um “Bloom” das algas epifíticas podem contribuir para declínio destas (Borowitzka *et al.*, 2006; Heminga e Duarte, 2000; Ralph *et al.*, 2006; Hogarth, 2006).

Estudos recentes têm mostrado que o aumento nas concentrações de CO₂ e a conseqüente redução do pH podem alterar a composição da comunidade epifítica, favorecendo espécies que não possuem carbonato de cálcio (CO₃²⁻) em sua estrutura (Martin *et al.*, 2008; Campbell e Fourqurean, 2014). Esta redução de diversidade e o favorecimento de certas espécies juntamente com alterações na qualidade da água podem causar desequilíbrios levando a um aumento populacional descontrolado.

A limitação de luz e a restrição para absorção de CO₂ como resultado de um “Bloom” de epífitos poderia resultar em danos negativos as angiospermas marinhas (Zimmermann, 2006; Heminga e Duarte, 2000; Borowitzka *et al.*, 2006; Ralph *et al.*, 2006). A partir deste enfoque é possível supor que a maior disponibilidade de CO₂, quando levado em consideração outras variáveis, pode resultar em efeitos negativos.

Adicionalmente as mudanças químicas, alterações na comunidade de herbívoros também podem afetar os epífitos. Estudo recente demonstrou que os herbívoros são responsáveis pelo controle natural da abundância epifítica nos ecossistemas formados pelas angiospermas marinhas (Whalen *et al.*, 2013). Sendo assim, se a condição experimental, mesmo que muito semelhante ao ambiente natural, tenha afetado a diversidade e/ou quantidade de herbívoros, o resultado pode ter sido o aumento do epifitismo e conseqüente estresse das plantas.

Apesar da metodologia deste trabalho não permitir análises mais profundas, por não ter analisado e/ou quantificado a comunidade epifítica, destaca-se que durante todo o período de experimentação foi observado grandes quantidades de epífitos nas paredes dos tanques de experimentação e nas folhas das angiospermas marinhas, principalmente no tratamento 0,9. Semanalmente, era realizada a limpeza dos epífitos para que estes não afetassem as leituras fotossintéticas e outras análises. A experimentação em mesocosmos permite a interferência de tais fatores, assim como das variáveis abióticas. Em função disso, mesmo nos tratamentos com maior concentração de CO₂ e teoricamente mais favoráveis, as plantas podem não terem respondido positivamente em função da presença dos epífitos.

Entretanto, a condição de experimentação do presente trabalho, dada pela presença de epífitos e oscilações dos parâmetros abióticos, não chegou a influenciar negativamente as plantas, pois apesar dos parâmetros fotossintéticos mostrarem oscilações e os níveis de clorofila diminuírem ao longo do experimento, as quantidades de açúcar e amido se mantiveram praticamente estáveis.

Resultados diferentes foram observados em outros estudos, os quais apresentaram aumento nas taxas fotossintéticas e nos níveis de

açúcar e amido (Zimmerman *et al.*, 1997; Palacios e Zimmerman, 2007; Jiang *et al.*, 2010). Conforme Jiang *et al.*, (2010), houve acréscimos nas quantidades de açúcar e amido das folhas, porém este aumento foi muito maior nos tecidos abaixo do solo (rizoma e raízes) (Campbell e Fourqurean, 2013).

As análises ultraestruturais e histoquímicas não apresentaram alterações neste estudo, comparando-se também com os resultados de Ferreira *et al.* (2014). Os cloroplastos envolvidos diretamente no processo fotossintético não apresentaram mudanças qualitativas visíveis em função dos tratamentos. Pritchard *et al.*, (1997) analisaram os efeitos do aumento de CO₂ nos cloroplastos de plantas terrestres e alterações foram detectadas após 20 meses de experimentação, estas incluíam cloroplastos com redução no empilhamento das membranas e incremento no número de plastoglobulos.

Alterações histoquímicas e anatômicas significativas em função do aumento do CO₂ foram observadas em plantas terrestres, entre as quais se destacam aumento da área e espessura foliar (Radoglou e Jarvi, 1990, 1992; Epron *et al.*, 1996; Lin e Ceulemans, 2001). Adicionalmente, foram detectadas modificações na anatomia do mesofilo, incluindo incremento dos espaços intercelulares e formação de uma camada extra (Masle, 2000). Cabe destacar que as modificações anatômicas apareceram nas plantas terrestres após alguns meses de experimentação, além disso, foi em plântulas ou em tecidos jovens, na fase inicial de crescimento.

O presente estudo demonstrou que no tratamento com maior concentração de CO₂ (-0,9), a área em secção transversal e largura das folhas foram sensivelmente maiores no 30º dia de experimentação. Possivelmente, tais alterações poderiam ter sido mais significativas com um tempo maior de experimentação, contudo tais resultados são importantes e semelhantes aos encontrados em plantas terrestres. O aumento do tecido foliar pode ter sido resultado do aumento de carboidratos de reserva (Wong, 1990). Ou ainda, efeito do CO₂ sobre a divisão e expansão celular como sugere Masle (2000). Porém, Mousseau e Saugier (1992) destacam que ainda não há uma regra geral sobre o

efeito do aumento de CO₂ sobre a área foliar, de acordo com os autores diferentes espécies podem variar em suas repostas.

Pritchard *et al.* (1997) destacaram que os efeitos do incremento de CO₂ podem não ser benéficos se outros recursos estiverem limitados. Ou ainda, segundo Epron *et al.* (1996) é possível ocorrer a aclimação fotossintética, pois dependendo da idade da folha e de outros fatores fisiológicos ocorrem modificações na estrutura das folhas e na capacidade para manutenção de altas taxas de produção. Desta forma, um aumento sustentado da assimilação líquida de CO₂ durante longo do tempo seria improvável.

Em estudos com plantas terrestres foi detectada ainda uma relação entre o aumento da espessura do mesófilo e número de cloroplastos (Lin e Ceulemans, 2001). Assim, um acréscimo na capacidade fotossintética poderia resultar em um aumento do tecido fotossintetizante ou vice-versa (Sims *et al.*, 1998). Nas angiospermas marinhas alterações como estas, talvez não fossem possíveis, uma vez que isso depende da disponibilidade de luz e da própria anatomia da planta.

Os cloroplastos das angiospermas marinhas estão localizados predominantemente na epiderme (Zimmermann, 2006). O aumento destes no parênquima depende da quantidade de luz que chega até este tecido. Assim, se a luz for limitada, como é o caso de muitos habitats, a planta não conseguirá aumentar a quantidade de cloroplastos, limitando a fotossíntese mesmo com o aumento do CO₂. Neste caso não há necessidade de investir no aumento do parênquima como no caso das plantas terrestres.

Cummings e Zimmerman (2003) detectaram que as diferenças no conteúdo de clorofila poderiam ser uma consequência das restrições anatômicas impostas pela distribuição dos cloroplastos nas folhas das angiospermas marinhas. Embora a localização dos cloroplastos na epiderme seja vantajosa em ambientes com pouca luz, reduz-se o número total de cloroplastos que podem ser distribuídos ao longo da folha. O resultado é conhecido como “efeito pacote” e as consequências seriam justamente limitar a produtividade mesmo com o aumento do CO₂.

Frente aos resultados apresentados e também as informações presentes na literatura, percebe-se que ainda não há evidências suficientes para inferir se o aumento das concentrações de CO₂ e a consequente redução do pH, realmente beneficiaria as angiospermas marinhas. Arnold *et al.* (2012) demonstraram em seu estudo que a acidificação poderia causar a diminuição na quantidade de compostos fenólicos. Isso poderia resultar em um aumento da herbivoria e a da suscetibilidade a doenças. Walker *et al.* (2006), por exemplo, verificaram a perda de três hectares de angiosperma marinha devido o pastoreio de duas espécies de ouriço.

Supondo que o aumento de CO₂ realmente beneficie as angiospermas marinhas, é possível que este incremento venha a compensar outras ameaças como, por exemplo, perda da qualidade da água e/ou a eutrofização apontada por muitos autores como um dos maiores motivos pela perda destas plantas (Short e Neckles, 1999; Duarte, 2002; Orth *et al.*, 2006; Ralph *et al.*, 2006; Björk *et al.*, 2008; Waycott *et al.*, 2008). Ou ainda, é possível que haja uma compensação das alterações causadas pelas mudanças do clima como o aumento das temperaturas, do nível do mar, da incidência de eventos extremos, também identificadas como ameaças às angiospermas marinhas (Short e Neckles, 1999; Orth *et al.*, 2006; Waycott *et al.*, 2008; Grech *et al.*, 2012).

Mesmo que essas plantas tenham colonizado o ambiente marinho a aproximadamente 100 milhões de anos atrás, quando o pH da água ainda era baixo (DenHartog, 1970; Heminga e Duarte, 2000) não é possível afirmar que elas serão beneficiadas pelo decréscimo do pH no futuro, pois os organismos juntamente com os fatores abióticos que compõe os ecossistemas de agora não são os mesmo que a 100 milhões de anos atrás e também não serão os mesmo no futuro.

Assim, as respostas das angiospermas marinhas às mudanças do clima podem ser integradas e em diferentes níveis, desde respostas fisiológicas do organismo, até interações em nível de ecossistema (Duarte, 2002).

Possivelmente, acontecerão alterações na distribuição e na competição entre as espécies de angiospermas marinhas e também entre

estas e as algas (Short e Coles, 2001; Fabricius *et al.*, 2011). Alguns organismos provavelmente serão beneficiados, porém as perdas podem ser muito maiores, havendo grandes prejuízos com relação à diversidade e complexidade estrutural que, por fim, causarão mudanças ainda desconhecidas na dinâmica dos ecossistemas (Fabricius *et al.*, 2011).

REFERÊNCIAS

- Anthony, K.R.N., Kleypas, J.A., Gattuso, J-P., 2011. Coral reefs modify their seawater carbon chemistry—implications for impacts of ocean acidification. *Glob Change Biol*, 17, 3655–3666.
- Apolo11., 2012. Relógio Carbônico CO₂. Disponível em: <<http://www.apolo11.com/relogiocarbonico.php>>. Abril de 2014.
- Arnold, T., Mealey, C., Leahey, H., Miller, A.W., Hall-Spencer, J.M., Milazzo, M., Maers, K., 2012. Ocean acidification and the loss of phenolic substances in marine plants. *PLoS ONE* 7, 1-10.
- Baker, N. R., 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59, 89–113.
- Beer, S., Koch, E., 1996. Photosynthesis of marine macroalgae and seagrass in globally changing CO₂ environments. *Marine Ecology Progress Series*, 141, 199–204.
- Björk, M., Short, F., Mcleod, E., Beer, S., 2008. Managing seagrasses for resilience to climate change. Gland, Switzerland: IUCN.
- Borowitzka, M.A., Lavery, P.S., van Keulen, M., 2006. Epiphytes of seagrasses. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C. (Eds.), *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Springer, Dordrecht, 441–461.
- Bozzola, J.J., and Russell, L.D. 1999. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Jones and Bartlett Publishers, Boston, 670.
- Bulthuis, D. A., 1987. Effects of temperature on photosynthesis and growth of seagrasses. *Aquat Bot*, 27, 27–40.
- Caldeira, K., Wickett, M.E., 2005. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *Journal of Geophysical Research*, 110, 1-12.

Campbell, J. E., Fourqurean, J. W., 2014. Ocean acidification outweighs nutrient effects in structuring seagrass epiphyte communities. *Journal of Ecology*, 102, 730–737.

Campbell, S. J., McKenzie, L.J., Kerville, S.P., 2006. Photosynthetic responses of seven tropical seagrasses to elevated seawater temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 330, 455–468.

Chapin III, F.S., Sala, O., Burke, I.C., Grime, J.P., *et al.*, 1998. Ecosystem consequences of changing biodiversity. *Bioscience*, 48, 45–52.

Clough, J.M., Peet, M.M., Kramer, P.J., 1981. Effects of high atmospheric CO₂ and sink size on rates of photosynthesis of a soybean cultivar. *Plant Physiology*, 67: 1007–1010.

Cummings, M. E., Zimmerman, R. C., 2003. Light harvesting and the package effect in the seagrasses *Thalassia testudinum* Banks ex König and *Zostera marina* L.: optical constraints on photoacclimation. *Aquat Bot*, 75, 261–274.

Den Hartog, C., 1970. *The Sea-grasses of the world*. North Holland, Amsterdam, 275.

Dennison, W. C., 1987. Effects of light on seagrass photosynthesis, growth and depth distribution. *Aquat. Bot.*, 27, 15–26.

Duarte, C. M., 2002. The future of seagrass meadows. *Environmental Conservation*, 29, 192–206.

Duarte, C.M., 1991. Seagrass depth limits. *Aquatic Botany*, 40, 363–377.

Duarte, C., Hendriks, I., Moore, T., Olsen, Y., Steckbauer, A., Ramajo, L., Carstensen, J., Trotter, J., McCulloch, M., 2013. Is ocean acidification an open-ocean syndrome? Understanding anthropogenic impacts on seawater pH. *Estuar Coast*, 36, 221–236.

Ehlers, A., Worm, B., Reusch, T. B., 2008. Importance of genetic diversity in eelgrass *Zostera marina* for its resilience to global warming. *Marine ecology progress*, 355, 1–7.

- Epron, D., Liozon, R., Mousseau, M., 1995. Effects of elevated CO₂ concentration on leaf characteristics and photosynthetic capacity of beech (*Fagus sylvatica*) during the growing season. *Tree Physiol*, 16, 425-432.
- Evans, A.S., Webb, K.L., Penhale, P.A., 1986. Photosynthetic temperature acclimation in two coexisting seagrasses *Zostera marina* and *Ruppia maritima*. *Aquat. Bot.*, 24, 185-198.
- Fabricius, K. E., Langdon, C., Uthicke, S., Humphrey, C., Noonan, S., De'ath, G., Okazaki, R., Muehllehner, N., Glas, M. S., Lough, J. M., 2011. Losers and winners in coral reefs acclimatized to elevated carbon dioxide concentrations. *Nature Climate Change*, 1, 165-169.
- Feely, R.A., Sabine, C.L., Hernandez-Ayon, J.M., Ianson, D., Hales, B., 2008. Evidence for upwelling of corrosive "acidified" water onto the continental shelf. *Science*, 320, 1490–1492.
- Ferreira, C., Horta, P.A., Almeida, G.M., Zitta, C.S., de M. Oliveira, E., Gueye, M.B., Rodrigues, A.C., 2014. Anatomical and ultrastructural adaptations of seagrass leaves: an evaluation of the southern Atlantic groups. *Protoplasma*.
- Findlay, H.S., Artioli, Y., Moreno Navas, J., Hennige, S.J., Wicks, L.C., Huvenne, V.A.I., Woodward, E.M.S., Roberts, J.M., 2013. Tidal downwelling and implications for the carbon biogeochemistry of cold-water corals in relation to future ocean acidification and warming. *Glob Change Biol*.
- Gahan, P. B., 1984. Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction. Academic Press, London.
- Gautier, C., 2008. Oil, water and climate: an introduction. 1. ed. New York: Cambridge University Press, 366.
- Genty, B., Briantais, J. M., Baker, N. R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990, 87–92.

Grech, A., Chartrand-Miller, K., Erfteimeijer, P., Fonseca, M., McKenzie, L., Rasheed, M., Coles, R., 2012. A comparison of threats, vulnerabilities and management approaches in global seagrass bioregions. *Environmental Research Letters*, 7, 1-8.

Greiner, J.T., McGlathery, K.J., Gunnell, J., McKee, B.A., 2013. Seagrass Restoration Enhances “Blue Carbon” Sequestration in Coastal Waters. *PLoS ONE*, 8, 1-8.

Gruber, N., Hauri, C., Lachkar, Z., Loher, D., Frölicher, T.L., Plattner, G. K., 2012. Rapid progression of ocean acidification in the California current system. *Science*, 337, 220–223.

Hall-Spencer, J. M., Rodolfo-Metalpa R., Martin S., Ransome, E., Fine, M., Turner S. M., Rowley, S. J., Tedesco, D., Buia, M. C., 2008. Volcanic carbon dioxide vents show ecosystem effects of ocean acidification. *Nature*, 454, 96-99.

Harvey, B.P., Gwynn-Jones, D., Moore, P.J., 2013. Meta-analysis reveals complex marine biological responses to the interactive effects of ocean acidification and warming. *Ecology and Evolution*, 1-15.

Hemminga, M., Duarte, C. M., 2000. *Seagrass Ecology*. Cambridge (United Kingdom): Cambridge University Press. 298.

Hofmann, G.E., Smith, J.E., Johnson, K.S., *et al.*, 2011. High-frequency dynamics of ocean pH: A multi-ecosystem comparison. *PLoS ONE*, 1-11.

Hogarth, P. J., 2006. *The biology of mangroves*. Oxford University Press, New York.

Intergovernmental Panel on Climate Change - IPCC. 2007. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Intergovernmental Panel on Climate Change – IPCC. 2013. Working Group I Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report Climate Change 2013: The Physical Science Basis Summary for Policymakers.

Invers, O., Zimmerman, R. C., Alberte, R. S., Pérez, M., Romero, J., 2001. Inorganic carbon sources for seagrass photosynthesis: an experimental evaluation of bicarbonate use in species inhabiting temperate waters. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 265, 203-217.

Jiang, Z. J.; Huang X. P.; Zhang J. P. 2010. Effects of CO₂ Enrichment on Photosynthesis, Growth, and Biochemical Composition of Seagrass *Thalassia hemprichii* (Ehrenb.) Aschers *Journal of Integrative. Plant Biology*, 52(10): 904–913.

Klughhammer, C., Schreiber, U., 2008. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the saturation pulse method. *PAM Application Notes* 1, 27–35.

Koch, M., Bowes G., Ross, C., Zhang X., 2013. Climate change and ocean acidification effects on seagrasses and marine macroalgae. *Global Change Biology*, 19: 103–132.

Larkum, A.W.D., Drew, E., Ralph, P., 2006. Photosynthesis and Metabolism in Seagrasses.at the Cellular Level. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M. *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Springer, The Netherlands, 323–345.

Lee, K.S., Park, S.R., Kim, Y.K., 2007. Effects of irradiance, temperature, and nutrients on growth dynamics of seagrasses: a review. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 350, 144–175.

Lin, J., Jach, M. E., Ceulemans, R., 2001. Stomatal density and needle anatomy of Scots pine (*Pinus sylvestris*) are affected by elevated CO₂. *New Phytologist*, 150, 665-674.

Lüthi D., Le Floch M., Bereiter B., Blunier T., Barnola J-M, *et al.* 2008. High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000-800,000 years before present. *Nature* 453:379–82.

Marsh, J.A., Dennison, W.C., Alberte, R.S., 1986. Effects of temperature on photosynthesis and respiration in eelgrass (*Zostera*

marina L.). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 101, 257–267.

Martin S., Rodolfo-Metalpa, R., Ransome, E., Rowley, S., Buia, M. C., Gattuso, J. P., Hall-Spence, J., 2008. Effects of naturally acidified seawater on seagrass calcareous epibionts. Biology Letters, 4, 689–69.

Masle, J., 2000. The effects of elevated CO₂ concentrations on cell division rates, growth patterns, and blade anatomy in young wheat plants are modulated by factors related to leaf position, vernalization, and genotype. Plant Physiology, 122, 1399–1416.

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

Mousseau, M., Saugier, B., 1992. The direct effect of increased CO₂ on gas exchange and growth of forest tree species. Journal of Experimental Botany, 43, 1121–1130.

O'Brien, T. P., Feder, N., McCully, M., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. Protoplasma, Bd. LIX, H., 2, 367–373.

Orth, R. J., Carruthers, T. J. B., Short, F. T., Dennison, W. C., Duarte, C. M., Fourqurean, J. W., Heck Jr., K. L., Hughes, A. R., Kendrick, G. A., Kenworthy, W. J., Olyarnik, S., Waycott, M., Williams, S. L., 2006. A Global Crisis for Seagrass Ecosystems. BioScience, 987 – 996.

Palacios, S., Zimmerman, R.C., 2007. Response of eelgrass *Zostera marina* to CO₂ enrichment: possible impacts of climate change and potential for remediation of coastal habitats. Mar. Ecol. Prog, 344, 1–13.

Pérez, M., Romero, J., 1992. Photosynthetic response to light and temperature of the seagrass *Cymodocea nodosa* and the prediction of its seasonality. Aquatic Botany, 43, 51–62.

Phillips, R. C., Menez, E. G., 1988. Seagrasses. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 34, 1 – 104.

Platt, T., Gallegos, C.L., Harrison, W.G., 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *Journal of Marine Research*, 38, 687–701.

Pritchard, S. G., Peterson, C. M., Prior, S. A., Rogers, H. H., 1997. Elevated atmospheric CO₂ differentially affects needle chloroplast ultrastructure and phloem anatomy in *Pinus palustris*: interactions with soil resource availability. *Plant, Cell & Environment*, 20, 461–471.

Quarmby, C., Allen, S. E., 1989. Organic constituents. Blackwell Scientific Press, Oxford.

Radoglou, K. M., Jarvis, P. G., 1990. Effects of CO₂ enrichment on four poplar clones. I. Growth and leaf anatomy. *Annals of Botany*, 65, 617–626.

Radoglou, K. M., Jarvis, P. G., 1992. The effects of CO₂ enrichment and nutrient supply on growth morphology and anatomy of *Phaseolus vulgaris* L. seedlings. *Annals of Botany*, 70, 245–256.

Ralph, P. J., Burchett, M. D., 1995. Photosynthetic responses of the seagrass *Halophila ovalis* (R. Br.) Hook. f. to high irradiance stress, using chlorophyll *a* fluorescence. *Aquatic Botany*, 51, 55–56.

Ralph, P.J., Tomasko, D., Moore, K., Seddon, S., Macinnis-Ng, C.M.O., 2006. Human impacts on seagrasses: eutrophication, sedimentation and contamination. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M. *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Springer, Dordrecht, 567–593.

Rey, A., Jarvis, P.G., 1997. Growth response of young birch trees (*Betula pendula* Roth.) after four and a half years of CO₂ exposure. *Annals of Botany*, 80, 809–816.

Reynolds, E. S., 1963. The use of the lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17, 208.

Ritchie, R.J., 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis Research*, 89, 27–41.

Ritchie, R.J., 2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46, 115–126.

Royal Society. 2005. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. Cardiff, England: Clyvedon Press. 60, 1-14.

Sabine, C. L.; Tanhua, T. 2009. Estimation of Anthropogenic CO₂ Inventories in the Ocean. *Annual Review of Marine Scienc*, 2, 175–98.

Santos, D. N., Nunes, C. F., Pasqual, M., Valente, T. C. T., Oliveira, A. C. L., Silveira, N. M., 2010. Análise bioquímica de calos de pinhão-manso. *Ciência Rural*, Santa Maria, 40, 2268-2273.

Schulz, K. G., Zeebe, R. E., Riebesell, U., 2009. CO₂ perturbation experiments: similarities and differences between dissolved inorganic carbon and total alkalinity manipulations. *Biogeosciences*, 6.

Schwarz, A.M., Bjork, M., Buluda, T., Mtolera, H., Beer, S., 2000. Photosynthetic utilisation of carbon and light by two tropical seagrass species as measured in situ. *Marine Biology*. 137, 755–761.

Short, F.T., Coles, R.G., 2001. *Global Seagrass Research Methods*. Elsevier Science, Amsterdam.

Short, F. T., Neckles, H., 1999. The effects of global climate change on seagrasses. *Aquatic Botany*, 63, 169–196.

Sims, D.A., Seeman, R.J., Luo, Y., 1998. Elevated Ca₂ has independent effects on expansion rates and thickness of soybean leaves across light and nitrogen gradients. *Journal of Experimental Botany*, 49, 583-591.

SINDA - Sistema Integrado de dados ambientais, 2013. Disponível em: <<http://sinda.crn2.inpe.br/PCD/>>. Acesso em: Nov. de 2013.

- Spurr, A.R., 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26, 31-43.
- Streck, N.A.; Alberto, C.M. 2006. Numerical study of the impact of climate change on the yield of wheat, soybean and maize. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41, 1351-1359.
- Trevelyan, W. E.; Harrison, J. S., 1950. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates Research and Development Department, 50, 298-303.
- Uku, J., Beer, S., Björk, M., 2005. Buffer sensitivity of photosynthetic carbon utilisation in eight tropical seagrasses. *Marine Biology*, 147, 1085-1090.
- Walker, D.I., Kendrick, G.A., McComb, A.J., 2006. Decline and recovery of seagrass ecosystems - the dynamics of change. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M. *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. The Netherlands, Springer, 551-565
- Waycott, M., Duarte, C. M., Carruthers, T. J. B., Orth, R. J., William, C. D., Olyarnik, S., Calladine, A., Fourqurean, J W., Heck, K. L., Hughes, A. R., Kendrick, G. A., Kenworthy, W. J., Short, F. T., Williams, S. L., 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. PNAS Early,106, 12377-12381.
- Whalen, M. A., Duffy, J.E., Grace, J.B., 2013). Temporal shifts in top-down vs. bottom-up control of epiphytic algae in a seagrass ecosystem. *Ecology*, 94, 510-520.
- Wong, S. C., 1990. Elevated atmospheric partial pressure of CO₂ and plant growth. II. Nonstructural carbohydrate content in cotton plants and its effect on growth parameters. *Photosynth. Res.*, 23, 171-180.
- Wootton, J.T., Pfister, C.A., Forester, J.D., 2008. Dynamic patterns and ecological impacts of declining ocean pH in a high-resolution multi-year dataset. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 18848-53.

Yemm, E. W.; Willis, A. J. 1954. The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone Department of Botany, University of Bristol, 57, 508-514.

Zimmerman, R. C., 2006. Light and photosynthesis in seagrass meadows. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M. Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation. The Netherlands, Springer, 303-321.

Zimmerman, R.C.; Kohrs, D.G.; Steller, D.L.; Alberte, R.S. 1997. Impacts of CO₂ enrichment on productivity and light requirements of eelgrass. *Plant Physiology*, 115, 599–607.