



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Estresse oxidativo de duas espécies de macrófitas aquáticas em
diferentes condições ambientais em um estuário de região
neotropical

Rachel Santini Paulino

Bióloga

JABOTICABAL, FEVEREIRO DE 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Estresse oxidativo de duas espécies de macrófitas aquáticas em
diferentes condições ambientais em um estuário de região
neotropical

Rachel Santini Paulino

Oreintador: Antônio Fernando Monteiro Camargo

Co-orientadora: Priscila Lupino Gratão

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Aquicultura e Biologia de Organismos
Aquáticos, Centro de Aquicultura da
UNESP-CAUNESP, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre.

JABOTICABAL, FEVEREIRO DE 2018

Paulino, Rachel Santini
P328f Estresse oxidativo de duas espécies de macrófitas aquáticas em diferentes condições ambientais em um estuário de região neotropical / Rachel Santini Paulino. -- Jaboticabal, 2018
vii, 56 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2018

Orientador: Antônio Fernando Monteiro Camargo

Banca examinadora: Irineu Bianchini Junior, Rogério Falleiros Carvalho, Antônio Fernando Monteiro Camargo

Bibliografia

1. Peroxidação lipídica. 2. Sinalização celular. 3. Eutrofização. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639:635.926

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estresse oxidativo de duas espécies de macrófitas aquáticas em diferentes condições ambientais em um estuário de região neotropical

AUTORA: RACHEL SANTINI PAULINO

ORIENTADOR: ANTONIO FERNANDO MONTEIRO CAMARGO

COORIENTADORA: PRISCILA LUPINO GRATÃO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ANTONIO FERNANDO MONTEIRO CAMARGO
Departamento de Ecologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Prof. Dr. ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Professor Titular IRINEU BIANCHINI JUNIOR
Departamento de Hidrobiologia / UFSCAR / São Carlos/SP

Jaboticabal, 23 de fevereiro de 2018

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, consolo, sabedoria, perseverança e oportunidades que jamais teria alcançado sem seu amor e cuidado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio, que aceitou a trabalhar comigo me confiando este projeto. Obrigada por toda ajuda, conversa, amizade construída e por sempre responder meus e-mails prontamente.

À minha co-orientadora Prof^a.Dr^aPriscila pela realização das análises das substâncias antioxidantes, por toda ajuda que me dedicou no ensino da bioquímica e por todo carinho e atenção que se sempre me atendeu .

Aos técnicos de laboratório Carlos, Amarílis e Sônia por todo apoio em campo e ensino das análises laboratoriais. Além da amizade, ensinamentos e profissionalismo que levarei para sempre.

Aos colegas dos laboratórios de Fisiologia Vegetal e Ecologia Aquática que me ensinaram com a realização das análises. Com certeza eles foram muito importantes para a realização desse trabalho.

Ao programa de Pós Graduação do CAUNESP, pela oportunidade de dar mais um passo aos meus estudos e realizar meu projeto de Mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À minha amada família que sempre esteve torcendo pelo meu sucesso, mesmo que isso me levasse para longe.

Ao meu noivo Baltasar que sempre me apoiou de inúmeras formas. Obrigada pelo amor e paciência que sempre me dedica.

À Silvana, Balatsar Filho, Carol e Dona Maria, que são minha família aqui. Obrigada por todo apoio e carinho que sempre me dedicam.

RESUMO

O estresse oxidativo causado pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é uma das respostas que as plantas apresentam frente a um estresse ambiental. Nosso objetivo foi avaliar o estresse oxidativo das macrófitas aquáticas *Crinum americanum* e *Spartina alterniflora* em duas condições: salinidade e nutrientes que ocorrem no estuário do rio Itanhaém (SP). Raízes e folhas (5 plantas) de *C. americanum* foram coletadas em cada área (5 amostras/área). O material vegetal para análises de clorofila ($a+b$), carotenóides, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), malonaldeído (MDA) e enzimas antioxidantes SOD e CAT foram acondicionado em N_2 líquido no campo e posteriormente armazenado em freezer a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Também foram coletados em cada réplica material vegetal para avaliar o teor de N e P totais da planta e do sedimento. Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados obtidos mostraram que: *C. americanum* e *S. alterniflora* sofreram maior estresse oxidativo em alto e médio estuário, respectivamente; Os indivíduos de *S. alterniflora* sofreram maior estresse na área de lançamento de esgoto.

Palavras chave: Peroxidação lipídica, Sinalização celular, Eutrofização.

ABSTRACT

The oxidative stress caused by the production of reactive oxygen species (ROS) is one of the responses that plants exhibit facing environmental stress. Our objective was to evaluate the oxidative stress of the aquatic macrophytes *Crinum americanum* and *Spartina alterniflora* under two conditions: salinity and nutrients that occur in the estuary of the Itanhaém river (SP). Roots and leaves (5 plants) of *C. americanum* were collected in each area (5 samples / area). The plant material for analysis of chlorophyll (a + b), carotenoids, H₂O₂, MDA and antioxidant enzymes SOD and CAT with platform in N₂ without field and liquid in freezer at -80 ° C. Vegetable material was also collected in each replicate to evaluate the total N and P content of the plant and of the sediment. The data were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and compared by the Tukey test (p <0.05). The results showed that: *C. americanum* and *S. alterniflora* suffered higher oxidative stress in upper and middle estuary, respectively; The State of São Paulo changes have suffered greater stress in the area of sewage

Key words: Lipid peroxidation, Cell signaling, Eutrophication.

INTRODUÇÃO GERAL

As macrófitas aquáticas são amplamente distribuídas em diversos ecossistemas do planeta, possuem grande diversidade filogenética, taxonômica e, em sua maioria, são pertencentes a um grupo de vegetais terrestres que foram ao longo do processo evolutivo conquistando o ambiente aquático (Thomaz & Cunha, 2010). Algumas espécies, no decorrer deste processo evolutivo adaptaram-se aos ambientes salobros e conquistaram os ecossistemas costeiros (estuários). As espécies localizadas nestes ecossistemas estão amplamente dispersas devido aos gradientes ambientais que se formam através da disponibilidade de nutrientes, tipo de sedimento, velocidade de corrente, nível de água e salinidade (Ribeiro et al., 2009; Cancian, 2012). Estes são fatores que geralmente estão relacionadas com padrões de distribuição das macrófitas, pois proporcionam diferentes habitats para a ocupação da vegetação aquática (Barendregt & Bio, 2003; Begon et al., 2007).

As macrófitas aquáticas *Crinum americanum* (Amaryllidaceae) e *Spartina alterniflora* (Poaceae) são as principais espécies que ocorrem na região do estuário da bacia do rio Itanhaém (litoral sul do estado de São Paulo) e estão distribuídas ao longo de um gradiente de salinidade. *C. americanum* ocorre na região do alto estuário e forma bancos monoespecíficos em águas oligohalinas e doces e encontra-se próximo à vegetação de restinga (Figura 1A). *S. alterniflora* forma bancos monoespecíficos próximos à vegetação de manguezal, na região do baixo estuário, ocorrendo em sedimento com valores mais elevados de salinidade (Figura 1B) (Nunes & Camargo 2016). No médio estuário estas duas espécies formam bancos mistos em salinidade intermediária (Figura 1C) (Bonocchi, 2006).

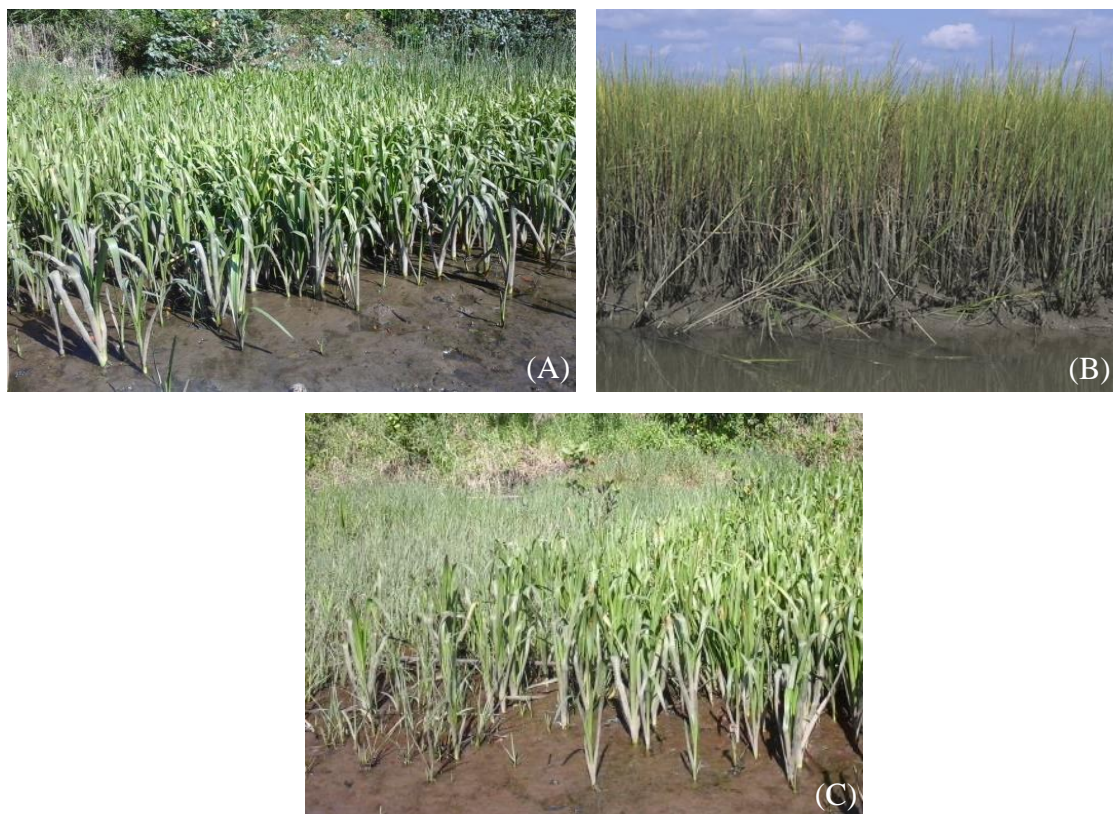


Figura 1: (A) Banco monoespecífico de *C. americanum* em alto estuário; (B) Banco monoespecífico de *S. alterniflora* em baixo estuário; (C) Banco misto das duas espécies em médio estuário (Fotos de autoria própria).

C. americanum e *S. alterniflora* são duas espécies emergentes que encontram-se enraizadas no sedimento. Estas e outras espécies de macrófitas são importantes por, muitas vezes, exercerem papel fundamental na ciclagem de nutrientes e na produtividade primária nos ambientes de sua ocorrência, contribuindo para formação de nichos ecológicos, uma vez que diversas espécies de animais encontram abrigo e fonte de alimentação nestes bancos (ScreminDias et al., 1999; Bianchini Jr. et al, 2002; Thomaz & Cunha, 2010). Entretanto, nos ambientes estuarinos a salinidade pode tornar-se uma variável capaz de provocar estresse à planta (Greenwood & Macfarlane, 2008) comprometendo seu desempenho através de déficit de água, toxidez provocada por íons, desequilíbrio nutricional (Munns & Termaat 1986) e indiretamente mediando competições inter-específicas (Pennings & Callaway 1992).

Nos estuários podem ocorrer também entrada de contaminantes derivadas do escoamento continental e entrada marinha (Jingchun et al. 2010), procedentes das aglomerações urbanas, portos e atividades agrícolas que aumentam os impactos nestes ambientes. Assim, estas áreas que recebem substâncias contaminantes, como os esgotos urbanos que são ricos em nutrientes podem levar ao processo de eutrofização do ambiente e mudança na composição das macrófitas aquáticas (Biudes & Camargo, 2006).

Tanto as características naturais de gradientes espaciais e ampla variação temporal da salinidade, quanto à entrada de nutrientes nos estuários desencadeiam diferentes respostas nos vegetais. Estas respostas podem ser de ordem morfológica (Esteves & Suzuki, 2008), fisiológica (Nilsen & Orcutt, 1966) ou bioquímica (Wang & Nil 2000; Gratão et al, 2005), e podem levar o organismo vegetal ao estado de estresse oxidativo (Gratão et al, 2005).

Evolutivamente o estresse oxidativo nos organismos aeróbicos iniciou-se com a respiração celular devido o acúmulo de oxigênio molecular (O_2) na atmosfera da Terra, o que permitiu a evolução de organismos aeróbicos, que utilizaram o O_2 como acceptor final de elétrons, proporcionando assim um rendimento de energia maior em comparação com a fermentação e respiração anaeróbica (Scandalios, 1993).

No metabolismo celular, mais precisamente na mitocôndria, cloroplastos e peroxissomos (Bhattacharjee, 2010; Karuppanapandian et al, 2011), durante a redução de O_2 à água (H_2O) pode haver transferência de elétrons para O_2 , formando as espécies reativas de oxigênio (ERO), como os radicais superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 1).

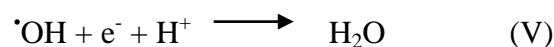
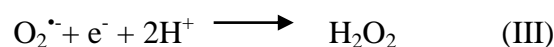
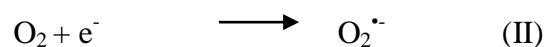


Figura 1: Terceira etapa da respiração, que ocorre no interior da mitocôndria: (I) Uma molécula de O_2 é reduzida a duas moléculas de H_2O , com consumo de 4 elétrons; (II) Redução do O_2 e formação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$); (III) Redução do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2); (IV) Redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e formação do radical hidroxila (OH^{\cdot}) e água; (V) Redução do radical hidroxila (OH^{\cdot}) e formação de água. (Barreiros et al 2006, modificado).

O aumento na produção das EROs desencadeia o estresse oxidativo e aciona o mecanismo de desintoxicação da célula. (Gratão et al, 2005). Este mecanismo é formado por antioxidantes, que formam um complexo bem organizado para o bom funcionamento de defesa do organismo vegetal (Rout & Shaw 2000), sendo capaz de prevenir o efeito cascata do estresse oxidativo, sanando os distúrbios bioquímicos impedindo danos mais severos à célula (Gratão et al., 2005; Hafsi et al., 2010).

Os antioxidantes celulares pertencem a dois grupos: os não-enzimáticos, que são os ácidos ascórbicos, glutathionas (GSH), vitaminas, flavonóides, alcalóides e carotenóides e β -caroteno (Gratão et al., 2005); e os enzimáticos, tais como, a superóxido dismutase, catalase. (Gratão et al 2012), bem como a glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e ascorbato peroxidase (Foyer & Noctor, 2005). Os radicais produzidos são rapidamente combatidos por esse mecanismo, o $O_2^{\bullet-}$ produzido é rapidamente convertido em H_2O_2 pela superóxido dismutase que está associada ao tilacóide, no cloroplasto (Allen, 1995). A superóxido dismutase é a primeira enzima de defesa a prevenir esses danos provocados pela EROs nas células (Alscher et al., 1997), regulam os níveis de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 que são substratos da reação que origina os radicais OH^{\bullet} , representando, dessa forma, o papel central no mecanismo de defesa antioxidante (Alscher et al., 2002). A catalase e/ou ascorbato peroxidase são as responsáveis em converter o H_2O_2 em H_2O , principalmente nos peroxissomos (Gratão et al 2005), já que a catalase está ausente nos tilacóides (Foyer et al 1994). As moléculas de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 que escapam da destruição nos tilacóides são destruídas no estroma pela superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, entre outras enzimas (Figura 1).

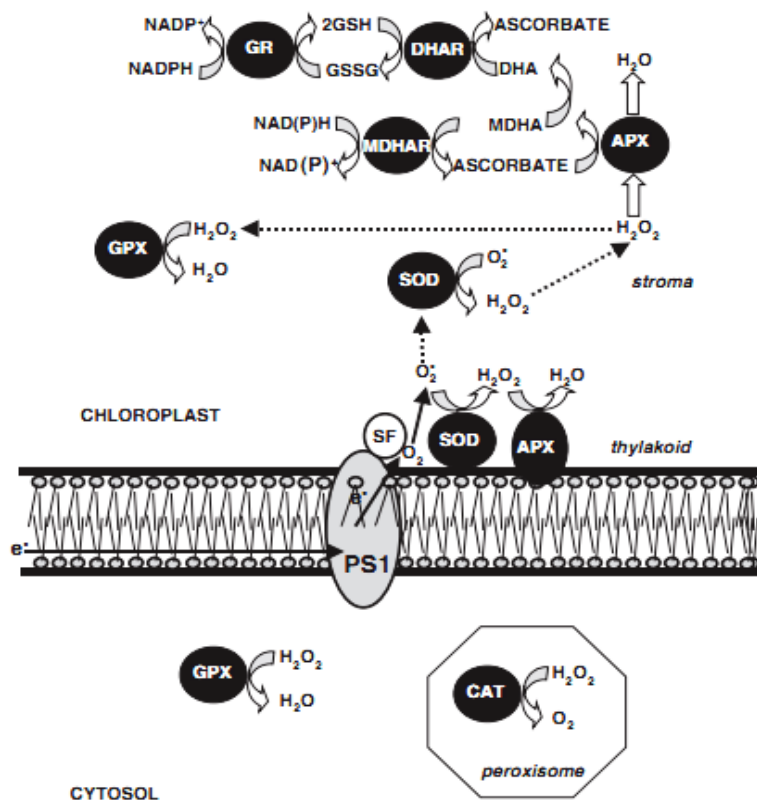


Figura 1: Remoção da EROs: SF, fator estromal; PS1, fotosistema I; GR, glutatona redutase; APX, peroxidase de ascorbato, GPX, peroxidase de glutatona; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; MDHAR, monodehidroascorbato redutase; DHAR, desidroascorbato redutase (Asada, 1999 modificado por Gratão et al 2005).

A superóxido dismutase juntamente com a catalase, glutatona peroxidase, glutatona redutase, ascorbato peroxidase, e os antioxidantes não enzimáticos formam um mecanismo que culminam na desintoxicação de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 da célula. (Gratão et al, 2005; Foyer & Noctor, 2005). Além disso, segundo alguns autores (Carvalho et al., 2010; Gratão et al.2012; Monteiro et al, 2012), o estresse oxidativo é também fortemente controlado por fitohormônios, participando na sinalização celular.

Dessa forma vemos que a célula vegetal apresenta inúmeras respostas quando exposta a presença exacerbada de H_2O_2 , que é um potencial gerador do radical OH^{\bullet} e assim transpor as membranas celulares facilmente (Barreiros et al., 2006). O radical OH^{\bullet} é considerado o mais oxidante dentre a ERO e sua alta reatividade resulta em reações rápidas e inespecíficas com

distintos substratos, podendo potencialmente reagir com todos os tipos de moléculas biológicas (Aguiar & Ferraz, 2007; Mylona & Polidoros, 2010). Além de poder ocasionar modificações nas bases nitrogenadas, levando à inativação ou mutação do DNA; desnaturação de proteínas, além de causar danos a moléculas de carboidratos e retirar átomos de hidrogênio de grupos metileno de ácidos graxos poli-insaturados, dando início à peroxidação lipídica (Blokhina et al., 2003; Barreiros, 2006). A ERO quando ataca a membrana celular resulta na degradação de pequenos fragmentos de hidrocarbonetos, como cetonas, malonaldeídos (MDA) ou outros produtos relacionados a lipoperoxidação lipídica (Halliwell & Gutteridge, 1999; Garg & Manchanda 2009). Alteração nos níveis de ERO também pode atuar como sinalizadores celulares para a regularização dos processos fisiológicos, como adaptação ao estresse abiótico, resistência a patógenos, tolerância cruzada ou morte celular programada (Gechev et al, 2005). Como a distribuição de *C. americanum* e *S. alterniflora* no estuário acontece em um gradiente de salinidade e *S. alterniflora* também ocorre em uma área de lançamento de esgoto, decidimos avaliar se a área com maior salinidade e com menores teores de nutrientes podem induzir o estresse oxidativo nas duas espécies. Dessa forma, dividimos nosso trabalho em dois capítulos.

Capítulo 1. Teve por objetivo avaliar o estresse oxidativo do *C. americanum* e *S. alterniflora* no gradiente de salinidade que constitui no alto, médio e baixo estuário da bacia do rio Itanhaém.

Capítulo 2. Teve por objetivo avaliar o estresse oxidativo da *S. alterniflora* em duas condições de nutrientes: região da foz e área com lançamento de esgoto na região do estuário do rio Itanhaém.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, A., Ferraz, A. 2007. Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. *Química Nova* 30: 623-628.
- Allen, R. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* 107: 1049–105.
- Alscher, R. G., Donahue, J. L., Cramer, C. L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiol Plant* 100: 224–23.
- Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany* 53: 1331-1341.
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141: 391-396.
- Barendregt, A. & Bio, A. M. F. 2003. Relevant variables to predict macrophytes communities in running waters. *Ecological Modelling* 160: 205-217.
- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., David, J. P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29: 113-123.
- Begon, M., Towsend, C. R. & Harper, J. L. 2006. *Ecology: from individuals to ecosystems*.
- Bhattacharjee, S. 2010. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfeld: Science Publishers, p 1-30.
- Bianchini Jr. I., Pacobahyba, L. D., Cunha-Santino, M. B. 2002. Aerobic and anaerobic decomposition of *Montrichardia arborescens* (L.) Schott. *Acta Limnologica Brasiliensia* 14: 3-27.
- Biudes, J. F. V., Camargo, A. F. M. 2006. Changes in biomass, chemical composition and nutritive value of *Spartina alterniflora* due to organic pollution in the basin of the River Itanhaém (SP, Brazil). *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, 66 (2): 781-789.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany* 91: 179-194.
- BONOCCHI, K. S. L. 2006. Dinâmica populacional das macrófitas aquáticas emersas *Spartina alterniflora*, *Crinum procerum* e *Scirpus californicus*, na Bacia do rio Itanhaém, SP. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências -Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Cancian, L. F.; Camargo, A. F. M. 2011. Utilização de Sistemas de Informações Geográficas, softwares e algoritmos de modelagem para geração de modelos de distribuição geográfica

potencial de espécies de macrófitas aquáticas em bacias hidrográficas. *Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia* 39: 04.

Carvalho, R.F., Quecini, V., Peres, L. E. P. 2010. Hormonal modulation of photomorphogenesis-controlled anthocyanin accumulation in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) hypocotyls: physiological and genetic studies. *Plant science*, 178: 258-264.

Foyer, C. H., Lelandais, M., Kunert, K. J. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92: 696-717.

Foyer, C. H., Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875.

Garg, N., Manchanda, G. 2009. ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosys* 143: 8-96.

Gechev, T. S., Gadjev, I., Dukiendjiev, S., Minkov, I. 2005. Reactive oxygen species as signaling molecules controlling stress adaptation in plants. In: Pessaraki M (ed) *Handbook of photosynthesis*. CRC, Boca Raton 2: 209–218.

Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P.J., Azevedo, R.A. 2005: Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* 32: 481–494.

Gratão, P.L., Monteiro, C.C., Carvalho, R.F., Tezotto, T., Piotto, F.A., Peres, L.E.P., Azevedo, R.A. 2012. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. - *Plant Physiol. Biochem.* 56: 79- 96.

Greenwood, M. E., Macfarlane, G. R. 2009. Effects of salinity on competitive interactions between two juncus species. *Aquatic Botany* 90: 23-29.

Hafsi, C., Romero-Puertas, M. C., Gupta, D. K., Luis, A., Sandalio, L. M., Abdely, C. 2010. Moderate salinity enhances the antioxidative response in the halophyte *Hordeum maritimum* L. under potassium deficiency. *Environmental and Experimental Botany* 69: 129-136.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press: New York. 3rded.

Jingchun, L., Chongling, Y., Spencer, K.L., Ruifeng, Z., Haoliang, L. 2010. The distribution of acid-volatile sulfide and simultaneously extracted metals in sediments from a mangrove forest and adjacent mudflat in Zhangjiang Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin* 60: 1209–1216.

Karuppanapandian, T., Moon, J. C., Kim, C., Manoharan, K., & Kim, W. 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science* 5:709.

- Monteiro, C.C., Rolão, M.B., Franco, M.R., Peters, L.P., Cia, M.C., Capaldi, F.R., Carvalho, R.F., Gratão, P.L., Rossi, M.L., Martinelli, A.P., Peres, L.E.P., Azevedo, R.A. 2012. Biochemical and histological characterization of tomato mutants. - An. Acad. Bras. Cienc. 84: 573-585.
- Munns, R., & Termaat, A. (1986). Whole-plant responses to salinity. *Functional Plant Biology*, 13(1), 143-160.
- Mylona, P. V., Polidoros, A. N. 2011. ROS regulation of antioxidant genes. *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants* 101p.
- Nunes, L. S. C., Camargo, A. F. M. 2016. Do interspecific competition and salinity explain plant zonation in a tropical estuary? *Hydrobiologia* 1-11.
- Pennings, S. C., Callaway, R. M. 1992. Salt marsh plant zonation: the relative importance of competition and physical factors. *Ecology* 73: 681-690.
- Ribeiro, J. P. N., Matsumoto, R. S., Takao, L. K., Voltarelli, V. M., & Lima, M. I. S. 2009. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum* L. *Revista Brasileira de Botânica* 32(1): 183-188.
- Rout, N. P., Shaw, B. P. 2001. Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes. *Plant Science*, 160(3), 415-423.
- Scandalios, J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101: 7-12.
- Scremin-Dias, E., Pott, J. V., Hora, R. C., Souza, P. R. 1999. Nos jardins submersos da Bodoquena: guia para identificação de plantas aquáticas de Bonito e região. Ed. UFMS. 160 p.
- Thomaz, S. M., Cunha, E. R. 2010. The role of macrophytes in habitat structuring in aquatic ecosystems: methods of measurement, causes and consequences on animal assemblages composition and biodiversity. *Acta Limnologica Brasiliensia* 22: 218-236.
- Wang, Y., Nil, N. 2000. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75: 623-627.

CAPÍTULO 1

ESTRESSE OXIDATIVO EM DUAS ESPÉCIES DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS EM UM ESTUÁRIO DE REGIÃO NEOTROPICAL

Resumo: O estresse oxidativo causado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é uma das respostas que as plantas apresentam enfrentando estresse ambiental. Nosso objetivo foi caracterizar o estresse oxidativo de macrófitas aquáticas *Crinum americanum* e *Spartina alterniflora* que ocorrem em um gradiente de salinidade no estuário do rio Itanhaém (SP). Rochas e folhas (5 plantas) de *C. americanum* foram coletadas em três áreas (5 amostras / área), que constituem o estuário superior, médio e inferior. O material da planta para análise de clorofila (a + b), carotenóides, H_2O^2 , MDA e enzimas antioxidantes SOD e CAT foram condicionados em nitrogênio líquido imediatamente após serem removidos e depois armazenados em congelador a $-80^\circ C$ cada replica para avaliar o N e conteúdo F da planta e do sedimento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados indicam ausência de estresse salino em ambas as espécies. No entanto, observamos o estresse em *S. alterniflora* quando ocorre no médio estuário. Esse estresse observado em *S. alterniflora* pode ser devido à presença de substâncias potencialmente alelopáticas produzidas por *C. americanum* que podem ser um dos gatilhos para a peroxidação lipídica da membrana *S. alterniflora*, resultando em um maior teor de MDA nesta macrofita

Palavras chave: Tolerância, Adaptação, Alelopatia

Abstract: The oxidative stress caused by the production of reactive oxygen species (ROS) is one of the responses that plants exhibit facing environmental stress. Our objective was to characterize the oxidative stress of aquatic macrophytes *Crinum americanum* and *Spartina alterniflora* that occur in a salinity gradient in the estuary of the Itanhaém River (SP). Roots and leaves (5 plants) of *C. americanum* were collected in three areas (5 samples / area), which constitute the upper, middle and lower estuary. The plant material for analysis of chlorophyll (a + b), carotenoids, H₂O₂, MDA and antioxidant enzymes SOD and CAT were conditioned in liquid Nitrogen immediately after being removed and then stocked in freezer at -80 ° C. Plant material was also sampled in each replicate to evaluate the N and F content of the plant and the sediment. The data were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and compared by the Tukey test (p <0.05). The results indicate absence of saline stress in both species. However, we observed stress in *S. alterniflora* when it occurs in the middle estuary. This stress observed in *S. alterniflora* may be due to the presence of potentially allelopathic substances produced by *C. americanum* that may be one of the triggers for the lipid peroxidation of the *S. alterniflora* membrane resulting in a higher MDA content in this macrophyte.

Key words: Tolerance, Adaptation , Allelopathy

INTRODUÇÃO

Os gradientes de salinidade que ocorrem nos estuários formam um ambiente propício para, reprodução, creche e recrutamento de numerosas espécies de organismos aquáticos (Kennish, 1992; Thomaz & Esteves, 2011). Dentre esses, as macrófitas aquáticas também exercem uma papel importante na dinâmica dos ecossistemas aquáticos, são fundamentais na ciclagem de nutrientes, nas cadeias tróficas, aumentam a complexidade estrutural de habitats e a diversidade biológica, fornecendo habitat para diversas espécies de animais aquáticos (Scremin-Dias et al., 1999; Thomaz & Esteves, 2011). A distribuição de espécies de macrófitas são determinadas por muitos fatores como temperatura, intensidade da luz, fluxo de corrente e disponibilidade de nutrientes (Bini, et al., 1999; Thomaz et al., 1999) e em estuários a salinidade é um dos principais fatores responsáveis pela distribuição (Howard & Meldessohn 1999).

Crinum americanum (Amaryllidaceae) e *Spartina alterniflora* (Poaceae) são duas espécies de macrófitas aquáticas emergentes que ocorrem em estuários da região neotropical (Ribeiro et al, 2009). Estas duas espécies são enraizadas no sedimento e possuem estruturas reprodutivas e parte das folhas emersas. As espécies do gênero *Crinum* L. tem sementes adaptadas à dispersão pelo oceano (Arroyo & Cutler, 1984) e *S. alterniflora* é bem adaptada a uma vasta escala de salinidade pois, possui glândulas salinas para excreção de NaCl através das folhas (Esteves & Suzuki, 2008).

Em um gradiente de salinidade do estuário do rio Itanhaém, *S. alterniflora* ocorre em áreas do baixo estuário, *C. americanum* ocorre predominantemente no alto estuário e ambas espécies foram bancos mistos no médio estuário (Nunes & Camargo, 2016). Embora apresente características de adaptação a ambientes salobros *C. americanum* é uma espécie vegetal que frequentemente ocorre em ambientes de baixa ou ausência de salinidade (Pott e Pott, 2000). Howard e Mendelsohn (1999) relataram que as espécies sensíveis morrem com o aumento da exposição à salinidade, as relativamente tolerantes à salinidade tem os seus tecidos foliares e radiculares danificados. Já as espécies de plantas tolerantes podem habitar locais com salinidade elevada e moderada. Acreditamos que as condições ambientais encontradas nos estuários, levam as macrófitas aquáticas a sobreviverem sob constante estresse oxidativo e que as condições adversas encontradas em um gradiente de salinidade podem favorecer estratégias como escape ou

tolerância (Touchette et al. 2009; Gratão et al, 2008). A tolerância à salinidade pode ocorrer através de ajustes osmóticos (Flowers e Colmer, 2008), modificações morfológicas ou fisiológicas (Lacher, 2003) como ajustes nas respostas de proteção ao estresse (Gratão et al, 2005). Dessa forma, o gradiente de salinidade presente ao longo do estuário do rio Itanhaém pode tornar-se uma condição adversa capaz de sobrecarregar o organismo vegetal, favorecendo a oxidação descontrolada, que através da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) promove o estresse oxidativo (Gratão et al., 2005).

O estresse oxidativo pode favorecer a produção do ácido malonaldeído (MDA), um subproduto da lipoxidação, resultante do ataque à membrana celular provocado pelo estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 1999). Entretanto, a acumulação de ERO em macrófitas aquáticas que vivem nestes ambientes salinos pode ser controlada pelo sistema de defesa antioxidante, que compreende nas enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), responsável em converter O_2^- em H_2O_2 (Gratão et al, 2005). A produção excessiva de H_2O_2 , que é um indicador de estresse, é convertida em H_2O pela ação de uma série de enzimas tais como catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidases do tipo guaiacol (GPOX) (Hippler et al. 2015; Liu et al., 2015; Roychoudhury et al., 2012), além de um complexo mecanismo não-enzimático (Foyer e Noctor 2013). Em alguns casos, a elevação moderada ou transitória de H_2O_2 pode agir como sinalizador celular, regulando as funções fisiológicas do organismo vegetal frente ao estresse ambiental (Pitzschke et al., 2006 del-Rio 2015).

Dessa forma, nosso objetivo foi avaliar as respostas de H_2O_2 e MDA utilizados como indicativos do estresse oxidativo, bem como as enzimas SOD e CAT de *C. americanum* e *S. alterniflora* no gradiente de salinidade ao longo do estuário do rio Itanhaém.

Hipóteses:

- *C. americanum* apresenta maior estresse oxidativo devido a maior salinidade em médio estuário.
- *S. alterniflora* apresenta maior estresse oxidativo devido a maior salinidade em baixo estuário.

MATERIAL E MÉTODOS

- Área de estudo e coleta de campo

O estuário do rio Itanhaém está localizado no litoral sul do estado de São Paulo (Figura 1). O sistema hidrológico da região é influenciado pelo regime de marés, apresentando mistura de água doce e salgada que forma um gradiente de salinidade nos rios (Cancian, 2012), formando áreas favoráveis ao desenvolvimento de macrófitas aquáticas (Henry-Silva & Camargo, 2000). O sedimento do estuário possui diferentes valores de salinidade e de concentrações de nitrogênio total (NT) e fósforo total (NT) (Nunes & Camargo, 2016). A região é marcada pela pequena amplitude de variação sazonal das características climáticas e limnológicas, pela ausência de pulsos de inundação, e pela pequena variação do nível de água devido à influência das marés (amplitude máxima de 1,50 metros) e das chuvas em curtos períodos (Camargo & Florentino, 1999).

O regime climático, conforme classificação de Köppen é *Af* tropical úmido e não apresenta estação seca. A temperatura média anual é de 24°C, com temperatura mínima média do dia de 13,3°C (em julho) e temperatura máxima média do dia de 34,4° (em fevereiro). As chuvas ocorrem na região em cerca de 170 dias por ano, podendo o índice pluviométrico anual ultrapassar 2000 mm (Itanhaém, 2011).

A região superior do estuário possui características naturais pois, as nascentes dos rios estão localizadas em uma área de conservação (Parque Estadual da Serra do Mar) e apenas algumas áreas agrícolas (fazendas de banana) ocorrem à montante do estuário. A região intermediária do estuário está localizada também em área com pequenos impactos ambientais e a vegetação terrestre predominante é de Mata de Restinga. A região inferior do estuário (0-5 Km) é coberta por vegetação de manguesal e está submetida a maiores impactos devido à proximidade da área urbana do município de Itanhaém (Sant'anna et al, 2007).



Figura 1: Mapas da América do Sul (A); Estado de São Paulo (B) e o estuário do rio Itanhaém (C). As setas pretas indicam a localização das regiões dos bancos monoespecíficos de *S. alterniflora* no baixo estuário (1), bancos mistos de *S. alterniflora* e *C. americanum* no médio estuário (2) e bancos monoespecíficos de *C. americanum* no alto estuário (3) (Nunes & Camargo, 2016).

Nós escolhemos três áreas ao longo do estuário da bacia do rio Itanhaém para avaliar o estresse das duas espécies de macrófitas aquáticas. Uma área localizada na região de alto estuário (rio Branco) com a presença de bancos monoespecíficos de *C. americanum*, uma área localizada no médio estuário, com a presença de bancos mistos de *C. americanum* e *S. alterniflora* e uma área no baixo estuário com a presença de bancos monoespecíficos de *S. alterniflora*. O estudo foi realizado em novembro de 2016. Nas três áreas nós coletamos amostras das macrófitas em cinco locais próximos para determinação da biomassa e dos teores de NT e PT na biomassa. Além disso coletamos cinco amostras de sedimento para determinação da salinidade. Utilizamos os teores de NT e PT do sedimento do trabalho recentemente realizado por Nunes e Camargo (2016) nos mesmos locais. Realizamos também a coleta de sete gramas de folhas e raízes jovens de cada espécie em cada área para a quantificação das enzimas antioxidantes. Após a lavagem do material

acondicionamos as amostras em papel alumínio e inserimos em N₂ líquido, em campo e, posteriormente armazenamos em freezer a -80 °C.

- Análises Laboratoriais

Obtivemos a salinidade do sedimento diluindo três gramas de massa fresca do sedimento em 100 mL de água destilada e obtendo o teor de sais através de aparelho salinômetro Corning PS 18. Secamos as plantas em estufa a 60°C e, posteriormente, fizemos a trituração do material seco para determinarmos as concentrações de NT (%MS) pelo método Kjeldahl (Allen et al. 1974) e de PT (%MS) pelo método descrito por Esteves (1980).

Para determinamos a peroxidação lipídica (MDA) estimamos o conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) seguindo o método de Heath e Packer (1968), com resultado expresso em nMol/g de matéria fresca. Realizamos a quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) através da reação de iodeto de potássio (KI), segundo Alexieva et al (2001) e o resultado foi expresso em µmol/g de matéria fresca. A extração seguiu o mesmo protocolo de MDA.

Para a extração protéica maceramos as raízes e folhas em um almofariz com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1mM de EDTA (0,372 g/L tampão), 3 mM de diclorodifeniltricloroetano (DTT) (0,462 g/L tampão) e 4% (p/v) de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). Centrifugamos o homogeneizado à 10.000 rpm por 30 min à 4°C. Coletamos o sobrenadante e o dividimos em alíquotas que foram estocadas em freezer (-80°C) até o momento das análises. Para a determinação da concentração de proteínas totais usamos o método de Bradford (1976) e utilizamos o Software Alliance (BSA) como padrão.

Determinamos a atividade da enzima catalase (CAT) em espectrofotometria como descrito por Kraus et al. (1995) com algumas modificações conforme Azevedo et al. (1998) a 25°C em uma mistura de reação contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM) pH 7,5 contendo 2,5 µL de H₂O₂ (solução de 30%). Iniciamos a reação pela adição de 25 µL de extrato seguindo-se da decomposição de H₂O₂ por 1 minuto através das alterações na absorbância a 240 nm e os resultados foram expressos em µmol/min/mg de proteína.

Determinamos a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de acordo com o método de Giannopolitis e Ries (1977) em espectrofotometria. Conduzimos a reação em uma câmara de reação sob iluminação fluorescente de 15 W a 25°C. Adicionamos 50 µL de amostra extraída e já descongelada em um meio de reação de 5ml, contendo tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), 50mM metionina, 1 mM tetrazólio nitroazul (NBT), 10 mM etileno-diaminotetracético (EDTA) e 0,1 mM riboflavina. Iniciamos a reação na câmara de reação em de luz por 5 minutos. Realizamos a medida em espectrofotometria a 550 nm e os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína.

Para a extração de pigmentos fotossintéticos nós utilizamos aproximadamente 0,025 g de tecido foliar conservado em freezer (-80°C) de ambas as espécies que colocamos em Eppendorf protegido da luminosidade e contendo 2 mL de acetona a 80%. Colocamos as amostras em geladeira por 48 horas a 4°C e em seguida realizamos a leitura em espectrofotômetro a 470 nm para carotenoides; 647nm e 663 nm para clorofila A e B.

$$Cl a = [(12,7 * A_{663} - 2,69 * A_{645}) * V] / 1000 * W$$

$$Cl b = [(22,9 * A_{645} - 4,68 * A_{663}) * V] / 1000 * W$$

$$Cl total = [(A_{652} * 1000) * (V / 1000 * W)] / 34,5$$

$$Car = [(1000 * A_{470} - 3,27 * Cl a - 104 * Cl b) / 229] / 1000 * W$$

Onde: A = absorvância no comprimento de onda indicado

V = volume final (mL) do extrato (pigmentos + solução extratora)

W = tecido foliar (g) do material vegetal utilizado

Observação: Teor expresso em mg de pigmento por g de tecido fresco (mg g⁻¹).

- Análise estatística

Utilizamos os bancos de macrófitas como variáveis resposta e as variáveis limnológicas e de caracterização do estresse como variáveis preditoras. Primeiramente, submetemos os dados ao teste de Cramer-Von-Misses e Bartlett, para verificação da normalidade do resíduo e homocedasticidade da variância dos dados, respectivamente. Após o atendimento destas premissas, submetemos os dados à análise de variância (ANOVA). Quando houve diferenças entre os grupos avaliados (p<0.05), utilizamos o teste de Tukey para comparação múltipla das médias com um intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

Os valores de salinidade dos sedimentos nos bancos localizados no estuário do rio Itanhaém foram significativamente diferentes ($P < 0.05$), com maior salinidade no baixo estuário, salinidade intermediária no médio estuário e menor salinidade no alto estuário (Tabela 1). Nós observamos diferenças significativas ($P < 0.05$) entre os valores de biomassa, tanto da parte emergente quanto subterrânea, das espécies entre as diferentes áreas. Os maiores valores de biomassa emergente e subterrânea foram observados na área localizada no alto estuário (Tabela 1). O teor de N-total e P-total foram significativamente maiores nas frações emergentes e subterrâneas de *C. americanum* na área do médio estuário. (Tabela 1).

Os dados de pigmentos fotossintéticos apresentaram diferenças significativas ($P < 0.05$) apenas para o teor de carotenóides que foi maior em *C. americanum* do que em *S. alterniflora*. O teor de clorofila *a + b* no alto, médio e baixo estuário não foram significativamente diferentes ($P > 0.05$) (Tabela 2).

Tabela 1: Valores médios (desvio padrão) da salinidade do sedimento, biomassa (gMS.m^{-2}) e teor (%) de NT e PT nas frações emergentes e submersas de *C. americanum* e *S. alterniflora* no alto, médio e baixo estuário do rio Itanhaém/SP.

| | Alto estuário | Médio estuário | | Baixo estuário |
|-------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------|
| | <i>C. americanum</i> | <i>C. americanum</i> | <i>S. alterniflora</i> | <i>S. alterniflora</i> |
| <i>Salinidade</i> | 8.2 \pm 0.45c | 13.2 \pm 1.92 b | 13.2 \pm 1.92 b | 17.5 \pm 0.87 a |
| <i>Biomassa emergente</i> | 2694 \pm 626.10 a | 912.46 \pm 90.99 b | 533.30 \pm 55.95 c | 674.67 \pm 58.43 c |
| <i>Biomassa subterrânea</i> | 2331.52 \pm 259.22 a | 1491.52 \pm 154.85 b | 1019.21 \pm 221.18 c | 1235.43 \pm 220.55 bc |
| | <i>Emergente/Subterrânea</i> | | | |
| <i>N-total (% massa seca)</i> | 1.64 \pm 0.06 b / 0.89 \pm 0.12 b | 1.73 \pm 0.09 a / 1.19 \pm 0.10 a | 1.24 \pm 0.10 b / 0.84 \pm 0.15 b | 1.03 \pm 0.70 c / 0.70 \pm 0.04 b |
| <i>P-total (% massa seca)</i> | 0.078 \pm 0.005 b / 0.064 \pm 0.009 b | 0.093 \pm 0.009 a / 0.082 \pm 0.004 a | 0.055 \pm 0.006 c / 0.046 \pm 0.005 c | 0.044 \pm 0.005 c / 0.030 \pm 0 d |

Tabela 2: Valores médios (desvio padrão) de clorofila *a + b* e carotenoide (mg.g^{-1}) presentes na fração emergente de *C. americanum* e *S. alterniflora* no alto, médio e baixo estuário do rio Itanhaém/SP

| | Alto estuário | Médio estuário | Baixo estuário |
|----------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| | <i>C. americanum</i> | <i>C. americanum</i> | <i>S. alterniflora</i> |
| Clorofila (<i>a + b</i>) | 1.056 \pm 0,238b | 2,216 \pm 2,415a | 1.193 \pm 0.021b |
| Carotenoide | 0.516 \pm 0.036 a | 0.53 \pm 0.032 a | 0.421 \pm 0.027 b |

A concentração do aldeído MDA (nmol/g de massa fresca) foi significativamente maior na fração emergente de *C. americanum* na área de alto estuário (Figura 2A). Na fração subterrânea de *C. americanum* não houve diferença nas concentrações de MDA (Figura 2B). A concentração de H_2O_2 ($\mu\text{mol/g}$ de massa fresca) também foi significativamente maior na fração emergente de *C. americanum* na área de alto estuário (Figura 3A). Na fração subterrânea a concentração de H_2O_2 em *C. americanum* foi maior em médio estuário (Figura 3B).

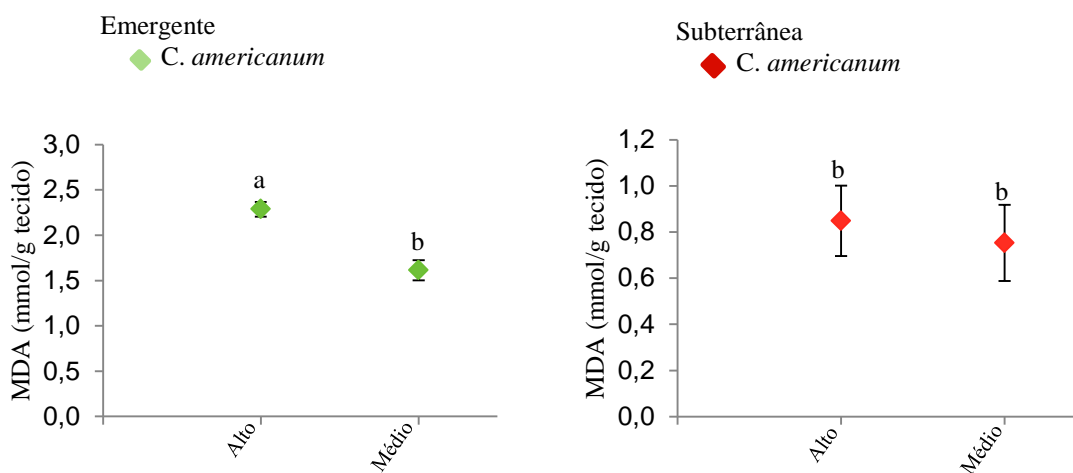


Figura 2: Concentração de MDA (nmol/g de massa fresca) na fração emergente (A) e subterrânea (B) de *C. americanum* nas áreas de alto e médio estuário.

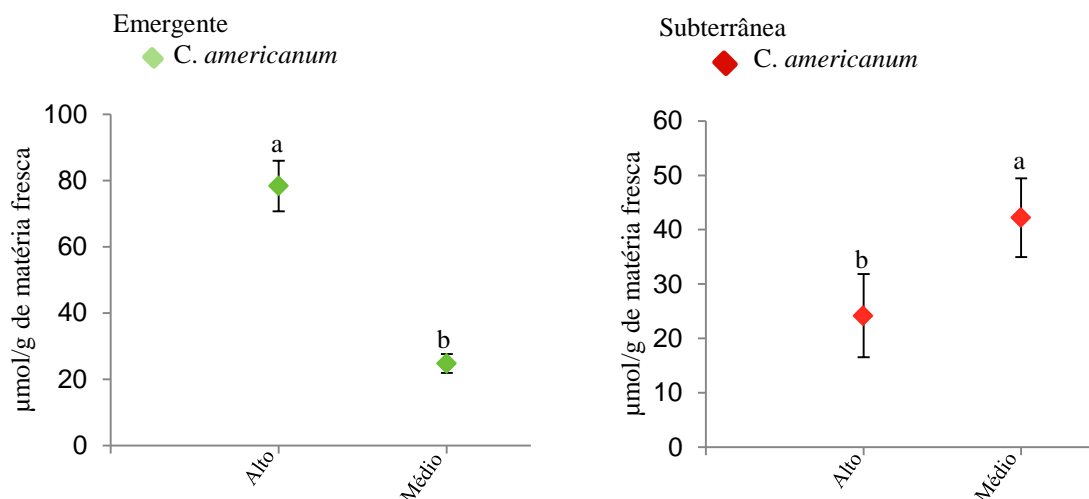


Figura 3: Produção de H₂O₂ (μmol/g de matéria fresca) na fração emergente (A) e subterrânea (B) de *C. americanum* nas áreas de alto e médio estuário.

Em relação *S. alterniflora* nós não observamos diferenças nas concentrações de MDA na fração emergente nas duas áreas (Figura 4A). No entanto, para a fração subterrânea de *S. alterniflora*, o conteúdo de MDA foi significativamente maior na área de médio estuário (Figura 4B). Em relação à fração emergente de *S. alterniflora* nós não observamos diferenças nas concentrações de H₂O₂ nas duas áreas (Figura 5A). No entanto, para a fração subterrânea de *S. alterniflora*, o conteúdo de H₂O₂ foi significativamente maior na área baixo estuário (Figura 5B).

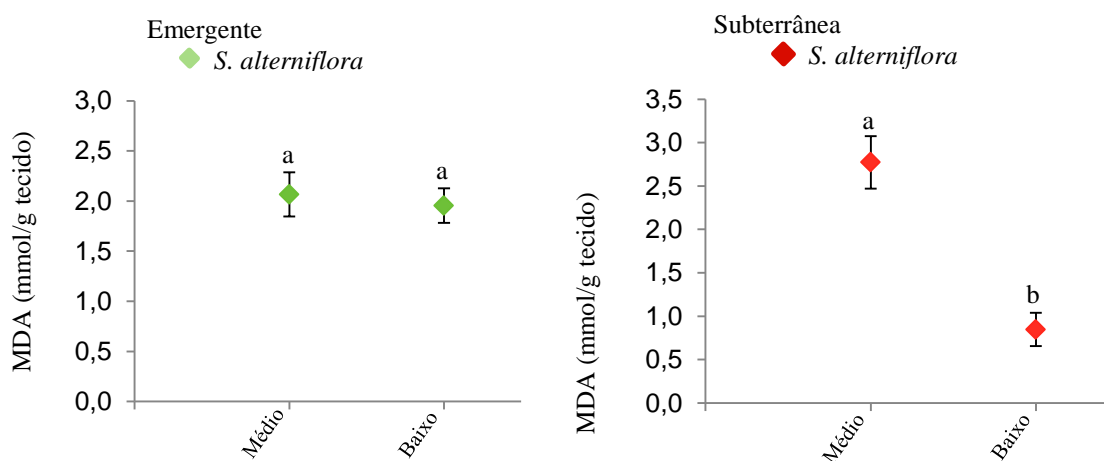


Figura 4: Concentração de MDA (nmol/g de massa fresca) na fração emergente (A) e subterrânea (B) de *S. alterniflora* nas áreas de médio e baixo estuário.

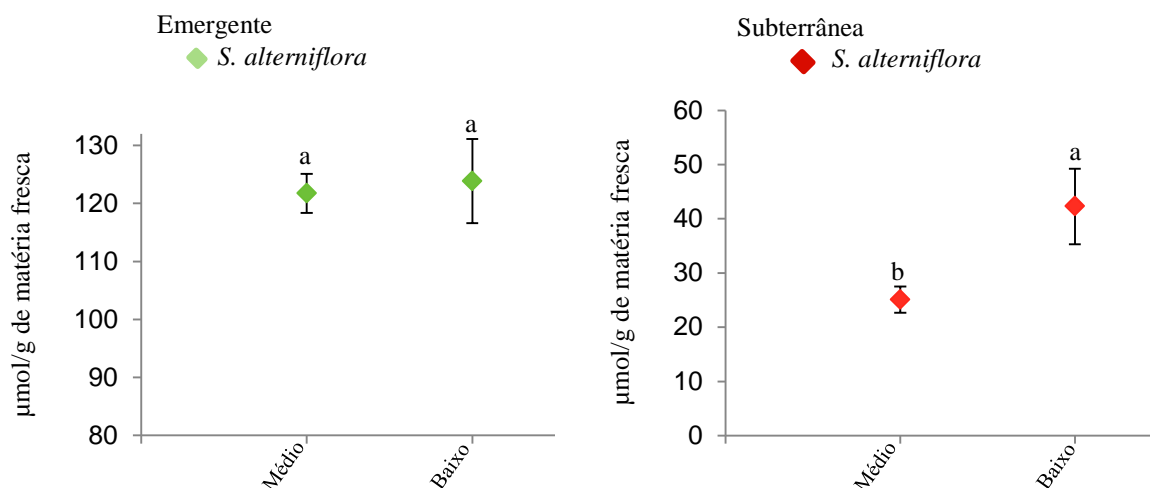


Figura 5: Produção de H₂O₂ (μmol/g de matéria fresca) na fração emergente (A) e subterrânea (B) de *S. alterniflora* nas áreas de médio e baixo estuário.

A atividade da SOD (U SOD/mg de proteína) foi maior na fração emergente de *C. americanum* na área de alto estuário (Figura 6A). Na fração subterrânea, a atividade da SOD de *C. americanum* foi maior na área de médio estuário (Figura 6B). A atividade de CAT (μM/min/mg de proteína) também foi maior na fração emergente de *C. americanum* na área de alto estuário (Figura 7A). Na fração subterrânea de *C. americanum* nós não observamos diferenças na atividade de CAT nas duas áreas (Figura 7B).

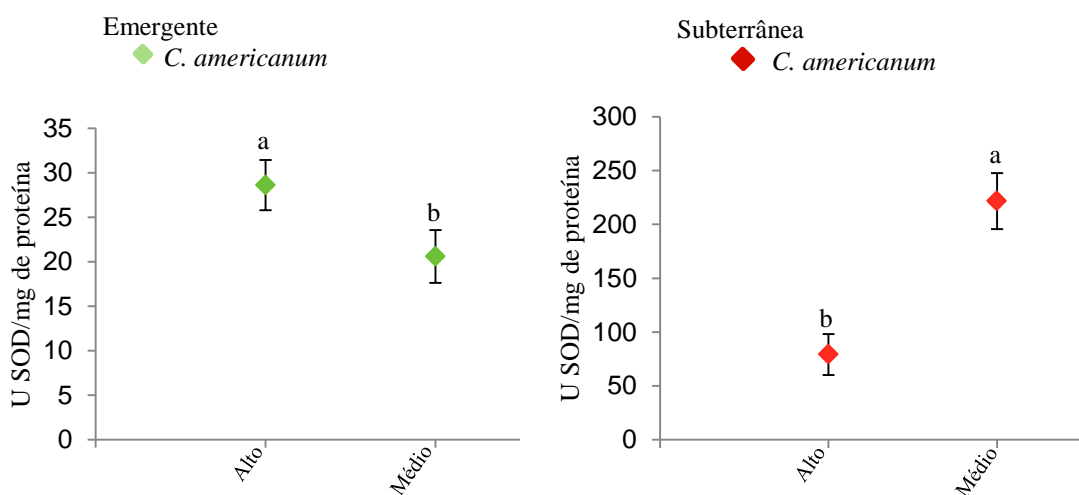


Figura 6: Atividade da SOD (U SOD/mg de proteína) na fração emergente (A) e subterrânea (B) de *C. americanum* nas áreas de alto e médio estuário.

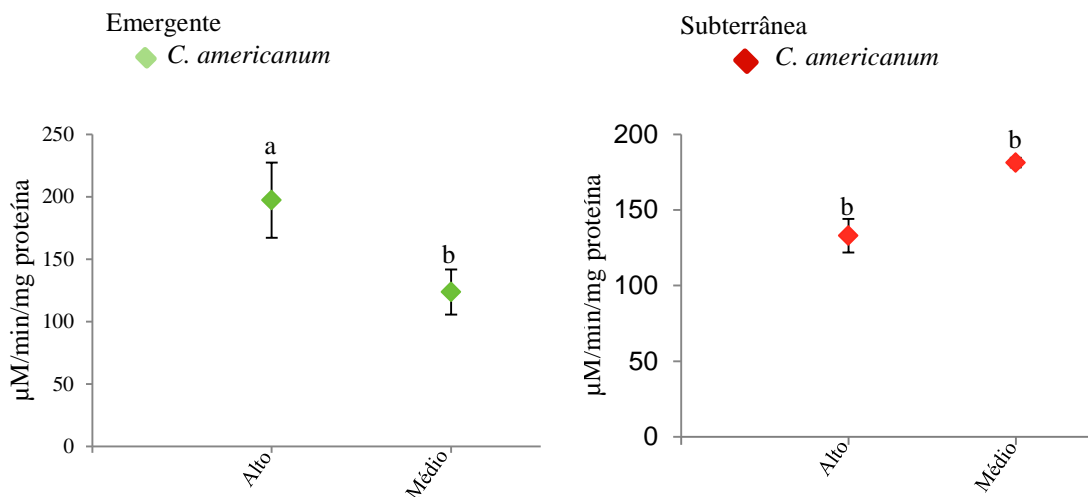


Figura 7: Atividade da CAT ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) na fração emergente (A) e subterrânea (B) de *C. americanum* nas áreas de alto e médio estuário.

Em relação *S. alterniflora* nós não observamos diferenças na atividade de SOD na fração emergente das duas áreas (Figura 8A). No entanto, para a fração subterrânea de *S. alterniflora* o conteúdo de SOD foi maior na área de médio estuário (Figura 8B). Do mesmo modo, em relação à fração emergente de *S. alterniflora* nós não observamos diferenças na atividade de CAT, nas duas áreas (Figura 9A). No entanto, para a fração subterrânea a atividade de CAT em *S. alterniflora* foi maior na área do médio estuário (Figura 9B).

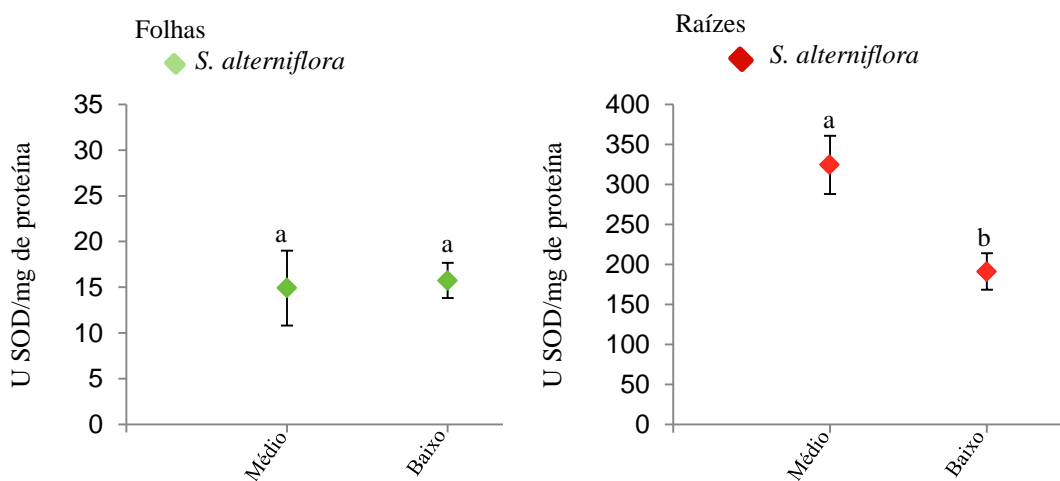


Figura 8: Atividade da SOD (U SOD/mg de proteína) na fração emergente e subterrânea de *S. alterniflora* nas áreas de alto, médio e baixo estuário.

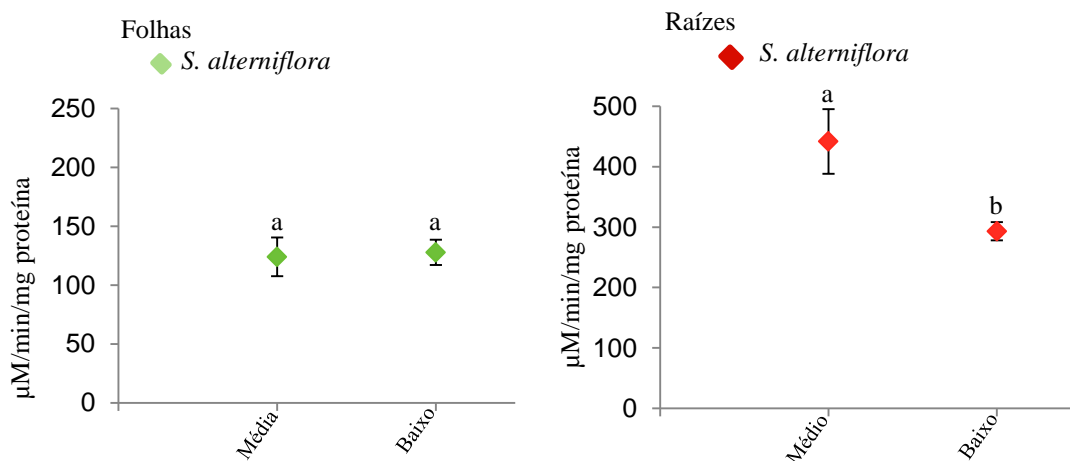


Figura 5: Atividade da CAT ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) na fração emergente e subterrânea de *S. alterniflora* nas áreas de alto, médio e baixo estuário.

DISCUSSÃO

Nossos dados mostram que o estresse oxidativo indicado pela concentração de MDA em *C. americanum* e *S. alterniflora* não foram provocados pelo gradiente de salinidade presente no estuário do rio Itanhaém. Isso mostra que nossos resultados não corroboram com nossa hipótese inicial.

A fração emergente de *C. americanum* na área do alto estuário apresentou maior concentração de MDA que a área de médio estuário, indicando que as macrófitas em alto estuário apresentaram maior sensibilidade ao meio e sofreram maior estresse nessa condição ambiental. O MDA indica a ocorrência de dano celular, pois é um subproduto da lipoxidação, que é resultante do ataque à membrana celular (Halliwell & Gutteridge, 1999), mostrando que mesmo com as altas atividades de SOD e CAT, unido aos demais componentes do mecanismo antioxidante não foram suficientes para minimizar a produção do MDA. A concentração de H_2O_2 na fração emergente do *C. americanum* do alto estuário também indica que nesta condição ambiental o H_2O_2 exerceu um papel importante no estresse oxidativo, principalmente por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical OH^\bullet que é responsável ao ataque à membrana (Barreiros et al., 2006). Este resultado não era o esperado, pois esperávamos maior estresse em *C. americanum* localizado na área de médio estuário que é submetido a maior influência

salina. No entanto, isto pode ter ocorrido pelo fato do alto estuário possuir menores teores de NT e PT no sedimento com base nos dados obtidos por Nunes e Camargo (2016). Nós observamos menores teores destes nutrientes nas frações emergentes e subterrâneas do vegetal em comparação com a área do médio estuário. Além disso, embora *C. americanum* ocorra frequentemente em ambientes de pequena ou ausência de salinidade (Pott e Pott, 2000), fica evidente que a condição ecológica ótima para uma espécie nem sempre coincide com o seu ótimo fisiológico, como também foi observado por Barbour (1978).

Os teores de NT e PT do sedimento foram maiores no médio estuário o que promoveu maior incorporação destes nutrientes na fração emergente e subterrânea de *C. americanum*. Além disso, as menores concentrações de MDA nas folhas e raízes de *C. americanum* no médio estuário em comparação com o alto estuário indicam menor estresse oxidativo na área do médio estuário. Com, isso, a baixa concentração de MDA nos mostra que a concentração de H₂O₂ na fração emergente e subterrânea de *C. americanum* não teve efeito negativo para a planta. Alguns estudos relatam que o H₂O₂, quando presente em concentrações não tóxicas ao organismo vegetal integra vias de sinalização envolvidas na manutenção do crescimento da planta, desenvolvimento, ação dos hormônios (Mittler 2002, Mittler et al., 2011, Baxter et al., 2014), tolerância (Touchette et al. 2009) e outros fenômenos fisiologicamente importantes como defesa de patógenos, morte celular programada, comportamento estomático, respostas a estresses bióticos e abióticos (del-Rio 2015).

A biomassa de *C. americanum* foi menor em médio estuário, o que pode estar associado com o fato desta espécie ocorrer preferencialmente em ambientes de baixa ou sem salinidade (Pott e Pott, 2000). Além disso, os teores de carotenoides nas folhas de *C. americanum* foram maiores na área de médio estuário. O aumento do teor desse pigmento nas plantas submetidas a maiores valores de salinidade ocorre provavelmente porque os carotenoides podem atuar como agentes antioxidantes (Edge et al, 1997), o que pode estar associado com o baixa concentração de MDA na fração emergente e subterrânea de *C. americanum* em médio estuário.

Com relação *S. alterniflora*, a fração subterrânea em médio estuário apresentou maior concentração de MDA quando comparado com a área do baixo estuário. Mesmo com a alta produção das enzimas SOD e CAT, o elevado teor de MDA indica menor eficiência

em outros mecanismos antioxidantes para *S. alterniflora* em médio estuário. Sob condições mais intensas de estresse, a taxa de geração de EROs, ou seja, de H_2O_2 , pode exceder o potencial de eliminação do sistema de defesa celular, resultando em estresse oxidativo (Ahanger et al, 2017). Isso pode indicar que a concentração de H_2O_2 teve maior toxicidade na fração subterrânea de *S. alterniflora* do médio estuário.

Como já informamos, os teores de NT e PT totais no sedimento foram maiores no médio estuário. Dessa forma, assim como para *C. americanum*, provavelmente esta condição ambiental também favorece a ocorrência de *S. alterniflora* no médio estuário. Entretanto, o estresse oxidativo de *S. alterniflora* apresentado nesta área pode ser atribuído à presença de *C. americanum*. De acordo com Ribeiro et al (2009) e Takão et al (2011) *C. americanum* é uma espécie vegetal com potencial alelopático.

Em baixo estuário as células de raízes de *S. alterniflora* apresentaram baixos níveis de MDA, indicando baixo estresse oxidativo e maior tolerância desta espécie em área do baixo estuário. A concentração de H_2O_2 não foi tóxica às células, mostrando que algumas vezes elevações transitórias e moderadas dos níveis de EROs são necessárias para a mudança de mecanismos de proteção que induzem à adaptação da planta ao estresse (Gechev, 2002). Além disso, Stribling (1997) e Castillo et al (2005) sugerem que *S. alterniflora* requer concentrações relativamente elevadas de enxofre para seu crescimento, o que provavelmente torna a disponibilidade de sulfato (SO_4^{2-}) um fator que não é limitante no baixo estuário.

Embora a *S. alterniflora* tenha apresentado maior estresse em médio estuário a biomassa da fração emergente e subterrânea não foi reduzida. Com isso, os dados de clorofila indicam que os pigmentos fotossintéticos de *S. alterniflora* até o momento não foi afetada. Os cloroplastos são as principais fontes de EROs em organismos fotosinteticamente ativos (Zolla; Rinalducci, 2002). Sendo assim, sugerimos que o estresse sofrido por *S. alterniflora* no médio estuário não estaria relacionado as EROs produzidas nos tilacoídes do organismo vegetal, mas por outras vias, como na cadeia transportadora de elétrons entre os fotossistemas, na mitocôndria (respiração), fechamento estomático, peroxissomos, retículo endoplasmático, membrana plasmática, apoplasto e parede celular, como descrito por Sharma et al (2012).

A produção de EROs é favorecida por vários fatores de estresse ambientais (Mallick & Mohn, 2000), a salinidade é um desses fatores (Allakhverdiev et al., 2000b), como foi visto para o *C. americanum* e *S. alterniflora* em alto e médio estuário, respectivamente. Entretanto tudo indica que, nesse trabalho, a salinidade está mais relacionada com a produção de H_2O_2 no processo de sinalização celular. O estresse oxidativo que é consequência da acumulação da EROs nas células e que foi observado através dos teores de MDA nas três condições ambientais estudadas parecem melhor associados às concentrações de NT, PT e, provavelmente SO_2^{4-} presentes no sedimento. Aparentemente estes fatores estão relacionados com a distribuição das espécies no estuário.

Concluimos que as espécies estabelecidas naturalmente nas regiões estudadas responderam ao estresse do meio. E que o estresse oxidativo verificado foi maior para a espécie *C. americanum* e *S. alterniflora* nas condições de salinidade do alto e médio estuário, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahanger, M. A., Tomar, N. S., Tittal, M., Argal, S. & Agarwal, R. M. 2017. Plant growth under water/salt stress: ROS production; antioxidants and significance of added potassium under such conditions. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 1-14.
- Alcântara, B. K., Machermer-Noonan, K., Silva Júnior, F. G., Azevedo, R. A. 2015. Dry priming of maize seeds reduces aluminum stress. *Plos One* 10: 42.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat *Plant Cell. Environ* 24: 1337-134.
- Allakhverdiev, S. I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M., Murata, N. 2000. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant physiology* 123(3): 1047-1056.
- Arroyo, S. C., Cutler, D. F. 1984. Evolutionary and taxonomic aspects of the internal morphology in *Amaryllidaceae* from South America and Southern Africa. *Kew Bulletin* 39: 467-498.
- Barbour, M. G., 1978. The effect of competition and salinity at growth of a salt marsh species. *Oecologia* 37: 93-99.
- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., David, J. P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29: 113-123.
- Baxter A., Mittler R. & Suzuki, N. 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot* 65: 1229-1240.
- Bertness, M. D. 1991. Zonation of *Spartina patens* and *Spartina alterniflora* in a New England salt marsh. *Ecology* 72: 138-148.
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inzé, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 43: 83-116.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem* 72: 248-259.
- Camargo A. F. M., Pereira, L. A., Pereira, A. M. M. 2002. Ecologia da bacia hidrográfica do rio Itanhaém. In: Schiavetti, A., Camargo A. F. M. (Eds). *Conceitos de Bacias Hidrográficas*. Ilhéus, Bahia: Editus, 293p.
- Camargo, A. F. M., Florentino, E. R. 1999. Population dynamics and net primary production of the aquatic macrophytes *Nymphaea rudgeana* C.F. Mey in a lotic environment of the Itanhaem River Basin (SP, Brazil). *Revista Brasileira de Biologia* 60: 83-92.

Cancian, L. F. 2012. Modelagem de distribuição geográfica potencial de macrófitas aquáticas em bacias hidrográficas. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

Cancian, L. F.; Camargo, A. F. M. 2011. Utilização de Sistemas de Informações Geográficas, softwares e algoritmos de modelagem para geração de modelos de distribuição geográfica potencial de espécies de macrófitas aquáticas em bacias hidrográficas. Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia 39: 04.

Castillo, J. M., Rubio-Casal, A. E., Redondo, S., Ivarez-Lopez, A. A., Luque, T., Luque, C., Nieva, F. J., Castellanos, E. M., Figueroa, M. E. 2005. Short-term responses to salinity of an invasive cordgrass. *Biological Invasions* 7: 29-35.

Crain, C. M., Silliman, B. R., Bertness, S. L., Bertness, M. D. 2004. Physical and biotic drivers of plant distribution across estuarine salinity gradients. *Ecology* 85: 2539-2549.

Crain, C. M., Silliman, B. R., Bertness, S.L., Bertness, M.D. 2004. Physical and biotic drivers of plant distribution across estuarine salinity gradients. *Ecology* 85: 2539-2549.

Creissen, G. P, Broadbent, P., Kular, B., Reynolds, H., Wellburn, A. R., Mullineaux, P. M. 1994. Manipulation of glutathione reductase in transgenic plants: implications for plant responses to environmental stress, *Proc. R. Soc. Edinb.* 102B: 167-175.

Day, J. W., Cas Hall., Kemp, W. M., Yañes - A Arancibia. 1989. *Estuarine ecology*. John Wiley & Sons Inc., New York. 558p

Del-Rio, L. A. 2015. ROS and RNS in plant physiology: an overview. *J Exp Bot* 66: 2827–2837.

Edge, R., Mcgarvey, D. J., Truscott, T. G. 1997. The carotenoids a antioxidantes - a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 41: 189-200

Engels, J. G., Jensen, K. 2010. Role of biotic interactions and physical factors in determining the distribution of marsh species along an estuarine salinity gradient. *Oikos* 119: 679-685.

Esteves, B. S., Suzuki, M. S. 2008. Efeito da salinidade sobre as plantas. *Oecologia Brasiliensis* 12(4): 662-679.

Fadzillah, N. A. M., Gill, V., Finch, R. P., Burdon, R. H. 1996. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *Planta* 199: 552-556.

Gechev, T. S., Gadjev, I., Dukiendjiev, S., Minkov, I. 2005. Reactive oxygen species as signaling molecules controlling stress adaptation in plants. In: Pessaraki M (ed) *Handbook of photosynthesis*. CRC, Boca Raton 2: 209–218.

- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. 1977. Superoxide dismutases .1. occurrence in higher-plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Golterman, H. L., Clyno, R. S., Ohnstad, M. A. M. 1978. *Methods for physical and chemical analysis of freshwaters*. 2 ed. Blackwell, Oxford.
- Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P.J., Azevedo, R.A. 2005: Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* 32: 481–494.
- Gratão, P.L., Monteiro, C.C., Carvalho, R.F., Tezotto, T., Piotto, F.A., Peres, L.E.P., Azevedo, R.A. 2012. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. - *Plant Physiol. Biochem.* 56: 79- 96.
- Guo, H., Pennings, S. C. 2012. Mechanisms mediating plant distributions across estuarine landscapes in a low-latitude tidal estuary. *Ecology* 93: 90-100.
- Gupta, S. D. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfield: Science Publishers 6: 101-128.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press: New York. 3^aed.
- Heath, R. L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation *Arch. Biochem. Biophys* 125: 2141-2145.
- Kalff, J. 2002. *Limnology*. New Jersey: Printice Hall 592p
- Kenkel, N. C., McIlraith, A.L., Burchill, C.A., Jones, G. 1991. Competition and the response of three plant species to a salinity gradient. *Canadian Journal of Botany* 69: 2497-2502.
- Kennish, M. J. 1992. *Ecology of estuaries: Anthropogenic effects*. CRC, Boca Raton, p 494.
- Knox, G. A. 1986. *Estuarine ecosystems: A system approach*. CRC Press Inc. Florida 1: 299
- Kraus, T. E., Evans, R. C., Fletcher, R. A., Paul, S. K. P. 1995. Paclobutrazol enhances tolerances to increased levels of UV-B radiation in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Canadian Journal Botany* 73: 797-806.
- Lagriffoul, A., Mocquot, B., Mench, M., Vangronsveld, J. 1998. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). *Plant and soil* 200: 241-250.
- Larcher, W. 2000. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: RIMA 531p.
- Mackereth, F. I. F., Heron, J., Talling, J. F. 1978. *Water analysis: some revised methods for limnologists*. London: Freshwater Biological Association.

- Mallick, N., Mohn, F. H. 2000. Reactive oxygen species: response of algal cells. *Journal of Plant Physiology* 157: 183-193.
- Mitchell, D. S., Petr, T., Viner, A. B. 1980. The water-fern *Salvinia molesta* in the Sepik River, Papua New Guinea. *Environmental Conservation* 7: 115-122.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 9: 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Breusegem, F. V. 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci* 16: 300–309.
- Molisch, H. 1937. *Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie*. Jena, Fischer.
- Mormul, R. P., Michelan, T. S., Thomaz, S. M. 2011. Espécies exóticas e invasoras no Brasil: a grande preocupação com macrófitas aquáticas. *Boletim da Associação Brasileira de Limnologia* 39: 1-3.
- Neill, S., Desikan, R., Hancock, J. 2000. Hydrogen peroxide signaling *Curr. Opin. Plant Biol* 5: 388-395.
- Nunes, L. S. C., Camargo, A. F. M. 2016. Do interspecific competition and salinity explain plant zonation in a tropical estuary? *Hydrobiologia* 1-11.
- Pott, V.J., Pott, A. 2000. *Plantas Aquáticas do Pantanal*. Embrapa, Brasília.
- Ribeiro, J. P. N., Matsumoto, R. S., Takao, L. K., Voltarelli, V. M., & Lima, M. I. S. 2009. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum* L. *Revista Brasileira de Botânica* 32(1): 183-188.
- Roginsky, V., Lissi, E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92: 235-254.
- Sant'anna, E. B., Camargo, A. F. M., Bonocchi, K. S. L. 2007. Effects of domestic sewage discharges in the estuarine region of the Itanhaém River basin (SP, Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia*, 19: 221-232.
- Scandalios, J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101: 7–12.
- Scremin-Dias, E., Pott, V. J., Hora, R. C., Souza, P. R. 1999. *Nos jardins submersos da Bodoquena: guia para identificação de plantas aquáticas de Bonito e região*. Campo Grande: Editora da UFMS 160p.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*.

Stribling, J. M. 1997. The relative importance of sulfate availability in the growth of *Spartina alterniflora* and *Spartina cynosuroides*. *Aquatic Botany* 56: 131-143.

Thomaz, S. M. & Esteves, F. A. 2011. Comunidade de macrófitas aquáticas. In: Esteves, F. A. (Ed.) *Fundamentos de Limnologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência – FINEP.

Thomaz, S. M. 2002. Fatores ecológicos associados à colonização e ao desenvolvimento de macrófitas aquáticas e desafios de manejo. *Planta Daninha* 20: 21-23.

Thomaz, S. M., Cunha, E. R. 2010. The role of macrophytes in habitat structuring in aquatic ecosystems: methods of measurement, causes and consequences on animal assemblages composition and biodiversity. *Acta Limnologica Brasiliensia* 22: 218-236.

Touchette, B. W., Smith, G. A., Rhodes, K. L., Poole, M. 2009. Tolerance and avoidance: two contrasting physiological responses to salt stress in mature marsh halophytes *Juncus roemerianus* Scheele and *Spartina alterniflora* Loisel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 380: 106-112.

Wang Ging., An Shu-Ging., Ma Zhi-Jun., Zhao Bin., Chen Jian Kuan., Li Bo. 2006. Invasive *Spartina alterniflora*; biology, ecology and management. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 44(5): 559-588.

Wetzel, R. G. 2001. *Limnology: Lake and River ecosystems*. Philadelphia: Academic Press. 1006 p.

Zhu, G., Gao, Y., Zhy, L. 2013. Delimiting the coastal geographic background to predict potential distribution of *Spartina alterniflora*. *Hidrobiologia* 717: 177-187.

Zolla, L. & Rinalducci, S. (2002). Involvement of active oxygen species in degradation of light-harvesting proteins under light stresses. *Biochemistry*, 41(48): 14391-14402.

CAPÍTULO 2

ESTRESSE OXIDATIVO EM *SPARTINA ALTERNIFLORA* CRESCENDO EM LOCAIS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES EM UM ESTUÁRIO DE REGIÃO NEOTROPICAL

Resumo: O estresse oxidativo causado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é uma das respostas que as plantas apresentam frente a um estresse ambiental. As macrófitas aquáticas presentes em regiões estuarinas estão adaptadas a esses ambientes, embora os teores de nitrogênio, fósforo, entre outros nutrientes e a salinidade variem ao longo do rio. Nosso objetivo foi avaliar o estresse oxidativo da *Spartina alterniflora* que encontram-se na foz e próximo ao lançamento de esgoto no rio Itanhaém (SP). Raízes e folhas (5 plantas) de *S. alterniflora* foram coletadas em três bancos nestas duas áreas. O material vegetal para análises de pigmentos fotossintéticos, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), concentração de malonaldeído (MDA) e enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram acondicionados em N₂ líquido no campo e posteriormente armazenado em freezer a -80 °C. Também foram coletados em cada réplica material vegetal para avaliar o teor de nitrogênio e fósforo totais da planta e do sedimento. Nós enviamos os dados para a análise estatística usando o teste t (p <0,05). Os resultados obtidos indicam estresse oxidativo em ambientes com maiores teores de N e P no sedimento.

Palavras chave: Macrófita aquática, peroxidação, eutrofização.

Abstract: The oxidative stress caused by the production of reactive oxygen species (ROS) is one of the responses that plants face due to environmental adverse conditions. The aquatic macrophytes present in estuarine regions are adapted to these environments, despite the levels of nitrogen, phosphorus, and salinity vary along the river. Our objective was to characterize the oxidative stress of *Spartina alterniflora* that is close to the mouth and to the discharge of sewage in the River Itanhaém (SP). Roots and leaves (5 plants) of *S. alterniflora* were collected in three banks (samples) in these two areas. Plant material for analysis of photosynthetic pigments, hydrogen peroxide (H₂O₂), malonaldehyde concentration (MDA), antioxidant superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were conditioned in liquid Nitrogen in the field and stored in a freezer at -80 ° C. we submitted the data to the statistical analysis using the t test (p <0.05). The results indicate oxidative stress in more nutritious environments.

Key words: Peroxidation, chemical competition, eutrophication.

INTRODUÇÃO

Estuários são corpos de água semi fechados que possuem ligação com o oceano aberto, ocorrendo o encontro de água doce (fluvial) com a água salgada (Hobbie, 2000; Townsend, et al 2006; Wolanski & Elliott, 2016), esta ligação entre a água doce e salgada, forma um ambiente propício para, reprodução, desenvolvimento de formas jovens e recrutamento de numerosas espécies de organismos aquáticos (Kennish, 1992). Entretanto, estas áreas vem sendo frequentemente impactadas devido a acelerada ocupação humana que ocasiona uma série de alterações antrópicas relacionados à erosão costeira, saneamento, poluição das águas, desmatamento de manguezais (Guerra & Marçal, 2006), despejo de esgotos domésticos e industriais e atividades de aquicultura (LIMA, 2005). A introdução de descargas de esgoto nos cursos de água aumenta as concentrações de matéria orgânica e nutrientes que podem afetar as características físicas e químicas da água e do sedimento, provocam a eutrofização (Tucker, 1981; Morris, 1982; Esteves, 1998) e impactam diretamente a produtividade primária, composição de espécies, bem como os nichos associados as plantas aquáticas (Tilman & Lehman, 2001).

A distribuição de espécies de macrófitas é determinada por muitos fatores, como temperatura, intensidade da luz, fluxo de corrente e disponibilidade de nutrientes (Bini et al, 1999; Thomaz et al., 1999). Em estuários de região neotropical, *Spartina alterniflora* é uma espécie de macrófita aquática que ocorre em abundância. Sua distribuição está principalmente relacionada com a capacidade em suportar diferentes níveis de salinidade (Esteves & Suzuki, 2008) e diferentes concentrações de nutrientes (Biudes & Camargo, 2006).

Na região estuarina do rio Itanhaém existem rios não poluídos e algumas áreas afetadas por lançamentos de esgoto domésticos (Camargo et al., 2002). Em ambos os ambientes aquáticos, a macrófita aquática *S. alterniflora* é abundante e ocorre perto da borda da vegetação de manguezal (Tonizza, 2002).

Segundo Biudes e Camargo (2006), ambientes ricos em nutrientes procedentes de lançamento de esgoto, afetam diretamente a incorporação destes pelas plantas aquáticas. Dessa forma, acredita-se que a pequena disponibilidade de nutrientes possa ser um fator estressante para o organismo vegetal. As condições adversas encontradas em um ambiente pode sobrecarregar o organismo vegetal, favorecendo a oxidação descontrolada, que através

da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) promove o estresse oxidativo (Gratão et al., 2005).

O estresse oxidativo pode favorecer a produção do ácido malonaldeído (MDA), um subproduto da lipoxidação, resultante do ataque à membrana celular provocado pelo estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 1999). Entretanto, a acumulação de EROs em macrófitas aquáticas que vivem nestes ambientes salinos podem ser controladas pelo sistema de defesa antioxidante, que compreende as enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), responsável em converter O_2^- em H_2O_2 (Gratão et al, 2005). A produção excessiva de H_2O_2 , que é um indicador de estresse é convertida em H_2O pela ação de uma série de enzimas tais como catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidases de tipo guaiacol (GPOX) (Hippler et al. 2015; Liu et al., 2015; Roychoudhury et al., 2012), além de um complexo mecanismo não-enzimático (Foyer e Noctor 2013). Em alguns casos, a elevação moderada ou transitória de H_2O_2 pode agir como sinalizador celular, regulando as funções fisiológicas do organismo vegetal frente ao estresse ambiental (Pitzschke et al., 2006 del-Rio 2015).

Dessa forma, nosso objetivo foi avaliar as respostas de H_2O_2 e MDA utilizados como indicativos do estresse oxidativo, bem como as enzimas antioxidantes de *S. alterniflora* em duas condições de nutrientes: região da foz e área com lançamento de esgoto.

Hipotese:

- *S. alterniflora* apresentara maior resposta ao estresse na área de menor recebimento de nutrientes, ou seja, na área foz.

MATERIAL E MÉTODOS

- Área de estudo e coleta de campo

O estuário do rio Itanhaém está localizado no litoral sul do estado de São Paulo (Figura 1). O sistema hidrológico da região é influenciado pelo regime de marés, apresentando mistura de água doce e salgada que forma um gradiente de salinidade nos rios (Cancian, 2012), formando áreas favoráveis ao desenvolvimento de macrófitas aquáticas (Henry-Silva & Camargo, 2000). O sistema hidrológico da região é influenciado pelo regime de marés, apresentando mistura de água doce e salgada que forma um gradiente de salinidade nos rios (Cancian, 2012), com concentrações de nitrogênio e fósforo totais diferentes (Nunes & Camargo, 2016). Há um lançamento de esgoto oriundo da área urbana localizada à margem esquerda do rio Itanhaém. Este esgoto é capturado e tratado na estação de tratamento de esgoto de Itanhaém no qual ocorre à remoção de maior parte da matéria orgânica, entretanto, não há remoção dos nutrientes. A região é marcada pela ausência de variação sazonal das características climáticas e limnológicas, pela ausência de pulsos de inundação, e pela pequena variação do nível de água devido à influência das marés (amplitude máxima de 1,50 metros) e das chuvas em curtos períodos (Camargo & Florentino, 1999). O regime climático, conforme classificação de Köppen, é *Af* tropical úmido e não apresenta estação seca. A temperatura média anual corresponde a 24°C, com temperatura mínima média do dia de 13,3°C (em julho) e temperatura máxima média do dia de 34,4° (em fevereiro). Chove na região cerca de 170 dias por ano, podendo o índice pluviométrico anual ultrapassar 2000 mm (Itanhaém, 2011).

A região superior do estuário possui características naturais pois, as nascentes dos rios estão localizadas em uma área de conservação (Parque Estadual da Serra do Mar) e apenas algumas áreas agrícolas (fazendas de banana) ocorrem à montante do estuário. A região intermediária do estuário está localizada também em área com pequenos impactos ambientais e a vegetação terrestre predominante é de Mata de Restinga. A região inferior do estuário (0-5 Km) é coberta por vegetação de manguesal e está submetida a maiores impactos devido à proximidade da área urbana do município de Itanhaém (Sant'anna et al, 2007)..



Figura 1: Mapas da América do Sul (A); Estado de São Paulo (B) e o estuário do rio Itanhaém (C). Área com bancos de *S. alterniflora* localizado próximo à foz (1); Área com bancos de *S. alterniflora* localizada próxima ao lançamento de efluentes de uma estação de tratamento de esgotos urbanos (2); Tratamento de esgoto de Itanhaém (3) (Google Earth, 2007).

Nós escolhemos duas áreas colonizadas por *S. alterniflora* no estuário do rio Itanhaém para avaliar o estresse da espécie. Uma área localizada mais próxima à foz do rio (Foz) e com características bem preservadas e outra localizada próxima ao lançamento de efluentes de uma estação de tratamento de esgotos urbanos (Esgoto) que possui apenas tratamento primário e secundário. A distância entre estas duas áreas é de aproximadamente 600 metros. Em novembro de 2016 nós coletamos em cada área: cinco amostras de *Spartina alterniflora* (Família Poaceae); cinco amostras de sedimento; cinco indivíduos da espécie para determinarmos os teores de nitrogênio total (NT) e fósforo total (PT) que secamos em estufa até atingir peso constante e sete gramas de folhas e raízes jovens, em cada amostra, para a quantificarmos as enzimas antioxidantes. Após a lavagem do material acondicionamos em papel alumínio e inserimos em N₂ líquido, em campo e, posteriormente armazenamos em freezer a -80 °C.

- Análise laboratorial

Para determinarmos a salinidade, diluímos três gramas de massa fresca do sedimento em 100 mL de água destilada para e obtermos o teor de sais através do aparelho salinômetro Corning PS 18. Determinamos a porcentagem de NT segundo Mackereth et al (1978) e PT de acordo com Golterman et al (1978).

Para determinamos a peroxidação lipídica (MDA) estimamos o conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) seguindo o método de Heath e Packer (1968), com resultado expresso em nMol/g de matéria fresca. Realizamos a quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da reação de iodeto de potássio (KI), segundo Alexieva et al (2001) e o resultado foi expresso em μ mol/g de matéria fresca. A extração seguiu o mesmo protocolo de MDA.

Para a extração protéica maceramos as raízes e folhas em um almofariz com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1mM de EDTA (0,372 g/L tampão), 3 mM de diclorodifeniltricloroetano (DTT) (0,462 g/L tampão) e 4% (p/v) de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). Centrifugamos o homogeneizado à 10.000 rpm por 30 min à 4°C. Coletamos o sobrenadante e o dividimos em alíquotas que foram estocadas em freezer (-80°C) até o momento das análises. Para a determinação da concentração de proteínas totais usamos o método de Bradford (1976) e utilizamos o Software Alliance (BSA) como padrão.

Determinamos a atividade da enzima catalase (CAT) em espectrofotometria como descrito por Kraus et al. (1995) com algumas modificações conforme Azevedo et al. (1998) a 25°C em uma mistura de reação contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM) pH 7,5 contendo 2,5 μ L de H_2O_2 (solução de 30%). Iniciamos a reação pela adição de 25 μ L de extrato seguindo-se da decomposição de H_2O_2 por 1 minuto através das alterações na absorbância a 240 nm e os resultados foram expressos em μ mol/min/mg de proteína.

Determinamos a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de acordo com o método de Giannopolitis e Ries (1977) em espectrofotometria. Conduzimos a reação em uma câmara de reação sob iluminação fluorescente de 15 W a 25°C. Adicionamos 50 μ L de amostra extraída e já descongelada em um meio de reação de 5ml, contendo tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), 50mM metionina, 1 mM tetrazólio nitroazul (NBT), 10 mM etileno-diaminotetracético (EDTA) e 0,1 mM riboflavina. Iniciamos a reação na câmara de

reação em de luz por 5 minutos. Realizamos a medida em espectrofotometria a 550 nm e os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína.

- Análise estatística

Utilizamos os bancos de macrófitas como variáveis resposta e as variáveis limnológicas e de caracterização do estresse como variáveis preditoras. Primeiramente, submetemos os dados ao teste de Cramer-Von-Misses e Bartlett, para verificação da normalidade do resíduo e homocedasticidade da variância dos dados, respectivamente. Após o atendimento destas premissas, submetemos os dados à análise estatística com auxílio do teste t ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Os valores de salinidade do sedimento nos bancos localizados no estuário do rio Itanhaém foram significativamente diferentes ($P < 0,05$), com maior salinidade na área esgoto e menor salinidade na área foz (Tabela 1). Os resultados dos teores de NT e PT do sedimento foram significativamente maiores nos bancos de *S. alterniflora* na área esgoto, bem como na biomassa de *S. alterniflora*.

Tabela 1: Valores médios (desvio padrão) da salinidade do sedimento, teor de NT e PT do sedimento e incorporação de NT e PT na fração emergente e subterrânea de *S. alterniflora* em duas áreas do estuário do rio Itanhaém/SP.

| | Sedimento | |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Foz | Esgoto |
| Salinidade | 17.5 ±0.87 b | 23 ±1.00 a |
| N-total (%Massa seca) | 0.113 ±0.023 b | 12.396 ±1.23 a |
| P-total (%Massa seca) | 0.006 ±0.005 b | 0.015 ±0.005 a |
| | Emergente/Subterrânea | Emergente/Subterrânea |
| N-total (%Massa seca) | 1.043 ±0.005 b / 0.72 ±0.02 b | 1.33 ±0.01 a / 1.34 ±0.05 a |
| P-total (%Massa seca) | 0.043 ±0.05 b / 0.03 ±0.001 b | 0.06 ±0.01 a / 0.045 ±0.005 a |

O Aldeído MDA (nmol/g de tecido) foi produzido na fração emergente e subterrânea, sendo observado em maior quantidade nos bancos de *S. alterniflora* da área foz do que nos bancos de *S. alterniflora* da área esgoto (Figura 2). Na fração emergente e subterrânea a produção de H₂O₂ (μmol/g de tecido) foi maior em *S. alterniflora* na área foz do que no banco na área esgoto (Figura 3).

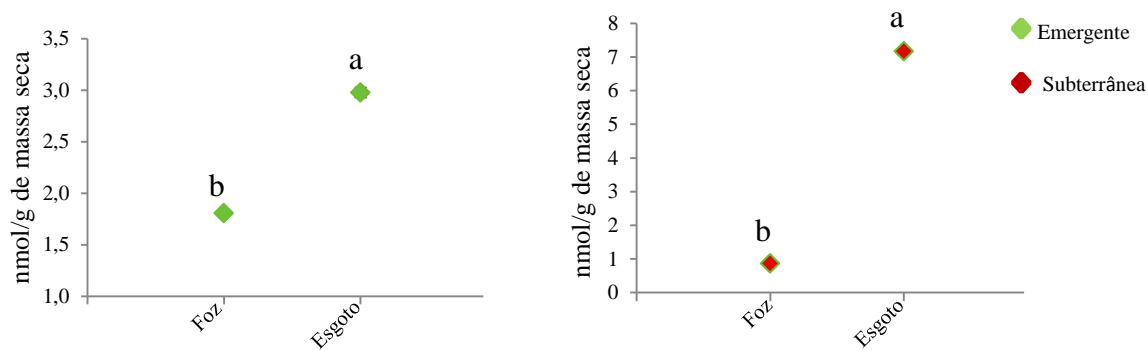


Figura 2: Peroxidação lipídica medida através do MDA (nmol/g de massa fresca) na fração emergente e subterrânea de *S. alterniflora* na área foz e área esgoto.

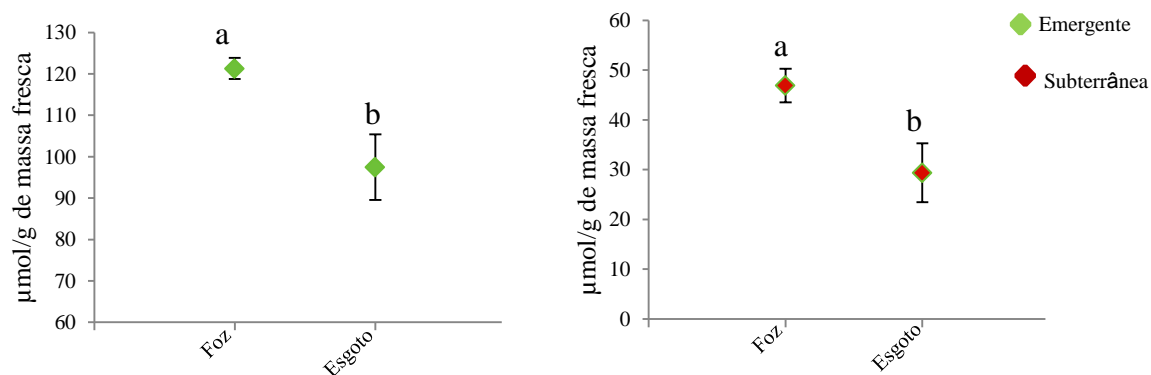


Figura 3: Produção de H₂O₂ (μmol/g de massa fresca) na fração emergente e subterrânea de *S. alterniflora* na área foz e área esgoto.

A produção da enzima SOD (U SOD/mg de proteína) na fração subterrânea, ao contrário da fração emergente, apresentaram maior resposta da SOD nos bancos de *S. alterniflora* na área esgoto e menor resposta nos bancos na área foz (Figura 4). Na fração emergente e

subterrânea a produção da enzima CAT ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) foi maior nos bancos de *S. alterniflora* na área foz, e menor nos bancos de macrófitas na área esgoto (Figura 5).

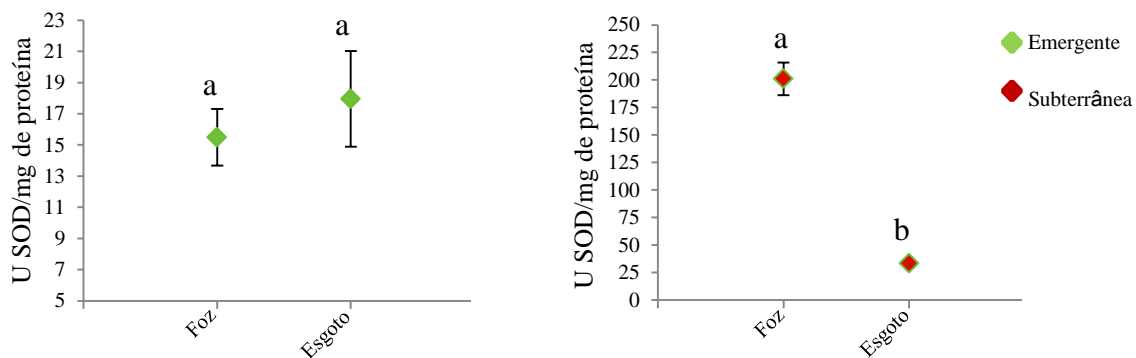


Figura 4: Atividade da SOD (U SOD/mg de proteína) na fração emergente e subterrânea de *S. alterniflora* em duas situações ambientais: foz e esgoto.

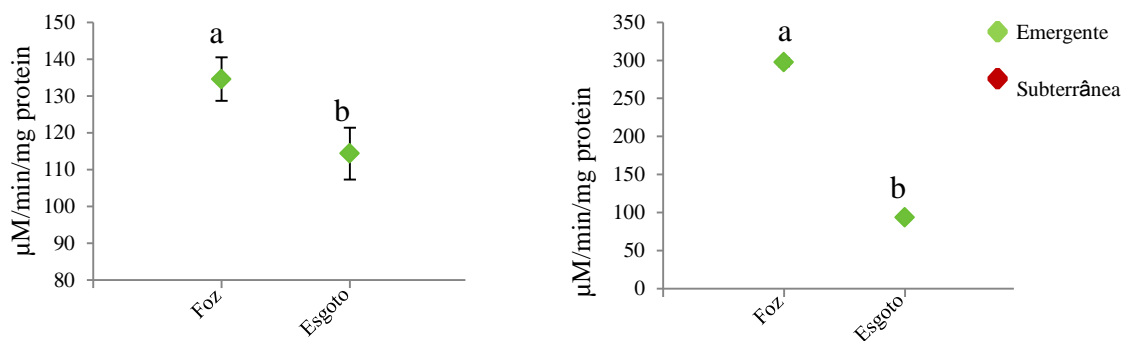


Figura 5: Atividade da CAT ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) na fração emergente e subterrânea de *S. alterniflora* em duas situações ambientais: foz e esgoto.

DISCUSSÃO

Nossos dados mostram que o estresse oxidativo indicado pela concentração de MDA em *S. alterniflora* foi maior na área esgoto o que rejeita nossa hipótese inicial.

S. alterniflora apresentou maiores teores de NT e PT do sedimento unido à incorporação destes nutrientes pelas macrófitas na fração emergente e subterrânea, como também verificado por Biudes & Camargo (2006). Entretanto, esta espécie demonstra ser do ponto de vista ecológico um agente positivo na reciclagem contínua de nutrientes no ambiente. Uma vez que convertem matéria inorgânica em matéria orgânica, a qual é requerida, direta ou indiretamente, como alimento para inúmeros animais (Hammer, 1989). Em contrapartida, na área foz, esta baixa incorporação de NT e PT pelos bancos de *S. alterniflora* pode ser atribuída a grande diluição das águas resultante da drenagem continental, muito característico deste estuário (Sant'ann et al. 2007).

O teor de NT incorporado pelas macrófitas na área esgoto é diretamente proporcional à produção de MDA, o que caracterizou o estresse oxidativo na fração emergente e subterrânea das macrófitas, quando comparado com os indivíduos da outra área estudada. O MDA é o subproduto da lipoxidação, que é resultante do ataque à membrana celular (Halliwell & Gutteridge, 1999). Embora as águas desta região sejam classificadas como pouco ou não poluídas (Sant'ann et al. 2007), fica evidente que o teor de MDA indicou um fator de estresse ao organismo vegetal. Esse resultado pode ser atribuído aos resíduos do esgoto doméstico (Camargo et al., 2002). O H_2O_2 , mesmo em baixa concentração, foi tóxico para a célula, o que pode acarretar na falha do metabolismo celular da planta (Scandalios, 2000).

Segundo observado por Bradley & Morris, (1990), o aumento da disponibilidade de nutrientes, em especial o nitrogênio, provoca em halófitas a inibição da toxicidade do enxofre presente em sedimentos salinos, entretanto, Stribling (1997) e Castillo et al (2005) sugerem que *S. alterniflora* requer concentrações relativamente elevadas de enxofre (SO_4^{2-}) para seu crescimento, o que provavelmente torna a disponibilidade de SO_4^{2-} variável com o gradiente de salinidade. Sendo assim, o teor de NT presente no sedimento teria provocado um déficit na composição de SO_4^{2-} nas macrófitas. Ademais, a alta concentração salina do

meio dificulta a absorção de água e nutrientes pelas plantas devido ao baixo potencial total da solução do solo e da competição química entre nutrientes e sais (Yeo & Flowers, 1989).

Na área foz o teor de MDA nos indivíduos de *S. alterniflora* foi menor comparado à área esgoto, o que estaria relacionado com alta atividade da SOD e CAT. Mesmo em alta concentração, o H_2O_2 não foi tóxico a célula, mostrando que muitas vezes o H_2O_2 pode agir como sinalizador em vários processos adaptativos e sinais regulatórios referentes ao crescimento e desenvolvimento do organismo vegetal (Pitzschke et al., 2006) e muitos outros fenômenos fisiologicamente importantes como defesa de patógenos, morte celular programada, comportamento estomático, respostas a estresses bióticos e abióticos (del-Rio 2015). Isso mostra que mesmo em baixas concentrações de NT e PT, os indivíduos de *S. alterniflora* na área foz parecem apresentar melhor mecanismo de tolerância frente às condições ambientais da área de bancos próximos a foz. Além disso, o SO_4^{2-} teria menos competidores com outros nutrientes (NT e PT) e partículas de sais, favorecendo a assimilação de SO_4^{2-} na macrófita.

Embora a área esgoto tenha maior concentração de nutrientes no sedimento e os indivíduos de *S. alterniflora* apresentem maiores teores destes elementos na biomassa, nesta área fica evidente que a espécie mostrou maior estresse oxidativo. O estresse oxidativo, neste caso, provavelmente está relacionado à maior quantidade de sais no sedimento. Excessos de nutrientes em presença de sais podem comportar-se como competidores químicos, prejudicando a absorção de compostos essenciais à vida da macrófita aquática. Concluímos que os indivíduos de *S. alterniflora* presentes na área esgoto mostrou maior estresse oxidativo nesta condição ambiental de nutrientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat *Plant Cell. Environ* 24: 1337-134.
- Allen, R. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* 107: 1049–105.
- Allen, S. E., Grimshaw, H. M., Parkinson, J. A., Quarmby, C. 1974. *Chemical Analysis of Ecological Materials*. Blackwell, Oxford 565p.
- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., David, J. P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29: 113-123.
- Bertness, M. D. 1991. Zonation of *Spartina patens* and *Spartina alterniflora* in a New England salt marsh. *Ecology* 72: 138-148.
- Bini, L. M., Thomaz, S. M., Murphy, K. J., Camargo, A. F. M. 1999. Aquatic macrophyte distribution in relation to water and sediment conditions in the Itaipu Reservoir, Brazil. *Hydrobiologia* 415: 147-154.
- Biudes, J. F. V., Camargo, A. F. M. 2006. Changes in biomass, chemical composition and nutritive value of *Spartina alterniflora* due to organic pollution in the basin of the River Itanhaém (SP, Brazil). *Brazilian Journal of Biology, São Carlos*, 66 (2): 781-789.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem* 72: 248-259.
- Bradley, P. M., Morris, J. T. 1990. Influence of oxygen and sulfide concentration on nitrogen uptake kinetics in *Spartina alterniflora*. *Ecology*, 71(1), 282-287.
- Camargo A. F. M., Pereira, L. A., Pereira, A. M. M. 2002. Ecologia da bacia hidrográfica do rio Itanhaém. In: Schiavetti, A., Camargo A. F. M. (Eds). *Conceitos de Bacias Hidrográficas*. Ilhéus, Bahia: Editus, 293p.
- Camargo, A. F. M., Biudes, J. F. V. 2006. Influence of limnological characteristics of water in the occurrence of *Salvinia molesta* and *Pistia stratiotes* in rivers from the Itanhaém River basin (SP, Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia*, 18:, 239-246.
- Camargo, A. F. M., Florentino, E. R. 1999. Population dynamics and net primary production of the aquatic macrophytes *Nymphaea rudgeana* C.F. Mey in a lotic environment of the Itanhaem River Basin (SP, Brazil). *Revista Brasileira de Biologia* 60: 83-92.
- Cancian, L. F.; Camargo, A. F. M. 2011. Utilização de Sistemas de Informações Geográficas, softwares e algoritmos de modelagem para geração de modelos de distribuição

geográfica potencial de espécies de macrófitas aquáticas em bacias hidrográficas. Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia 39: 04.

Castillo, J. M., Rubio-Casal, A. E., Redondo, S., Ivarez-Lopez, A. A., Luque, T., Luque, C., Nieva, F. J., Castellanos, E. M., Figueroa, M. E. 2005. Short-term responses to salinity of an invasive cordgrass. *Biological Invasions* 7: 29-35.

Creissen, G. P., Broadbent, P., Kular, B., Reynolds, H., Wellburn, A. R., Mullineaux, P. M. 1994. Manipulation of glutathione reductase in transgenic plants: implications for plant responses to environmental stress, *Proc. R. Soc. Edinb.* 102B: 167-175.

Del-Rio, L. A. 2015. ROS and RNS in plant physiology: an overview. *J Exp Bot* 66: 2827–2837.

Esteves, F. A. 1980. Die Bedeutung der aquatischen Makrophyten für den Stoffhaushalt des Schöhssee. III. Die anorganischen Hauptbestandteile der aquatischen Makrophyten. *Gewässer und Abwässer* 66/67: 29-94.

Fadzillah, N. A. M., Gill, V., Finch, R. P., Burdon, R. H. 1996. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *Planta* 199: 552-556.

Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. 1977. Superoxide dismutases .1. occurrence in higher-plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.

Golterman, H. L., Clyno, R. S., Ohnstad, M. A. M. 1978. *Methods for physical and chemical analysis of freshwaters*. 2 ed. Blackwell, Oxford.

Gratao, P. L., Polle, A., Lea, P.J., Azevedo, R.A. 2005: Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* 32: 481–494.

Guerra, A. J. T., Marçal, M. dos Santos. 2006. Geomorfologia ambiental –conceitos, temas e aplicações. In: *Geomorfologia Ambiental*. Rio de Janeiro: Bertrand.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press: New York. 3^aed.

Hammer, Donald, A. 1989. *Constructed wetlands for wastewater treatment: municipal, industrial and agricultural*. Chelsea, Michigan: Lewis publishers, INC, . 831 p.

Harper, D. 1995. *Eutrophication of Freshwaters: Principles, problems and restoration*. Chapman & Hall, London 327p.

Heath, R. L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation *Arch. Biochem. Biophys* 125: 2141-2145.

Henry-Silva, G. G., Camargo A. F. M., Pezzato, M. M. 2002. Effect of nutrient concentration on the growth of *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* and *Salvinia molesta*.

Proceedings of the 11th EWRS International Symposium on Aquatic Weeds. Moliet et Mâa, 1: 147-150.

Kraus, T. E., Evans, R. C., Fletcher, R. A., Paul, S. K. P. 1995. Paclobutrazol enhances tolerances to increased levels of UV-B radiation in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Canadian Journal Botany* 73: 797-806.

Lagriffoul, A., Mocquot, B., Mench, M., Vangronsveld, J. 1998. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). *Plant and soil* 200: 241-250.

Laws, E. A., Allen, C. 1996. Water quality in a subtropical embayment more than a decade after diversion of sewage discharges. *Pac. Sci.* 50: 194-210.

Mackereth, F. I. F., Heron, J., Talling, J. F. 1978. *Water analysis: some revised methods for limnologists*. London: Freshwater Biological Association.

Mallick, N., Mohn, F. H. 2000. Reactive oxygen species: response of algal cells. *Journal of Plant Physiology* 157: 183-193.

Morris, J. T. 1982. A model of growth responses by *Spartina alterniflora* to nitrogen limitation. *Journal Ecology*, 70: 25-42.

Nunes, L. S. C., Camargo, A. F. M. 2016. Do interspecific competition and salinity explain plant zonation in a tropical estuary? *Hydrobiologia* 1-11.

Rout, N. P., Shaw, B. P. 2001. Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes. *Plant Science*, 160(3), 415-423.

Sant'anna, E. B., Camargo, A. F. M., Bonocchi, K. S. L. 2007. Effects of domestic sewage discharges in the estuarine region of the Itanhaém River basin (SP, Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia*, 19: 221-232.

Scremin-Dias, E., Pott, V. J., Hora, R. C., Souza, P. R. 1999. *Nos jardins submersos da Bodoquena: guia para identificação de plantas aquáticas de Bonito e região*. Campo Grande: Editora da UFMS 160p.

Stribling, J. M. 1997. The relative importance of sulfate availability in the growth of *Spartina alterniflora* and *Spartina cynosuroides*. *Aquatic Botany* 56: 131-143.

Thomaz, S. M., Cunha, E. R. 2010. The role of macrophytes in habitat structuring in aquatic ecosystems: methods of measurement, causes and consequences on animal assemblages composition and biodiversity. *Acta Limnologica Brasiliensia* 22: 218-236.

Tilman, D., Lehman, C. 2001. Human-caused environmental change: Impacts on plant diversity and evolution. *PNAS* 98: 5433-50.

Touchette, B. W., Smith, G. A., Rhodes, K. L., Poole, M. 2009. Tolerance and avoidance: two contrasting physiological responses to salt stress in mature marsh halophytes *Juncus*

roemerianus Scheele and *Spartina alterniflora* Loisel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 380: 106-112.

Tucker, C. S. 1981. The effect of ionic form and level of nitrogen on the growth and composition of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *Hydrobiologia* 83: 517-522.

Wang Ging., An Shu-Ging., Ma Zhi-Jun., Zhao Bin., Chen Jian Kuan., Li Bo. 2006. Invasive *Spartina alterniflora*; biology, ecology and management. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 44(5): 559-588.

Yeo, A. R., Flowers, T. J. 1989. Selection for physiological characters –examples from breeding for salt tolerance. In: Jones, H. G.; Flowers, T. J.; Jones, M. B. (ed.). *Plants under stress*. Cambridge: Cambridge University Press 12: 217-234.

Zhu, G., Gao, Y., Zhy, L. 2013. Delimiting the coastal geografic backgroud to predict e potential distribution of *Spartina alterniflora*. *Hidrobiologia* 717: 177-1