

FERNANDA VIDAL DE CAMPOS

ÓXIDO NÍTRICO MELHORA O DESEMPENHO DE PLANTAS DE *Lactuca sativa* L. EXPOSTAS AO ESTRESSE SALINO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

C198o
2017

Campos, Fernanda Vidal de, 1989-

Óxido nítrico melhora o desempenho de plantas de *Lactuca sativa* L. expostas ao estresse salino / Fernanda Vidal de Campos. – Viçosa, MG, 2017.

viii, 81f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Alface. 2. *Lactuca sativa*. 3. Salinidade. 4. Alface - Bioquímica vegetal. 5. Alface - Fisiologia vegetal. 6. Óxido nítrico. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 635.52

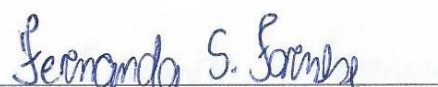
FERNANDA VIDAL DE CAMPOS

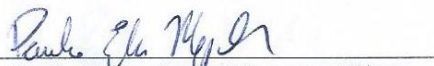
ÓXIDO NÍTRICO MELHORA O DESEMPENHO DE PLANTAS DE *Lactuca sativa* L. EXPOSTAS AO ESTRESSE SALINO

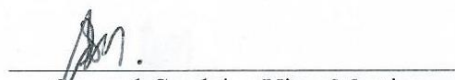
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 07 de dezembro de 2017.


Dimas Mendes Ribeiro


Fernanda dos Santos Farnese


Paulo Eduardo de Menezes Silva


Samuel Cordeiro Vitor Martins


Juraci Alves de Oliveira
(Orientador)

Aos meus amados Leonardo e Miguel por serem fonte de amor e inspiração, dedico
esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso.

Ao professor Juraci Alves de Oliveira por ser além de um orientador um grande amigo. Obrigada pelo constante incentivo, hoje o tenho como exemplo de profissional.

Aos membros da banca Fernanda dos Santos Farnese, Paulo Eduardo de Menezes Silva, Dimas Mendes Ribeiro e Samuel Vitor Cordeiro Martins, pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

À minha amada família: Ariméia, Dimas, Tiago, Renata, Leonardo, Miguel e Theo, por serem a base da minha vida e meus maiores incentivadores.

Aos amigos do laboratório de Biofísica, em especial a Mayara, pela amizade, dedicação e por sempre estar tão disposta ajudar. Você foi fundamental na concretização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, em especial ao professor Fábio daMatta pelo auxílio para que eu desse continuidade ao curso.

Ao professor José Lino Neto pelo auxílio no registro fotográfico dos experimentos.

Aos meus amigos, em especial a Cíntia Oliveira, David Medeiros e Adinan Alves por me ajudar em tantos momentos que precisei.

Ao Instituto Federal Fluminense, por me acolher e incentivar em minha formação. Sou grata por fazer parte dessa Instituição.

Ao amigo Dirceu Pereira dos Santos, pela amizade, incentivo e ajuda constante.

Aos meus alunos, fontes de incentivo a me tornar uma profissional melhor.

A Deus.

BIOGRAFIA

Fernanda Vidal de Campos, filha de Dimas Valter de Campos e Arimeia Vidal de Campos, nasceu em 20 de fevereiro de 1989, em Barbacena, MG.

Em dezembro de 2011 graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora-UFJF.

Iniciou o curso de mestrado em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa em fevereiro de 2012 e, em janeiro de 2014 defendeu sua dissertação.

Em fevereiro de 2014 iniciou o doutorado também em Fisiologia Vegetal nessa mesma Universidade e, em dezembro de 2017, submeteu-se à defesa de tese.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
CAPÍTULO I	
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1. Cultivo, aclimação e aplicação dos tratamentos	16
2.2. Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	17
2.3. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes	17
2.3.1. Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD)	17
2.3.2. Determinação da atividade da catalase (CAT)	18
2.3.3. Determinação da atividade das peroxidases totais (POX)	18
2.3.4. Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX)	18
2.3.5. Determinação de proteínas	19
2.4. Avaliação do extravasamento de eletrólitos	19
2.5. Avaliação da morte celular	19
2.6. Delineamento experimental e análise estatística	20
3. RESULTADOS	20
3.1. Concentração de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	20
3.2. Integridade da membrana	21
3.3. Atividade das enzimas antioxidantes	22
3.4. Morte celular em folhas e raízes de <i>L. sativa</i>	25
4. DISCUSSÃO	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO II	
RESUMO	44
ABSTRACT	45
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAIS E MÉTODOS	48
2.1. Cultivo, aclimação e aplicação dos tratamentos	48
2.2. Taxa de crescimento relativo (TCR) e índice de tolerância (IT)	49
2.3. Sintomatologia visual	49
2.4. Concentração dos nutrientes minerais e relação K ⁺ /Na ⁺	49
2.5. Concentração dos pigmentos cloroplásticos	50
2.6. Determinação dos parâmetros de trocas gasosas	50
2.7. Concentração de prolina no material vegetal	50
2.8. Conteúdo endógeno dos hormônios vegetais	50
2.9. Delineamento experimental e análise estatística	51

3. RESULTADOS	52
3.1. Taxa de crescimento relativo (TCR) e índice de tolerância (IT)	52
3.2. Sintomatologia visual	53
3.3. Concentração de nutrientes minerais e relação K^+/Na^+	54
3.4. Concentração de prolina	56
3.5. Concentração dos pigmentos cloroplastídicos	56
3.6. Parâmetros de trocas gasosas	58
3.7. Conteúdo endógeno dos hormônios vegetais	59
4. DISCUSSÃO	60
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
CONCLUSÕES GERAIS	80

RESUMO

CAMPOS, Fernanda Vidal de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2017. **Óxido nítrico melhora o desempenho de plantas de *Lactuca sativa* L. expostas ao estresse salino.** Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

A tolerância ao estresse salino envolve diversas ações que atuam de forma coordenada, como a homeostase iônica, o controle da perda de água através dos estômatos, ajustes metabólicos e defesa antioxidante. Entretanto, para que essas respostas ocorram, é necessário que o estresse seja percebido e transmitido para a maquinaria celular através da atuação dos agentes sinalizadores. O óxido nítrico (NO), devido às suas propriedades particulares, têm sido considerado uma molécula sinalizadora importante sob condições de estresses. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atuação do NO nas principais respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas de *Lactuca sativa* (alface) expostas ao estresse salino de curta duração. As plantas foram aclimatadas por 5 dias em solução nutritiva de Clarck ½ força iônica, pH 6,5, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob irradiância de $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo luminoso de 16 horas, sendo mantidas sob aeração constante. Decorrido esse período foram submetidas aos tratamentos: controle (apenas solução nutritiva); nitroprussiato de sódio (SNP-doador de NO) (70 μM); cloreto de sódio (NaCl) (80 mM) e NaCl + SNP (80 mM e 70 μM , respectivamente). As plantas permaneceram nos tratamentos por períodos que variaram de acordo com a análise em questão. De forma geral, observou-se que o curto período de exposição ao NaCl foi suficiente para desencadear desordens em *L. sativa*, evidenciados pelo aumento na concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), danos de membrana, sinais de morte celular, redução no crescimento, desequilíbrio nutricional, alterações hormonais e queda no desempenho fotossintético. No entanto, a presença do NO, suprido na forma de SNP, pareceu reverter os danos gerados pelo estresse ao atuar como antioxidante eliminando diretamente as espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou otimizando a atividade das enzimas antioxidantes, ao contribuir para produção de prolina, promover o balanço iônico e hormonal na célula e, otimizar a fotossíntese, resultando em melhorias na taxa de crescimento relativo. Assim, durante o período de tempo analisado e dose aplicada de SNP, o NO conduziu as plantas para a via que promove tolerância ao estresse, no entanto, por apresentar padrão de atuação temporal, seria de grande relevância avaliar a atuação desse agente sinalizador, também, a longo prazo.

ABSTRACT

CAMPOS, Fernanda Vidal de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2017. **Nitric oxide improvement the performance of *Lactuca sativa* L. plants exposed to saline stress.** Adviser: Juraci Alves de Oliveira.

Tolerance to salt stress involves several actions that act in a coordinated way, such as ionic homeostasis, control of water loss through stomata, metabolic adjustments and antioxidant defense. However, for these responses to occur, it is necessary that the stress be perceived and transmitted to the cellular machinery through the action of the signaling agents. Nitric oxide (NO), due to its particular properties, has been considered an important signaling molecule under stress conditions. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the performance of NO in the main biochemical and physiological responses of plants of *Lactuca sativa* (lettuce) exposed to short duration saline stress. The plants were acclimatized for 5 days in a nutrient solution of Clark ½ ionic strength, pH 6.5, at 25 ± 2 ° C, under irradiance of $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and light photoperiod of 16 hours, being maintained under constant aeration. After this period they were submitted to the treatments: control (nutrient solution only); sodium nitroprusside (SNP-donor NO) (70 μM); sodium chloride (NaCl) (80 mM) and NaCl + SNP (80 mM and 70 μM , respectively). The plants remained in treatments for periods that varied according to the analysis in question. In general, it was observed that the short period of exposure to NaCl was enough to trigger disorders in *L. sativa*, evidenced by the increase in the level of hydrogen peroxide (H_2O_2), membrane damage, signs of cell death, reduced growth, nutritional imbalance, hormonal changes and decreased photosynthetic performance. However, the presence of NO, supplied in the form of SNP, appeared to revert the stress induced damage by acting with antioxidant, directly eliminating the reactive oxygen species (ROS) and/or optimizing the activity of the antioxidant enzymes, by contributing to the production of proline, promoting ionic and hormonal balance in the cell and optimizing photosynthesis, resulting in better relative growth rate. Thus, during the analyzed period of time and applied dose of SNP, NO led the plants to the pathway that promotes stress tolerance, however, because it presents a pattern of temporal action it would be of great relevance to evaluate the performance of this signaling agent, also, at the long term.

INTRODUÇÃO GERAL

A alta salinidade é um fator de estresse que compromete significativamente o desempenho das culturas. Estima-se que 7% dos solos e cerca de 30% das áreas irrigadas do mundo são afetadas pelas elevadas concentrações de sal e tais valores podem aumentar consideravelmente até o final do século XXI (Ruiz-Lozano et al., 2012; Bartha et al., 2015).

Os fatores que promovem aumento da salinidade nos solos podem ser de causas naturais ou antropogênicas. Em regiões áridas e semi-áridas, em que as precipitações são baixas e as temperaturas altas, o acúmulo de sais ocorre naturalmente ao longo dos anos. Por outro lado, o aumento da salinidade nos solos pode ocorrer por meio do uso excessivo de fertilizantes na agricultura e as práticas de irrigação utilizando água salina (Egamberdieva e Lugtenberg, 2014).

A salinização dos solos afeta o crescimento e desenvolvimento das plantas por ocasionar alterações na homeostase iônica e osmótica da célula, promovendo desequilíbrio de nutrientes, níveis alterados de reguladores de crescimento, quebra do equilíbrio redox e comprometimento da fotossíntese, resultando em declínio na produtividade agrícola (Mahajan e Tuteja, 2005; Zhu et al., 2010; Abbasi et al., 2016; Muchate et al., 2016).

Assim, diversos processos bioquímicos e fisiológicos são afetados na presença de sal, no entanto, é difícil estabelecer com precisão a sequência em que os eventos ocorrem, uma vez que o metabolismo opera em redes complexas envolvendo diversas reações bioquímicas interconectadas. Mas, estudos têm demonstrado que, em um sistema experimental, minutos após a aplicação de sal são notados efeitos de natureza osmótica, que ocasionam distúrbios das relações hídricas afetando a disponibilidade de água para a planta. Essa fase do estresse salino é chamada de “fase osmótica”, em que ocorrem uma sequência de reações, que conduzem à restrição da abertura estomática e assimilação fotossintética de CO₂, aumento da temperatura e alterações na absorção de nutrientes essenciais (Silveira et al., 2010; Roy et al., 2014).

A segunda fase das respostas das plantas à salinidade é caracterizada pela inibição do crescimento devido ao acúmulo de sais ao longo do tempo. Essa fase ocorre ao longo de dias a semanas sendo chamada de “fase de toxicidade ao sal” (Munns e Tester, 2008; Roy et al., 2014). Os íons Na⁺ e Cl⁻, em altas concentrações, conduzem

a diversas desordens nas plantas, que incluem a inibição enzimática, alterações na estrutura da membrana celular e danos ao processo fotossintético (Marschner, 2012; Calvet et al., 2013).

A redução da fotossíntese pode ocorrer devido ao acúmulo de sais no cloroplasto, principalmente Cl^- , que é considerado altamente danoso por prejudicar a produção de clorofila (Chl), desencadeando a clorose nas folhas (Tavakkoli et al., 2010). Além disso, a salinidade conduz ao fechamento parcial dos estômatos em decorrência do efeito osmótico do estresse, prejudicando a condutância estomática, fixação do carbono e o transporte de elétrons nos fotossistemas (Nouri et al., 2015).

O estresse salino ao promover o fechamento estomático, reduz a disponibilidade de CO_2 para ser fixado no Ciclo de Calvin. Assim, os cloroplastos ficam expostos a energia de excitação excessiva, que por sua vez, aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Parida e Das, 2005; Ahmad e Sharma, 2008; Abogadallah, 2010). As EROs geram danos por meio da oxidação de lipídios e proteínas, alterando a estrutura da membrana celular (Pastori e Foyer, 2002; Apel e Hirt, 2004; Ahmad et al., 2010; Hasanuzzaman et al., 2013).

Naturalmente, as plantas apresentam um complexo sistema de proteção oxidativa, que incluem a atuação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para combater os efeitos nocivos das EROs (Gill e Tuteja, 2010). Entretanto, se a produção de EROs supera a capacidade do sistema antioxidante de eliminá-las, a célula sofre desequilíbrio redox (Hasanuzzaman et al., 2012).

Diante disso, a sobrevivência das plantas às condições ambientais adversas requer alterações metabólicas e estruturais no seu programa endógeno de desenvolvimento (Golldack et al., 2014). Assim, com a finalidade de tolerar a alta salinidade, as plantas desenvolvem algumas estratégias, sendo a primeira delas o “ajustamento osmótico”. Nesse processo busca-se reestabelecer o turgor celular através da biossíntese e acúmulo de osmoprotetores, que são moléculas de baixo peso molecular e que não apresentam toxidez em concentrações molares (Ahn et al., 2011). As plantas podem sintetizar osmoprotetores com diferentes naturezas químicas, tais como, açúcares e açúcares alcoóis (frutano, trealose, manitol, sorbitol), osmoprotetores contendo amônio (poliaminas, glicina-betaína) e aminoácidos (prolina) (Singh et al., 2015; Suprasanna et al., 2016).

A medida que os íons salinos vão sendo acumulados, a planta precisa desenvolver estratégias para manter a homeostase iônica, ou seja, manter os íons tóxicos em concentrações baixas e o acúmulo de íons essenciais em concentrações adequadas. Assim, nesse processo atuam sistemas de co-transporte Na^+/H^+ localizados na membrana plasmática e vacuolar, que operam de forma acoplada às H^+ -ATPases, responsáveis por gerar a força necessária para exclusão de Na^+ para o interior do vacúolo ou para o meio extracelular (apoplasto). Atualmente são conhecidas duas classes de sistemas de co-transporte Na^+/H^+ em plantas, os transportadores SOS1 (Salt Overly Sensitive) na membrana plasmática e NHX (Natrium Proton Exchange) localizados no tonoplasto. A atuação desses transportadores permite a manutenção da relação K^+/Na^+ elevada, o que é essencial para a manutenção da homeostase metabólica em condições de alta salinidade (Blumwald et al., 2000; Apse e Blumwald, 2007; Bartha et al., 2015; Houmani e Corpas, 2016).

De forma geral, a tolerância ao estresse salino é acompanhada de ajustamentos que conduzem ao acúmulo de várias substâncias, como osmoprotetores, manutenção da homeostase iônica, eliminação de radicais livres, repogramação gênica, alteração hormonal e mudanças morfológicas (Tuteja, 2007; Munns e Tester, 2008; Acosta-Motos et al., 2017). Entretanto, essas respostas são mediadas por cascatas de transdução de sinais, em que atuam de forma integrada diversos agentes sinalizadores.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa e pequena, altamente difusível através das membranas celulares e por apresentar essa natureza química particular é considerado, em baixas concentrações, um importante mensageiro de sinalização em plantas expostas aos estresses ambientais, inclusive a alta salinidade. Por isso, nos últimos anos têm crescido o interesse no estudo desta molécula e nas suas vias de biossíntese (Siddiqui et al., 2011; Groß et al., 2013; Farnese et al., 2013; Corpas e Juan, 2015; Seabra et al., 2015).

Muitos estudos indicam que o estresse salino afeta o metabolismo endógeno de NO em plantas, entretanto, pelo fato das pesquisas com NO em células vegetais serem muito recentes, as vias de biossíntese desta molécula ainda não são bem compreendidas. Os conhecimentos atuais em plantas sugerem que o NO pode ser produzido através de diversas fontes, incluindo a atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e vias dependentes de arginina e nitrito, sendo que essas fontes podem atuar no mesmo contexto fisiológico (Baudouin, 2011; Groß et al., 2013).

O aumento de NO em decorrência de uma condição estressante ou o seu fornecimento exógeno ocasiona mudanças nas plantas, que as tornam mais tolerantes quando expostas a um novo estresse. Acredita-se que nas plantas existe um processo de “memória ao estresse”, no qual a prévia exposição ao NO faz com que as plantas desenvolvam respostas potencializadas e mais rápidas a eventos de estresses subsequentes (Uchida et al., 2002; Tanou et al., 2009; Farnese et al., 2016).

O nitroprussiato de sódio (SNP) é conhecido como o doador de NO mais utilizado devido ao seu custo relativamente baixo, aplicação bem documentada, bem como a capacidade de fornecer NO de forma contínua e duradoura, quando comparado aos outros doadores (Floryszak-Wieczorek et al., 2006; Zandonadi et al., 2010; Filippou et al., 2013). Estudos revelam que o tratamento das plantas com doadores de NO aumenta a tolerância das plantas ao estresse salino através de diversos mecanismos. Esse agente sinalizador pode atuar na reprogramação gênica e modulação da atividade de proteínas envolvidas em processos cruciais à célula, tais como, as enzimas antioxidantes, proteínas envolvidas na sinalização hormonal, fotossíntese, biossíntese de osmoprotetores e proteínas envolvidas na homeostase iônica (Zhang et al., 2006; Szabados e Saviouré, 2010; Tanou et al., 2012; Simontacchi et al., 2013; Fancy et al., 2017; Misra et al., 2017).

A espécie *Lactuca sativa*, alface, pertence a família Asteraceae e corresponde ao vegetal folhoso mais apreciado na alimentação humana, devido ao seu conteúdo fitoquímico de promoção a saúde, incluindo polifenóis, carotenoides e vitamina C (Du Pont et al., 2000; Rattler et al., 2005; Llorach et al., 2008). Entretanto, fatores ambientais, como o estresse salino, podem afetar a sua produtividade e pelo fato da maior parte dos cultivares de alface crescerem em regiões que não são afetadas pela salinidade, ainda existem poucas informações a respeito dos mecanismos de sinalização dessa planta em resposta ao estresse (Lima e Vianello, 2011; Bartha et al., 2015).

Atualmente a maior parte dos estudos sobre salinidade avaliam as respostas das plantas quando expostas a um longo período de estresse (semanas ou meses), entretanto, a atuação das moléculas sinalizadoras e as alterações em alguns parâmetros já são observados no período inicial do estresse. Estudos indicam que o estresse salino de curta duração pode afetar o conteúdo de água, ocasionar danos oxidativos e alterar o balanço hormonal das plantas (Sheokand et al., 2008; Zapata et al., 2017). E o NO por ser um agente sinalizador gasoso, consegue atravessar rapidamente as membranas

biológicas, atuando em vários processos fisiológicos em um curto intervalo de tempo (Beligni e Lamattina, 2001). Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do NO nas respostas fisiológicas e bioquímicas de plantas de *L. sativa* expostas ao estresse salino de curta duração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasi H, Jamil M, Haq A, Ali S, Ahmad R, Malik Z (2016) Salt stress manifestation on plants, mechanism of salt tolerance and potassium role in alleviating it: a review. *Žemdirbystė (Agriculture)* 103: 229-238.

Abogadallah GM (2010) Insights into the significance of antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling & Behavior* 5: 369-374.

Acosta-Motos JR, Ortuño MF, Bernal-Vicente A, Diaz-Vivancos P, Sanchez-Blanco M. J, Hernandez JÁ (2017) Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms *agronomy* 7: 18.

Ahmad P, Sharma S (2008) Salt stress and phytochemical responses of plants. *Plant, Soil & Environmental* 54:89-99.

Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology* 30: 161-175.

Ahn C, Park U, Park PB (2011) Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 415: 669-674.

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.

Apse MP, Blumwald E (2007) Na⁺ transport in plants. *FEBS letters* 581: 2247-2254.

Bartha C, Fodorpataki L, Carmen Martinez-Ballesta M, Popescu O, Carvajal M (2015) Sodium accumulation contributes to salt stress tolerance in lettuce cultivars. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 88:1.

Baudouin E (2011) The language of nitric oxide signalling. *Plant Biology* 13: 233-242.

Beligni MV, Lamattina L (2001) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell & Environment* 24: 267-278.

Blumwald E, Aharon GS, Apse MP (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochimica e Biophysica Acta* 1465: 140-151.

Calvet ASF, de Miranda PC, Lima REM, Maia-Joca RPM, Bezerra MA (2013) Crescimento e acumulação de solutos em feijão-de-corda irrigado com águas de salinidade crescente em diferentes fases de desenvolvimento. *Irriga* 18:148.

Corpas FJ, Juan BB (2015) Functions of nitric oxide (NO) in roots during development and under adverse stress conditions. *Plants* 4: 240-252.

Du Pont MS, Mondin Z, Williamson G e Price KR (2000) Effect of variety, processing and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3957-3964.

Egamberdieva D e Lugtenberg B (2014) Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Alleviate Salinity Stress in Plants. *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*. Springer New York 1: 73-96.

Fancy NN, Bahlmann AK, Loake GJ (2017) Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell & Environmental* 40:462-472.

Farnese FS, Oliveira JA, Gusman GS, Leão GA, Ribeiro C, Siman LI, Cambraia J (2013) Plant responses to arsenic: the role of nitric oxide. *Water, Air, and Soil Pollution* 224: 1660-1667.

Farnese FS, Menezes-Silva PE, Gusman GS, Oliveira JA (2016). When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science* 7.

Filippou P, Antoniou C, Fotopoulos V (2013) The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants. *Free Radical Biology and Medicine* 56: 172-183.

Floryszak-Wieczorek J, Milczarek G, Arasimowicz M, Ciszewski A (2006) Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants?. *Planta* 224: 1363-1372.

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.

Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N (2014) Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Abiotic Stress: Molecular Genetics and Genomics*, 15.

Groß F, Durner J, Gaupels F (2013) Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in plant science* 4: 419.

Hasanuzzaman M, Hossain MA, da Silva JAT e Fujita M (2012) Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In *Crop stress and its management: Perspectives and strategies*. Springer Netherlands 261-31.

Hasanuzzaman M, Nahar K, Fujita M (2013) Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. *Ecophysiology and Responses of Plants Under Salt Stress*. Springer, New York, pp. 25–87.

Houmani H, Corpas FJ (2016) Differential responses to salt-induced oxidative stress in three phylogenetically related plant species: *Arabidopsis thaliana* (glycophyte), *Thellungiella salsuginea* and *Cakile maritima* (halophytes). Involvement of ROS and NO in the control of K⁺/Na⁺ homeostasis. *Aims Biophysics* 3: 380-397.

Kausar F, Shahbaz M (2013) Interactive effect of foliar application of nitric oxide (NO) and salinity on wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan Journal of Botany* 45: 67-73.

Lima GP, Vianello F (2011) Review on the main differences between organic and conventional plant-based foods. *International Journal of Food Science and Technology* 46: 1-13.

Llorach R, Martínez-Sánchez A, Tomás-Barberán FA, Gil MI, Ferreres F (2008) Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chemistry* 108: 1028-1038.

Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139-158.

Marschner H (2012) *Mineral nutrition of higher plants*. Third edition. London: Academic Press 651.

Misra AN, Singh R, Misra M, Vladkova R, Dobrikova AG, Apostolova EL (2017) Nitric Oxide Mediated Effects on Chloroplasts. In *Photosynthesis: Structures, Mechanisms, and Applications*. Springer International Publishing 305-320.

Muchate NS, Nikalje GC, Rajurkar NS, Suprasanna P, Nikam TD (2016) Plant salt stress: adaptive responses, tolerance mechanism and bioengineering for salt tolerance. *The Botanical Review* 82: 371-406.

Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.

Nouri MZ, Moumeni A, Komatsu S (2015) Abiotic stresses: insight into gene regulation and protein expression in photosynthetic pathways of plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 392–320.

Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.

Pastori GM, Foyer CH (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology* 129.2: 460-468.

Rattler S, Briviba K, Birzele B, Köpke U (2005) Effect of agronomic management practices on lettuce quality. In *Researching Sustainable Systems. Proceedings of the First Scientific Conference of the International Society of Organic Agriculture Research (ISO FAR)*. Adelaide, Australia 21-23.

Roy SJ, Negrão S, Tester M (2014) Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* 26: 115-124.

Ruiz-Lozano JM, Porcel R, Azcón C, Aroca R (2012) Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies. *Journal of Experimental Botany* 63: 4033-4044.

Seabra AB, Mahendra R, Nelson D (2015) Emerging Role of Nanocarriers in Delivery of Nitric Oxide for Sustainable Agriculture. *Nanotechnologies in Food and Agriculture*. Springer International Publishing 183-207.

Sheokand S, Kumari A, Sawhney V (2008) Effect of nitric oxide and putrescine on antioxidative responses under NaCl stress in chickpea plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 14: 355-362.

Siddiqui MH, Al-Whaibi MH, Basalah MO (2011) Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma* 248: 447-455.

Silveira JA, Silva SL, Silva EN, Viégas RA (2010) Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. *Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados*. Fortaleza: INCTSal 11: 161-180.

Simontacchi M, García-Mata C, Bartoli CG, Santa-María GE, Lamattina L (2013) Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. *Plant Cell Reports* 32: 853-866.

Singh M, Kumar J, Singh S, Singh VP, Prasad SM (2015) Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 14: 407-426.

Suprasanna P, Nikalje GC, Rai AN (2016) Osmolyte accumulation and implications in plant abiotic stress tolerance. In *Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies*; Iqbal N, Nazar R, Khan NA (Ed). Springer, India. 1-12.

Szabados L, Savoure A (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15: 89-97.

Tanou G, Job C, Rajjou L, Arc E, Belghazi M, Diamantidis G, Job D (2009) Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *The Plant Journal* 60: 795-804.

Tanou G, Filippou P, Belghazi M, Job D, Diamantidis G, Fotopoulos V, Molassiotis A (2012) Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. *The Plant Journal* 72: 585-599.

Tavakkoli E, Rengasamy P, McDonald GK (2010) High concentrations of Na⁺ and Cl⁻ ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of *Faba bean* under salinity stress. *Journal of Experimental Botany* 61: 4449-4459.

Tuteja N (2007) Chapter twenty-four-mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in Enzymology* 428: 419-438.

Uchida A, Jagendorf AT, Hibino T, Takabe T, Takabe T (2002) Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science* 163: 515-523.

Zandonadi DB, Santos MP, Dobbss LB, Olivares FL, Canellas LP, Binzel ML, Façanha AR (2010) Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta* 231: 1025-1036.

Zapata PJ, Serrano M, García-Legaz MF, Pretel MT, Botella MA (2017) Short Term Effect of Salt Shock on Ethylene and Polyamines Depends on Plant Salt Sensitivity. *Frontiers in Plant Science* 8.

Zhang Y, Wang L, Liu Y, Zhang Q, Wei Q, Zhang W (2006) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na^+/H^+ antiport in the tonoplast. *Planta* 224: 545-555.

Zhu Q, Zhang J, Gao X, Tong J, Xiao L, Li W, Zhang H (2010) The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses. *Gene* 457: 1-12.

CAPÍTULO I

Papel do óxido nítrico na mitigação dos danos oxidativos em plantas de *Lactuca sativa* L. expostas ao estresse salino de curta duração

RESUMO

CAMPOS, Fernanda Vidal de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2017. **Papel do óxido nítrico na mitigação dos danos oxidativos em plantas de *Lactuca sativa* L. expostas ao estresse salino de curta duração**. Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

A salinidade ocasiona distúrbios metabólicos nas plantas que culminam no desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade do sistema antioxidante de eliminá-las, desencadeando o estresse oxidativo. Entretanto, existem agentes sinalizadores, como o óxido nítrico (NO), que operam para reduzir os danos gerados pelo estresse e consequentemente aumentam a tolerância da planta à condição ambiental imposta. Neste sentido, o presente trabalho foi desenvolvido com a finalidade de avaliar o papel do NO na atenuação dos danos oxidativos desencadeados pela exposição de curta duração à salinidade em *Lactuca sativa*. As plantas foram aclimatadas por 5 dias em solução nutritiva de Clark ½ força iônica, pH 6,5, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob irradiância de $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo luminoso de 16 horas, sendo mantidas sob aeração constante. Decorrido esse período foram submetidas aos tratamentos: controle (apenas solução nutritiva); nitroprussiato de sódio (SNP-doador de NO) (70 μM); cloreto de sódio (NaCl) (80 mM) e NaCl + SNP (80 mM e 70 μM , respectivamente). As plantas permaneceram nos tratamentos por períodos de 6 e 24 horas para as análises da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), atividade enzimática, morte celular e danos de membrana. A presença do NaCl promoveu aumento na concentração de H_2O_2 , que resultou em maiores danos de membrana, detectados pelo incremento no extravasamento de eletrólitos e sinais de morte celular, evidenciados, principalmente, em raízes. A atividade enzimática variou de acordo com a enzima, órgão vegetal, tratamentos e tempos de exposição analisados. De forma geral, observou-se incremento na atividade enzimática quando as plantas eram expostas ao tratamento com apenas NaCl, entretanto, o aumento na atividade das enzimas não resultou em melhorias frente ao estresse. Em raízes expostas ao sal, as enzimas CAT, POX e APX apresentaram redução na sua atividade em determinados períodos de tempo analisados,

sugerindo que o estresse possa ter resultado em efeitos tóxicos na atividade enzimática ou que esse seja um mecanismo para manter a concentração de H_2O_2 em valores adequados para a sinalização. No entanto, plantas expostas ao agente estressor juntamente com o SNP apresentaram menor concentração de H_2O_2 e os danos oxidativos promovidos pelo sal foram revertidos. Tais resultados se correlacionam com o incremento na atividade das enzimas antioxidantes observados nesse tratamento e ao fato do NO poder atuar eliminando diretamente as EROs da célula. A atuação do NO como agente tóxico ou sinalizador de promoção à tolerância durante o estresse irá depender, dentre outros fatores, da sua concentração na planta. Diante disso, a dose aplicada de SNP no presente estudo resultou na atuação do NO como agente mitigador de danos oxidativos gerados pela salinidade em alface, afetando positivamente o seu desempenho.

ABSTRACT

CAMPOS, Fernanda Vidal de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, december, 2017. **Role of nitric oxide in mitigating oxidative damage in plants of *Lactuca sativa* L. exposed to short-term saline stress**. Adviser: Juraci Alves de Oliveira.

Salinity causes metabolic disturbances in plants that culminate in the imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the ability of the antioxidant system to eliminate them, triggering oxidative stress. However, there are signaling agents, such as nitric oxide (NO), that operate to reduce the damage caused by stress and, consequently, increase the tolerance of the plant to the imposed environmental condition. In this sense, the present work was developed with the purpose of evaluating the role of NO in the attenuation of the oxidative damages triggered by short term exposure to salinity in *Lactuca sativa*. The plants were acclimatized for 5 days in Clarck nutrient solution $\frac{1}{2}$ ionic strength, pH 6.5, at 25 ± 2 °C, under irradiance of $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and light photoperiod of 16 hours, being maintained under constant aeration. After this period they were submitted to the treatments: control (nutrient solution only); sodium nitroprusside (SNP-donor NO) (70 μM); sodium chloride (NaCl) (80 mM) and NaCl + SNP (80 mM and 70 μM , respectively). The plants remained in the treatments for a period of 6 and 24 hours for the analyzes of the content of hydrogen peroxide (H_2O_2), enzymatic activity, cell death and membrane damage. The presence of the salt promoted increased H_2O_2 content,

which resulted in increased membrane damage, detected by the increase in electrolyte extravasation and signs of cell death, evidenced, mainly, in roots. The enzymatic activity varied according to the enzyme, plant organ, treatments and exposure times analyzed. In general, an increase in enzyme activity was observed when the plants were exposed to NaCl only treatment, however, the increase in enzyme activity did not result in improvements in stress. In roots exposed to salt, the CAT, POX and APX enzymes showed a reduction in their activity in determined periods of time, which suggests that the stress could have resulted in toxic effects on the enzymatic activity or that this is a mechanism to maintain the levels of H_2O_2 in values suitable for signaling. However, plants exposed to the stressor along with the SNP presented lower H_2O_2 content and the oxidative damage promoted by the salt were reversed. These results correlate with the increase in the activity of antioxidant enzymes observed in this treatment and the fact that NO can act directly eliminating the EROs of the cell. The performance of NO as a toxic agent or promoting signal to stress tolerance will depend, among other factors, on its concentration in the plant. Therefore, the applied dose of SNP in the present study resulted in NO acting as a mitigating agent of oxidative damages generated by salinity in lettuce, affecting positively its performance.

1. INTRODUÇÃO

As plantas por serem organismos sésseis estão constantemente sujeitas a diversos fatores ambientais que podem limitar o seu desenvolvimento. Nesse contexto, a elevada salinidade dos solos é considerada uma das ameaças mais críticas ao desempenho vegetal, pois cerca de 800×10^6 milhões de hectares de terra são afetadas pelo sal em todo o mundo, sendo que esse valor pode aumentar cerca de 1 a 2% anualmente, o que compromete a segurança alimentar (Munns e Tester, 2008; Rizwan et al., 2015).

A alta salinidade dos solos afeta o desempenho das plantas por ocasionar déficit de água e toxicidade iônica nas células. Entretanto, esses processos podem desencadear desordens nas vias metabólicas, que culminam em estresses secundários, como o estresse oxidativo (Abogadallah, 2010; Oukarroum et al., 2015; Nxele et al., 2017; Yousuf et al., 2017).

A resposta inicial das plantas expostas à salinidade é promover o fechamento estomático e assim, reduzir a perda de água por transpiração. Tal mecanismo reduz a concentração interna de CO_2 (C_i) e consequentemente a sua fixação no Ciclo de Calvin. Ao mesmo tempo, a exposição à luz faz com que grande intensidade de fótons cheguem até o aparato fotossintético promovendo reações de oxidação e transferência de elétrons. Desta forma, o desequilíbrio entre as fases fotoquímica e bioquímica da fotossíntese, faz com que os elétrons do fotossistema I (FSI) passem a ser desviados da ferredoxina para o oxigênio, levando a formação de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), processo conhecido como Reação de Mehler. As desordens no transporte de elétrons também promovem a redução do pool de plastoquinona levando a maior formação de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$). Além dos efeitos desencadeados pelo fechamento estomático, o excesso de íons Na^+ e Cl^- na célula pode afetar a integridade dos componentes da cadeia transportadora de elétrons, promovendo uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Hsu et al., 2003; Asada, 2006; Ahmad et al., 2010; Ahmad e Prasad, 2011; Ozgur et al., 2013; Oukarroum et al., 2015).

Em decorrência da diminuição de C_i , a atividade oxigenativa da RUBISCO aumenta, desencadeando incremento na fotorrespiração e maior produção de H_2O_2 nos peroxissomos (Leegood et al., 1995; Noctor et al., 2002; Karpinski et al., 2003; Ghannoum, 2009). Em plantas C3 a fotorrespiração é considerada a principal responsável pela geração de H_2O_2 sob estresse salino, sendo que estudos já demonstram que este mecanismo contribui com até 70% do H_2O_2 na célula. Devido a meia vida relativamente longa e sua permeabilidade através das membranas, o H_2O_2 produzido pode causar danos oxidativos nos peroxissomos bem como em outros sítios celulares (Cushman e Bohnert, 1997; Noctor et al., 2002).

Elevadas concentrações de sais no solo são responsáveis por aumentar a produção de EROs, também, nas mitocôndrias, embora sua produção seja menor quando comparada aos cloroplastos e peroxissomos (Foyer e Noctor, 2005). O excesso de sais promove aumento da atividade respiratória das plantas, possivelmente, devido a maior demanda por ATP mitocondrial para compensar a taxa reduzida de síntese de ATP no cloroplasto. Além disso, a atuação dos mecanismos de defesa sob estresse requer alta demanda energética (Atkin e Macherel, 2009; Norman et al., 2004; Miller et al., 2010; Groß et al., 2013).

Apesar de ser bem conhecido os efeitos danosos das EROs nas células, em condições de estresse, a produção de EROs no apoplasto é considerada uma estratégia

importante para a sinalização. Alguns autores demonstraram que nas primeiras horas de estresse, a produção de H_2O_2 , principalmente pela ação das enzimas NADPH oxidases associadas à membrana, conduz ao processo conhecido como “explosão oxidativa” (oxidative burst). Nesse processo, a produção de EROs é induzida a partir da célula que recebeu o estímulo e se propaga para as células vizinhas, iniciando eventos de sinalização a longa distância, que permitem que todas as células da planta possam alterar sua expressão gênica e metabolismo em resposta ao estresse (Ma et al., 2012; Mittler e Blumwald, 2015; Rejeb et al., 2015; Farnese et al., 2016). Estudos têm demonstrado que a síntese de H_2O_2 no apoplasto pode estar envolvido na mediação de respostas aclimatativas importantes durante a salinidade, como a atuação no fechamento estomático, síntese e fortalecimento da parede celular e regulação da homeostase iônica (Mittler et al., 2011; O'brien et al., 2012; Saha et al., 2015; Houmani e Corpas, 2016).

Em elevadas concentrações as EROs ocasionam danos por oxidar moléculas indispensáveis ao funcionamento celular, tais como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e hidratos de carbono, alterando assim as suas propriedades e funções. Quando as EROs são produzidas e acumuladas demasiadamente a planta sofre desequilíbrio redox, o que eventualmente conduz à morte celular (Abogadallah, 2010; Sharma et al., 2012; Anjum et al., 2014; Aref et al., 2016).

Neste sentido, para lidar com os distúrbios metabólicos induzidos pelas EROs, as plantas dispõem de mecanismos de proteção oxidativa, que incluem a ação de antioxidantes enzimáticos, como a atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e as peroxidases (POX), bem como compostos não enzimáticos, tais como ascorbato (AsA), glutathione (GSH), carotenoides e tocoferóis. Todo esse arsenal bioquímico é formado por uma fração constitutiva e por uma fração induzível, que é expressa em resposta ao surgimento de um estresse (Munns e Tester, 2008; Medeiros et al., 2012; Das e Roychoudhury, 2014; Iqbal et al., 2015).

Diante de uma situação de estresse, diversos agentes sinalizadores atuam mediando respostas à nova condição imposta. O óxido nítrico (NO), em baixas concentrações, é considerado uma molécula sinalizadora e antioxidante de grande relevância na tolerância das plantas ao estresse salino (Uchida et al., 2002; Zhang et al., 2006; Corpas et al., 2011; Salgado et al., 2017). Por apresentar elétron desemparelhado, esse sinalizador consegue reagir diretamente com as EROs, eliminando-as da célula (Hill et al., 2010; Groß et al., 2013). Além disso, o NO pode

atuar interagindo com enzimas antioxidantes aumentando a sua atividade, principalmente, por um processo chamado S-nitrosilação, em que se liga ao grupo tiol do resíduo de cisteína das enzimas (Leitner et al., 2009; Spadaro et al., 2010; Arora et al., 2016).

Em 2009, Tanou et al., relataram pela primeira vez a influência da S-nitrosilação de proteínas na tolerância ao estresse salino e concluiu que possivelmente esta modificação protegeu diversas moléculas celulares das EROs produzidas durante o estresse. Após isso, diversos estudos demonstraram a atuação do NO na modificação e aumento do desempenho das enzimas antioxidantes em condições de alta salinidade (Tanou et al., 2010; Schrawat et al., 2013; Begara-Morales et al., 2013, 2015; Ahmad et al., 2016).

Muitos autores consideram que a tolerância das plantas à salinidade é consequência da sua maior resistência ao estresse oxidativo gerado nessas condições e o NO desempenha papel crucial nesse processo ao apresentar propriedades antioxidantes (Hernández e Almansa, 2002; Groß et al., 2013). Gapinska et al. (2008), ao avaliarem as respostas antioxidantes em plantas de tomate expostas ao estresse salino de curta e longa duração, verificaram que as mudanças na dinâmica das enzimas antioxidantes sugere que o período inicial de exposição ao NaCl é o momento mais importante do estresse oxidativo gerado pela elevada salinidade. Nesse sentido, a hipótese desse trabalho é que o fornecimento de NO, via SNP, irá mitigar os danos oxidativos gerados pela breve exposição ao NaCl, resultando em melhorias frente ao estresse.

A alface (*Lactuca sativa*) por ser uma espécie de ciclo curto e fácil cultivo, torna-se um excelente modelo experimental para avaliar respostas a estresses ambientais. Diante disso, esse estudo teve por objetivo avaliar a intensidade do estresse oxidativo gerado em plantas de *L. sativa* expostas ao estresse salino de curta duração e verificar o papel do NO na manutenção do equilíbrio redox.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivo, aclimação e aplicação dos tratamentos

Plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.), cultivar crespa Vanda, de aproximadamente vinte dias de germinação, foram selecionadas quanto ao vigor e a uniformidade da parte aérea e da raiz. Após selecionadas foram submetidas a um período aclimatativo de 5 dias em solução nutritiva de Clark (1975) ½ força e pH 6,5,

sob aeração constante e foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 2 °C, irradiância de $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo luminoso de 16 horas. Após esse período foram aplicados os seguintes tratamentos: (a) controle (apenas solução nutritiva); (b) nitroprussiato de sódio (SNP-doador de NO) ($70 \mu\text{M}$); (c) cloreto de sódio (NaCl) (80 mM) e (d) NaCl + SNP (80 mM e $70 \mu\text{M}$, respectivamente). As plantas permaneceram nos tratamentos por períodos de 6 e 24 horas, após foi realizada a coleta do material vegetal para a realização das análises.

2.2. Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), amostras de 0,2 g de raízes e de folhas foram homogeneizadas em meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM , pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM , e centrifugadas a $10.000 \times g$, por 15 minutos, à temperatura de 4 °C (Kuo e Kao, 2003). Alíquotas de $50 \mu\text{L}$ do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação constituído de sulfato ferroso amoniacal $100 \mu\text{M}$, ácido sulfúrico 25 mM , laranja de xilenol $250 \mu\text{M}$ e sorbitol 100 mM (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e a absorvância determinada a 560 nm em espectrofotômetro UV/visível Hitachi, modelo U-5100. As concentrações de H_2O_2 foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H_2O_2 .

2.3. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

Os extratos enzimáticos brutos para a determinação da atividade das enzimas foram obtidos pela homogeneização de 0,3 g de raízes e folhas em nitrogênio líquido, seguida da adição de 2 mL de meio de extração, constituído de tampão fosfato de potássio $0,1 \text{ M}$, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) $0,1 \text{ mM}$, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). O homogeneizado foi submetido à centrifugação a $12.000 \times g$ por 15 minutos, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato bruto na determinação da atividade enzimática. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram executadas à temperatura de 4 °C.

2.3.1. Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada pela adição de $50 \mu\text{L}$ do extrato enzimático bruto a 5 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM , pH

7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μ M, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μ M. A reação foi conduzida a 25 °C, em uma câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida pela absorvância a 560 nm. A absorvância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolitis e Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

2.3.2. Determinação da atividade da catalase (CAT, EC1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) e expresso em μ mol de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.3.3. Determinação da atividade das peroxidases totais (POX, EC1.11.1.7)

A atividade das peroxidases foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 4,9 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em μ mol de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.3.4. Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade da peroxidase do ascorbato foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1 mM (Nakano e Asada, 1981, modificado por Koshiba, 1993). O decréscimo na absorvância a 290 nm, à temperatura de 25 °C, foi medido durante o primeiro minuto da reação, sendo, a

atividade da APX determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 0,4 a 0,8 minutos, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nakano e Asada, 1981) e expressa em μmol de ácido ascórbico (AA) $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.3.5. Determinação de proteínas

A determinação de proteínas nos extratos enzimáticos foi realizada pelo método de Bradford (Bradford et al., 1976), utilizando albumina bovina (BSA) para curva padrão.

2.4. Avaliação do extravasamento de eletrólitos

A avaliação do extravasamento de eletrólitos foi realizada segundo adaptação das metodologias descritas por Vasquez-Tello et al. (1990) e Pimentel et al. (2002). Aproximadamente 0,2 g de raízes e folhas de *L. sativa* foram coletados, lavados por 3 vezes em água desionizada e depois transferidos para frascos de vidro contendo 10 mL de água purificada por osmose reversa, onde permaneceram imersos por 6 horas. Após este período mediu-se a condutividade livre (CL, $\mu\text{S}/\text{cm}$), utilizando-se um condutivímetro de bancada (Tecnal, modelo Tec-4MP). Posteriormente, os mesmos frascos foram colocados em estufa a 100°C por 1 hora e após resfriamento foi obtida a condutividade total (CT, $\mu\text{S}/\text{cm}$). Para evitar erro nos resultados, o sensor do condutivímetro foi lavado entre cada leitura com água desionizada. Com os resultados obtidos, calculou-se a taxa de liberação de eletrólitos, dada em porcentagem, por meio da seguinte fórmula: $\text{TLE} = (\text{CL}/\text{CT}) \times 100$, em que TLE= Taxa de liberação de eletrólitos; CL = condutividade livre e CT = condutividade total.

2.5. Avaliação da morte celular

Para avaliar a morte celular foi realizado teste com azul de Evans em amostras de raízes e folhas, imediatamente após a finalização dos tratamentos. Este teste consistiu na imersão dos discos foliares (1 cm de diâmetro) e ápices radiculares (1 cm) durante 40 min em solução de azul de Evans 0,1%. Após esse período, os discos foliares foram submetidos a clarificação por 24 h em álcool 95% em estufa a 65°C (Kato et al., 2007). Após esse processo, os discos foliares e os segmentos radiculares foram fotografados utilizando o auxílio de microscópio estereoscópio e microscópio de luz para melhor visualização das imagens.

2.6. Delineamento experimental e análise estatística

Todos os experimentos foram conduzidos no delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, sendo cada unidade experimental constituída de duas plantas, apresentando cinco repetições. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SISVAR desenvolvido por Ferreira (1999).

3. RESULTADOS

3.1. Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Raízes e folhas de *L. sativa* apresentaram comportamento semelhante durante os dois tempos de exposição aos tratamentos analisados. Plantas submetidas a salinidade apresentaram incremento significativo na concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), quando comparadas às plantas controle, sendo esse aumento de aproximadamente 34% em folhas durante os dois tempos de tratamento e, 18% e 30% em raízes durante 6 e 24 horas, respectivamente (Figura 1).

Entretanto, a exposição ao tratamento com NaCl juntamente com o doador de NO resultou em valores de H₂O₂ similares ao observado em plantas controle e expostas somente ao SNP (Figura 1).

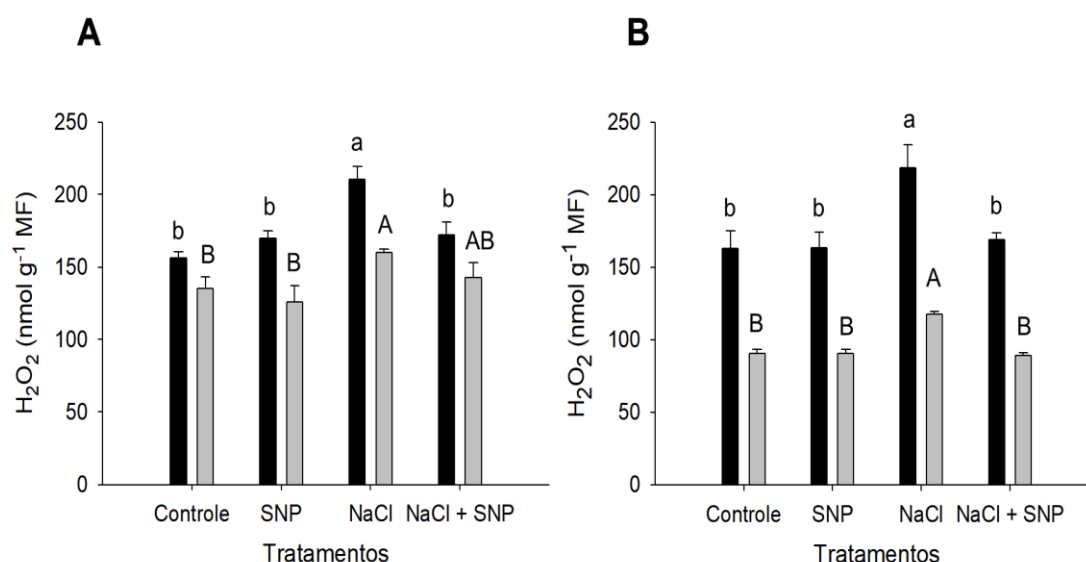


Figura 1. Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em folhas (■) e raízes (▒) de *L. sativa* expostas aos tratamentos por 6 (A) e 24 horas (B). Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (folha) e maiúsculas (raízes) não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

3.2. Integridade da membrana

Em plantas expostas ao tratamento com NaCl, os danos de membrana, mensurável através do incremento no extravasamento de eletrólitos, foram observados durante os dois tempos analisados. Em folhas a taxa de extravasamento de eletrólitos aumentou 14% em relação ao controle durante as primeiras 6 horas de estresse e se intensificou após as 24 horas, em que foi observado incremento na ordem de 102%. Em raízes, as primeiras 6 horas já foram suficientes para desencadear danos em proporções elevadas, que se intensificaram ao longo do tempo. Sendo o aumento na taxa de extravasamento de eletrólitos de aproximadamente 65% e 79%, durante 6 e 24 horas, respectivamente (Figura 2A e 2B).

A exposição de *L. sativa* ao tratamento com NaCl juntamente com SNP permitiu que os danos fossem significativamente menores em raízes quando comparadas as plantas expostas somente ao NaCl, sendo esses resultados observados durante os dois tempos analisados. Tal redução ocorreu na ordem de 25% e 29% durante 6 e 24 horas, respectivamente. No entanto, em folhas essa redução ocorreu em aproximadamente 19%, somente durante 6 horas de tratamento, sendo que após as 24 horas não variou significativamente em relação ao tratamento com NaCl (Figura 2A e 2B).

Folhas de plantas expostas ao SNP isoladamente apresentaram os níveis de extravasamento de eletrólitos semelhantes aos encontrados para plantas controle, já em raízes os danos foram inferiores (Figura 2A e 2B).

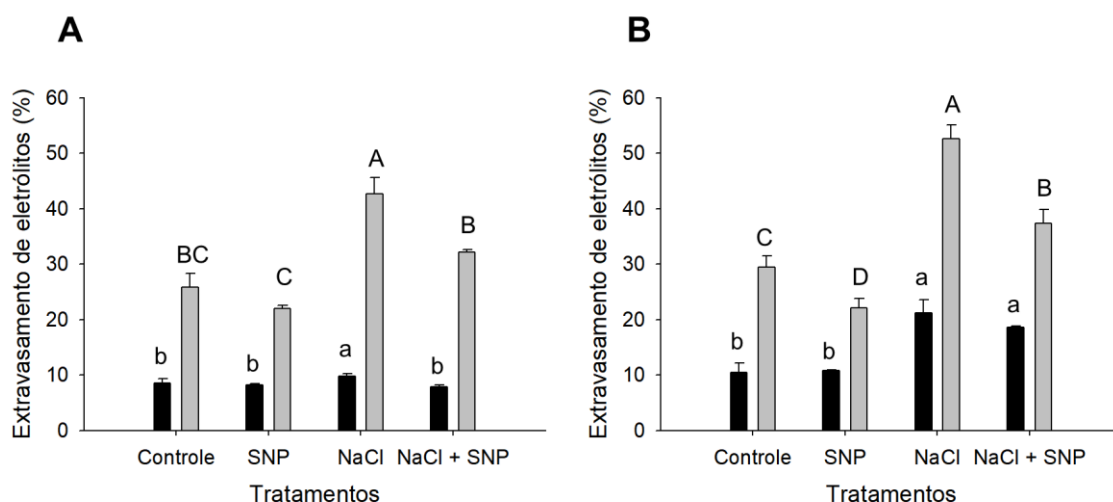


Figura 2. Extravasamento de eletrólitos em folhas (■) e raízes (▒) de *L. sativa* expostas aos diferentes tratamentos por 6 (A) e 24 horas (B). Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (folha) e maiúsculas (raízes) não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

3.3. Atividade das enzimas antioxidantes: dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidases (POX) e peroxidase do ascorbato (APX)

Plantas de *L. sativa* apresentaram incremento na atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD) quando expostas ao sal por 6 horas, sendo esse de aproximadamente 48% em folhas e 35% em raízes, ambos comparados aos respectivos controles. A exposição ao agente estressor junto ao SNP resultou em aumento na atividade da enzima em raízes, na ordem de 86%, 80% e 38%, em relação aos tratamentos controle, SNP e NaCl, respectivamente. Folhas expostas a esse mesmo tratamento não apresentaram variação significativa na atividade da SOD quando comparadas ao tratamento com apenas NaCl e apenas SNP, entretanto aumento de 33% foi observado em relação ao controle. Em raízes a exposição SNP resultou em valores similares ao observado no controle, mas em folhas ocasionou incremento na atividade da enzima em aproximadamente 29% (Figura 3A).

Nos dois órgãos vegetais analisados a atividade da SOD apresentou comportamento similar após o período de 24 horas de exposição aos tratamentos, em que observou-se incremento na atividade enzimática em plantas expostas ao NaCl, sendo esse na ordem de 20% em folhas e 23% em raízes. Nos demais tratamentos analisados a atividade da enzima apresentou valores similares ao controle (Figura 3B).

A atividade da enzima catalase (CAT) apresentou comportamento diferenciado em raízes e folhas de *L. sativa* após as primeiras 6 horas de estresse salino. De forma que em folhas observou-se incremento acentuado na atividade enzimática, em aproximadamente 137%, enquanto em raízes a atividade não variou em relação ao controle. Verificou-se redução na atividade da CAT em aproximadamente 23% em raízes de plantas expostas ao SNP, mas quando foram expostas ao SNP juntamente com o agente estressor, a atividade não variou significativamente em relação ao controle, sendo observados resultados similares em folhas (Figura 3C).

Após 24 horas, as folhas apresentaram incremento na atividade da CAT em aproximadamente 61% e 40%, quando expostas aos tratamentos com NaCl e NaCl junto ao SNP, respectivamente. A exposição ao SNP resultou em valores similares aos encontrados em plantas controle. Em raízes, a salinidade promoveu redução na atividade enzimática em aproximadamente 36% em relação ao controle. Entretanto, quando as mesmas foram submetidas ao NaCl juntamente com o doador de NO a atividade da CAT se restabeleceu, obtendo valores similares ao observado em plantas expostas aos tratamentos controle e SNP (Figura 3D).

A atividade da enzima peroxidase (POX) apresentou comportamento distinto em folhas e raízes expostas à salinidade por 6 horas. Em folhas observou-se incremento de aproximadamente 72%, enquanto em raízes a atividade enzimática declinou em 23%, ambos em relação aos respectivos controles. No entanto, a exposição ao NaCl juntamente com o SNP resultou em incremento na atividade da POX em folhas e raízes, sendo esse na ordem de 107% e 21% em folhas e, 39% e 82% em raízes, ambos comparados aos tratamentos controle e NaCl, respectivamente. Tanto em folhas quanto em raízes a exposição ao SNP resultou em valores de atividade enzimática similares aos observados em plantas controle (Figura 3E).

Plantas submetidas ao NaCl por 24 horas, apresentaram incremento na atividade da POX em aproximadamente 29% e 91% em folhas e raízes, respectivamente, ambos comparados aos respectivos controles. Em folhas a exposição ao NaCl acrescido do SNP ocasionou padrão de atividade enzimática similar ao observado em plantas expostas ao controle e somente ao SNP. Já em raízes expostas ao mesmo tratamento, a atividade da POX não diferiu em relação ao tratamento com apenas SNP, mas apresentou incremento de aproximadamente 38% em relação ao controle (Figura 3F).

A atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) apresentou aumento na ordem de 92% e 150% em folhas de plantas expostas aos tratamentos com NaCl e NaCl junto ao SNP por 6 horas, respectivamente. Entretanto esses tratamentos não variaram significativamente entre si. Em raízes observou-se decréscimo na atividade dessa enzima em plantas expostas ao NaCl por esse mesmo período, sendo esse de aproximadamente 17%, quando comparado ao controle. Mas a exposição ao agente estressor acrescido do SNP fez com que a atividade da APX em raízes recuperasse, obtendo-se incrementos de aproximadamente 16% e 40%, em relação aos tratamentos controle e NaCl, respectivamente. Tanto em folhas quanto em raízes a exposição ao SNP por 6 horas resultou em valores similares aos observados em plantas controle (Figura 3G).

A exposição aos tratamentos por 24 horas resultou em atividade similar da enzima APX em folhas e raízes de *L. sativa*. Sendo que em ambos os órgãos vegetais observou-se incrementos na atividade enzimática em plantas expostas ao NaCl e ao NaCl junto ao SNP, sendo esses de aproximadamente 180% e 317% em folhas e, 144% e 236% em raízes, ambos comparados aos controles. Em folhas e raízes expostas ao

SNP a atividade da APX não variou significativamente em relação aos seus controles (Figura 3H).

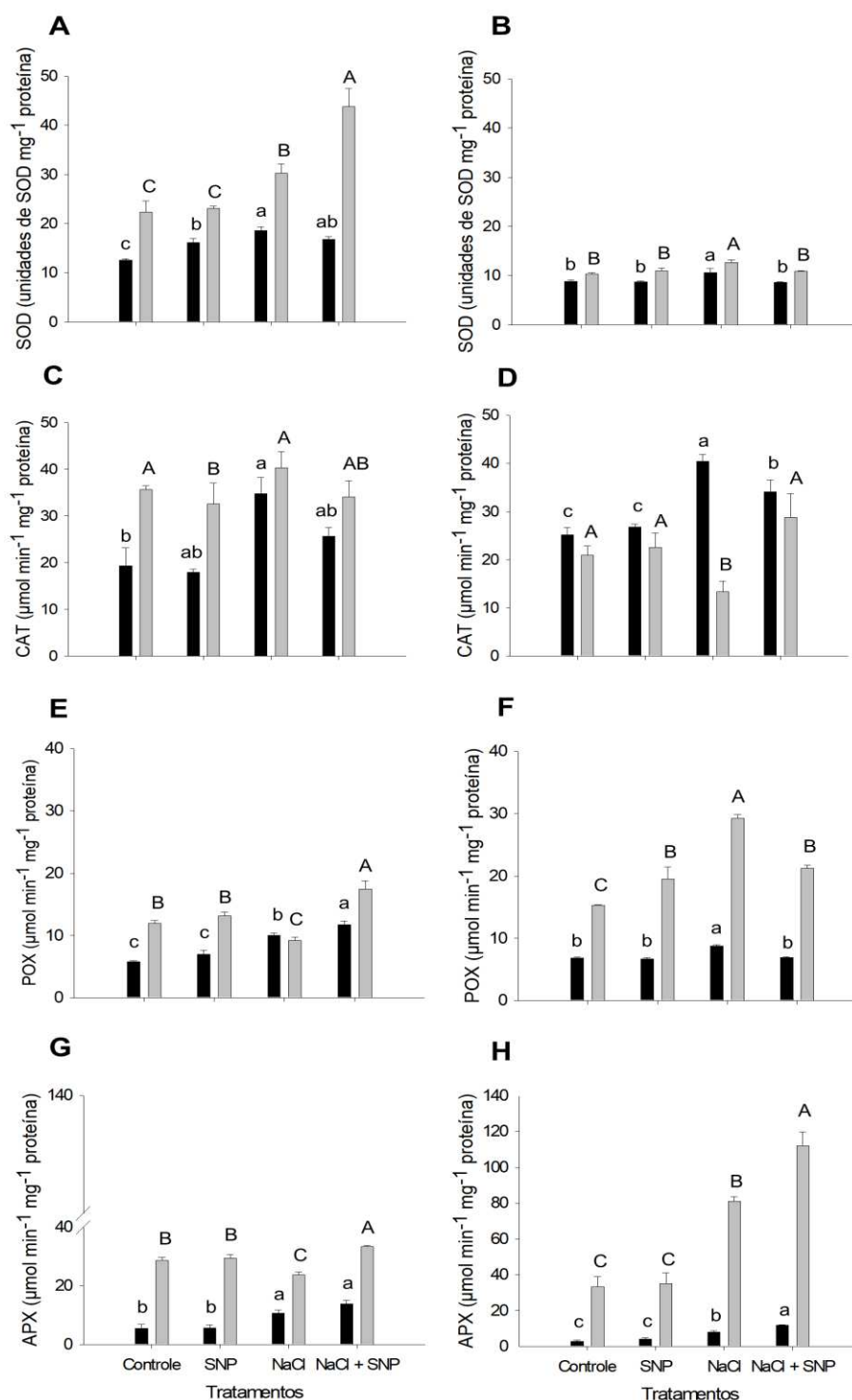


Figura 3. Atividade das enzimas antioxidantes em folhas (■) e raízes (▒) de plantas de *L. sativa* expostas aos diferentes tratamentos: SOD: dismutase do superóxido (A) e (B); CAT: catalase (C) e (D); POX: peroxidases (E) e (F); APX: peroxidase do ascorbato (G) e (H) por 6 e 24 horas, respectivamente. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (folha) e maiúsculas (raízes) não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

De forma geral, observou-se uma redução pronunciada na atividade da SOD em raízes e folhas de plantas expostas aos tratamentos por 24 horas. Em contrapartida, as peroxidases, especialmente a APX, apresentou incremento pronunciado em sua atividade nesse mesmo período de tempo analisado, principalmente em raízes (Figura 3A, 3B, 3G e 3H).

3.4. Morte celular em folhas e raízes de *L. sativa*

Discos foliares de plantas de *L. sativa* expostas aos tratamentos por 6 horas não apresentaram evidências de morte celular (Figura 4A, 4C, 4E, 4G). No entanto, em plantas expostas ao estresse salino por 24 horas, foram observadas nos discos foliares algumas regiões coradas com o Azul de Evans, indicador de morte celular. Já nos demais tratamentos, expostos a esse mesmo intervalo de tempo, não foram constatadas variações pronunciadas na coloração (Figura 4B, 4D, 4F e 4H).

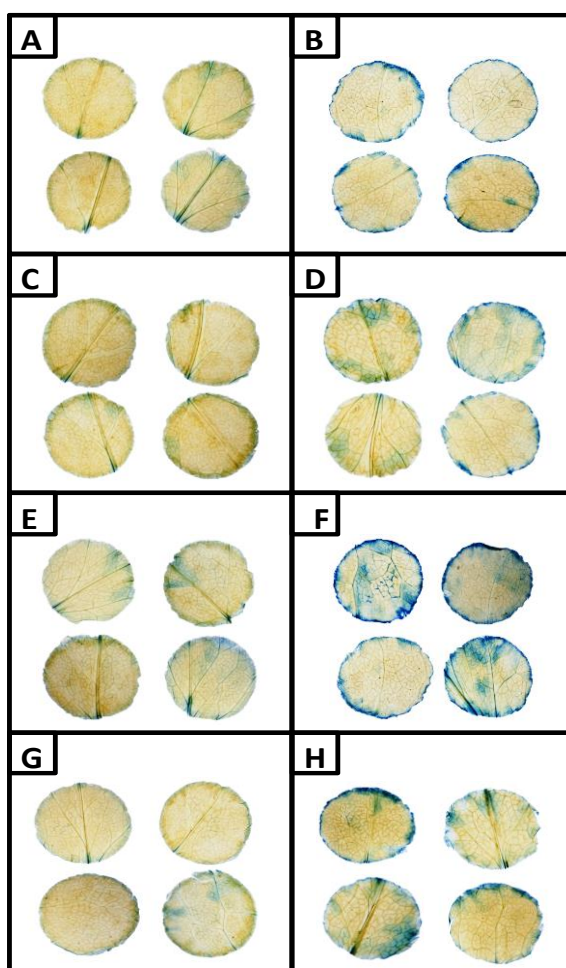


Figura 4. Morte celular em discos foliares de plantas de *L. sativa* expostas aos tratamentos: controle (A) e (B); SNP (C) e (D); NaCl (E) e (F); NaCl + SNP (G) e (H) por 6 e 24 horas, respectivamente.

Em segmentos radiculares foi detectada regiões de morte celular em plantas expostas a salinidade durante os dois intervalos de tempo analisados, sendo mais perceptível em raízes expostas ao estresse por 24 horas. No entanto, nos demais tratamentos não foram verificados indicativos de morte celular, evidenciados pela ausência do marcador Azul de Evans (Figura 5).

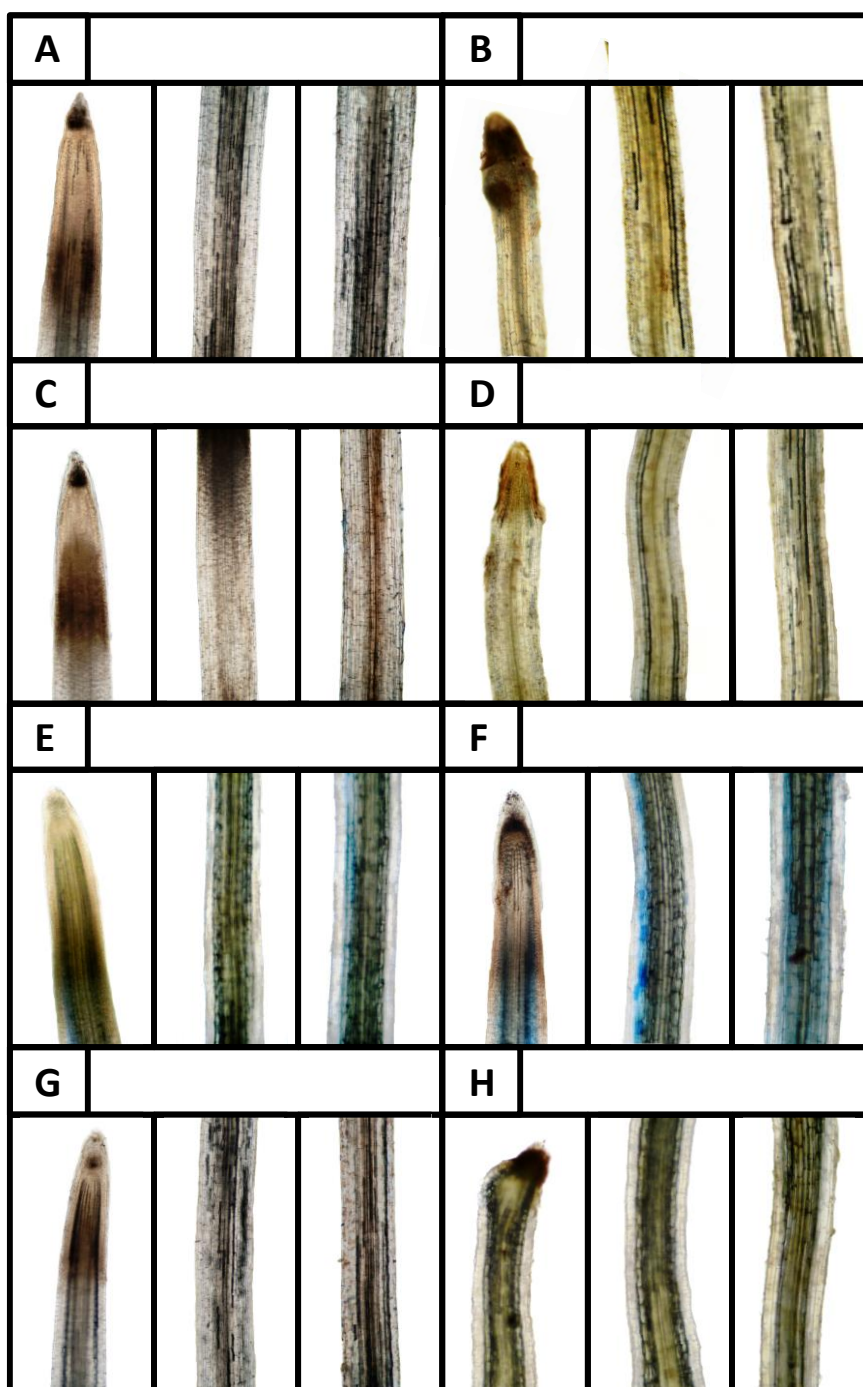


Figura 5. Morte celular em segmentos de raízes de *L. sativa* expostas aos tratamentos: controle (A) e (B); SNP (C) e (D); NaCl (E) e (F); NaCl + SNP (G) e (H) por 6 e 24 horas, respectivamente.

4. DISCUSSÃO

Durante todo o seu ciclo de vida, as plantas estão realizando atividades metabólicas que culmina em em subprodutos inevitáveis, como as espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas são formadas pela redução incompleta ou excitação do oxigênio molecular, resultando em oxidantes fortes que podem reagir com uma grande variedade de moléculas biológicas (Abogadallah, 2010; Petrov e Van Breusegem, 2012; Demidchik, 2015).

Uma vez que o metabolismo aeróbico é baseado no fluxo de elétrons através das membranas mitocondriais e/ou plastidiais, danos no metabolismo em decorrência de uma condição de estresse culmina no desvio de elétrons para o oxigênio, resultando no aumento da produção de EROs (Ismail et al., 2014). Em plantas de *L. sativa* expostas a salinidade, observou-se aumento na produção de H_2O_2 durante os dois tempos de tratamento analisados. Segundo Miller et al. (2010) e Rejeb et al. (2015) essa acumulação de H_2O_2 é uma resposta precoce comum em condições de estresse salino.

Como os efeitos do sal são complexos, o aumento na geração de H_2O_2 nessa condição pode ocorrer por diversas fontes. O fechamento estomático induzido pelo efeito osmótico da salinidade, reduz a disponibilidade e fixação do carbono no Ciclo de Calvin, expondo os cloroplastos a energia de excitação excessiva que, por sua vez, conduz ao maior desvio de elétrons para o oxigênio resultando na formação de EROs. Além disso, a redução de CO_2 interna promove o incremento na taxa de fixação do oxigênio pela RUBISCO, aumentando a taxa fotorrespiratória e a produção de H_2O_2 nos peroxissomos. EROs também podem ser formadas devido aos efeitos tóxicos dos íons Na^+ e Cl^- no sistema de transporte de elétrons e pelo aumento da atividade das enzimas NADPH oxidases associadas a membrana (Parida e Das, 2005; Ahmad e Sharma, 2008; Ashraf 2009, Abogadallah, 2010; Gill e Tuteja, 2010; Ahmad et al., 2011). Em plantas de *Arabidopsis thaliana* foi demonstrado que as NADPH oxidases são as principais responsáveis pela produção de H_2O_2 em resposta ao estresse salino de curta duração. Relatando ainda que essa produção precoce de H_2O_2 pode atuar como sinalizador estimulando a atividade de enzimas antioxidantes para que a planta possa lidar com o estresse a longo prazo (Leshem et al., 2007; Rejeb et al., 2015).

A exposição ao NaCl acrescido do doador de NO resultou em menor produção de H_2O_2 em plantas de *L.sativa* . O NO tem a capacidade de reduzir os danos oxidativos

por atuar neutralizando diretamente as EROs, eliminando-as da célula. Apesar de poder atuar de diversas formas, a interação mais conhecida é a do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) com o NO para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), molécula que é rapidamente decomposta em produtos estáveis (Hill et al., 2010; Groß et al., 2013; Sheokand e Kumari, 2015). O H_2O_2 é um produto inevitável da presença do $O_2^{\bullet-}$, uma vez que esse último é rapidamente dismutado a H_2O_2 em pH baixo ou por ação da enzima dismutase do superóxido (SOD). Dessa forma, a atuação do NO em reduzir o $O_2^{\bullet-}$ resulta na menor concentração de H_2O_2 encontrada. Além disso, o NO pode atuar reduzindo a concentração de EROs por induzir a expressão gênica e modular a atividade das enzimas antioxidantes (Groß et al., 2013; Arora et al., 2016).

As EROs são altamente reativas e podem causar danos através da oxidação de hidratos de carbono, desnaturação proteica, danos ao DNA e peroxidação lipídica nas membranas celulares. Sendo esse último fator considerado uma das principais causas de toxicidade celular mediada pelas EROs (Noctor e Foyer, 1998 ; Apel e Hirt, 2004; Ahmad et al., 2010; Hossain et al., 2011; Hayat et al., 2012). Em plantas de *L. sativa*, a salinidade aumentou a concentração de H_2O_2 e a permeabilidade das membranas, mensurável através do maior extravasamento de eletrólitos nesse tratamento. Entretanto, a exposição ao doador de NO minimizou as alterações na membrana, possivelmente devido ao seu papel em reduzir danos oxidativos e aumentar a concentração de cálcio no citoplasma, íon essencial na estabilidade das membranas. Tais resultados também foram observados em *Glycine max* (Simaei et al., 2011), *Lycopersicon esculentum* (Wu et al., 2011), *Triticum aestivum* (Hasanuzzaman et al., 2012a), *Brassica juncea* (Khan et al., 2012) e *Cicer arietinum* (Sheokand et al., 2010; Ahmad et al., 2016).

Nesse contexto, para impedir os danos desencadeados pelo excesso de EROs as plantas dispõem de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos de defesa, que atuam de forma coordenada e em diferentes compartimentos celulares. As principais enzimas envolvidas na eliminação das EROs reportadas em estudos sobre estresse salino são as dismutases do superóxido (SOD), catalase (CAT) e as peroxidases (POX), dentre o qual se destaca a peroxidase do ascorbato (APX).

Em plantas de *L. sativa* a salinidade resultou em respostas variáveis na atividade enzimática de acordo com os tratamentos, órgãos e tempos de exposição analisados. A dismutase do superóxido (SOD) é considerada a primeira linha de defesa enzimática contra as EROs, uma vez que atua dismutando o $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2

(Hasanuzzaman et al., 2012b). No presente estudo, a salinidade promoveu aumento na atividade dessa enzima nas primeiras horas de estresse. Tal resultado foi observado também em plantas de cevada, o que pode indicar a importância da dismutação do $O_2^{\cdot-}$ nas fases iniciais da sinalização em resposta ao estresse salino (Maksimović et al., 2013).

O incremento na atividade da SOD resulta na maior produção de H_2O_2 , que por sua vez, pode ser eliminado através da atividade das enzimas catalase (CAT), que converte diretamente H_2O_2 em O_2 e H_2O e as peroxidases (POX), em especial a peroxidase do ascorbato (APX), que pode reduzir o H_2O_2 a H_2O no cloroplasto, citossol, mitocôndrias, peroxissomos e espaço apoplástico, utilizando nesse processo o ascorbato como doador de elétrons (Sofa et al., 2015). De forma geral, foi observado em plantas de *L. sativa* aumento na atividade das enzimas CAT, POX e APX quando expostas ao estresse salino, o que possivelmente está relacionado com a necessidade de remoção do excesso de H_2O_2 produzido nessa condição. O aumento na atividade dessas enzimas também foi observado em *Solanum Lycopersicum* (Hayat et al., 2012; Manai et al., 2014), *Triticum aestivum* (Kausar et al., 2013), *Carthamus tinctorius* (Gengmao et al., 2015); *Cicer arietinum* (Ahmad et al., 2016); *Phaseolus vulgaris* (Taïbi et al., 2016) e *Brassica juncea* (Yousuf et al., 2017).

O aumento na atividade das enzimas antioxidantes é considerado um indicativo de maior tolerância das plantas ao estresse (Iqbal et al., 2015; Lei et al., 2016; Hernández et al., 2017). Entretanto, no presente estudo o incremento na atividade enzimática em plantas expostas ao NaCl, não resultou em melhorias frente ao estresse, evidenciados pelos maiores concentrações de H_2O_2 e danos de membrana observados nesse tratamento. Segundo Miller et al. (2010) a sobrevivência das plantas sob estresse depende do equilíbrio entre a geração e a desintoxicação de EROs pelo sistema antioxidante, sugerindo que plantas de *L. sativa* não conseguiram alcançar a homeostase redox no período analisado.

Além disso, foi observado em raízes que após as primeiras 6 horas de estresse ocorreu redução na atividade da POX e APX, enquanto a CAT reduziu sua atividade após 24 horas. Tal resultado sugere um efeito tóxico do sal sobre a produção e atividade dessas enzimas (Mittler, 2002; Srineng et al., 2015). Mas pode indicar, também, um mecanismo de tolerância, pois segundo Maksimović et al. (2013), o aumento inicial na atividade de enzimas que eliminam o H_2O_2 pode interferir em redes de sinalização, não sendo um fator vantajoso sob condições de estresse, uma vez que

o H_2O_2 atua na sinalização celular. Alguns autores demonstraram que nas primeiras horas de estresse, a atividade enzimática reduzida é acompanhada por maior produção de H_2O_2 , principalmente pela ação das enzimas NADPH oxidases associadas à membrana (Rejeb et al., 2015; Farnese et al., 2016).

No presente estudo foi observado que em determinados tempos de exposição aos tratamentos e/ou órgãos analisados, a atividade das enzimas antioxidantes apresentaram incremento quando expostas ao NaCl acrescido do doador de NO, SNP. Tal comportamento também foi observado em arroz (Uchida et al., 2002); trigo (Hasanuzzaman et al., 2011); tomate (Wu et al., 2011; Hayat et al., 2012; Manai et al., 2014); mostarda (Khan et al., 2012); algodão (Dong et al., 2014) e grão-de-bico (Sheokand et al., 2010; Ahmad et al., 2016). Por apresentar um elétron não emparelhado no seu orbital externo, o NO pode interagir com uma grande variedade de moléculas, levando a modulação da função protéica e a reprogramação da expressão gênica. Recentemente a interação mais estudada é a ligação reversível do NO com proteínas através de uma mecanismo conhecido como S-nitrosilação, que consiste na ligação do NO a um grupo tiol (SH) do resíduo de cisteína (Cys) (Spadaro et al., 2010; Hill et al., 2010; Fukuto e Carrington, 2011; Toledo e Augusto 2012). A S-nitrosilação têm sido demonstrada aumentar a atividade das enzimas antioxidantes sob condições de estresse salino (Tanou et al., 2009; Romero-Puertas et al., 2013; Begara-Morales et al., 2014, 2015; Yang et al., 2015; Fancy et al., 2017), o que justifica o incremento na atividade enzimática observado em *L. sativa* na presença do SNP.

Entretanto, foi verificado, também, atividade enzimática inferior em plantas expostas ao NaCl acrescido do SNP quando comparadas às plantas expostas somente ao agente estressor. No entanto, a menor atividade enzimática não implicou em aumento na produção de H_2O_2 nesse tratamento, o que pode ser justificado pelo fato do NO ter atuação direta na eliminação das EROs, ou seja, ele pode atuar assumindo as funções do sistema antioxidante, impedindo a sua ativação (Groß et al., 2013).

Apesar de ser amplamente conhecido o papel das EROs como agentes tóxicos à célula, essas moléculas podem também atuar como sinalizadoras em uma grande variedade de processos celulares, bem como em resposta as condições de estresses. Entretanto, essa dupla função irá depender, principalmente, da concentração das EROS na célula, de forma que em doses menores são empregadas como sinalizadoras, mas em elevadas concentrações representam uma ameaça que pode culminar na morte

celular programada (PCD) (Petrov e Van Breusegem, 2012; Baxter et al., 2014; Mittler, 2017).

A PCD é um mecanismo que ocorre naturalmente em algumas situações durante o desenvolvimento da planta, mas também em situações em que a mesma é exposta ao estresse ambiental intenso, como a salinidade. Tal mecanismo inclui o aumento no nível das EROs e apesar de ser deletério para células individuais, pode ser um processo adaptativo para a planta como um todo, uma vez que é utilizado para isolar e remover tecidos danificados (Munns e Tester, 2008; Van Doorn, 2011a,b; De Pinto et al., 2012; Petrov et al., 2015). Plantas de *L. sativa* expostas a salinidade apresentaram regiões de morte celular, principalmente, nos tecidos radiculares. Tal resultado pode estar relacionado com o aumento na concentração de H_2O_2 encontrada nessa condição, mas também devido ao desbalanço iônico promovido pelo sal.

O K^+ é necessário em muitos processos fisiológicos das plantas, incluindo a síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Assim, tem sido demonstrado que a salinidade pode induzir a PCD ao promover desequilíbrio iônico, que resulta em aumento na concentração de Na^+ no citossol acompanhada pela deficiência de K^+ (Joseph e Jini, 2010; Kim et al., 2014). Apesar dos efeitos iônicos do estresse salino ocorrem mais tarde, em plantas de *L. sativa* sinais de morte celular já foram evidentes nas primeiras 24 horas de tratamento com NaCl. Pelo fato da alface apresentar taxas de crescimento e transpiração elevadas, a absorção de íons salinos pode ocorrer rapidamente. Resultados similares foram observados por De Costa et al. (2007) e Zörb et al. (2009), que observaram em plantas de milho expostas a elevada salinidade, o influxo de Na^+ nas primeiras quatro horas de estresse. Além disso, as EROs podem atuar estimulando a atividade de canais permeáveis ao K^+ (NSCC), resultando no efluxo desse íon e consequentemente na sinalização para morte celular (Demidchik et al., 2003; Shabala, 2009; Demidchik et al., 2010).

Segundo Wang et al. (2013a,b) o NO atua como mediador em várias etapas da sinalização induzida pelas EROs que culminam na morte celular. Entretanto, em plantas de *L. sativa* a presença do NO reduziu os danos da salinidade, evidenciados pela ausência de morte celular, tal como observado em plantas de milho (Keyster et al., 2012). Esse resultado pode ser explicado pelo fato do NO atuar como antioxidante, mas também devido ao seu papel na homeostase iônica sob condições de salinidade. Estudos evidenciam que o fornecimento exógeno de NO aumenta a relação K^+/Na^+ em plantas expostas ao estresse salino, o que está relacionado com o aumento na atividade

do antiporte Na^+/H^+ e das H^+ -ATPases da membrana plasmática e vacúolo (Wang et al., 2009; Molassiotis et al., 2010; Khan et al., 2012).

Assim, o presente estudo apresentou evidências de que o fornecimento exógeno de NO reduz os danos oxidativos em plantas de *L. sativa* nas primeiras 6 e 24 horas de estresse salino. No entanto, as modificações ocasionadas por esse sinalizador são na maioria das vezes reversíveis, apresentando um padrão de atuação temporal. Diante disso, para uma melhor compreensão da importância do NO nas vias de tolerância ao estresse, torna-se de grande relevância avaliar a sua atuação, também, a longo prazo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abogadallah GM (2010) Insights into the significance of antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling & Behavior* 5: 369-374.

Ahmad P, Sharma S (2008) Salt stress and phytochemical responses of plants. *Plant, Soil & Environmental* 54:89-99.

Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology* 30: 161-175.

Ahmad P, Prasad MNV (2011) Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability. Springer Science & Business Media.

Ahmad P, Latef AAA, Hashem A, Abd_Allah EF, Gucel S, Tran LSP (2016) Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea. *Frontiers in Plant Science*, 7.

Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiology* 109:1247-1257.

Anjum NA, Sofo A, Scopam A, Roychoudhury A, Gill SS, Iqbal M, Lukatkin AS, Pereira E, Duarte AC, Ahmad I (2014) Lipids and proteins-major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 4099-4121.

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.

Aref IM, Khan PR, Khan S, El-Atta H, Ahmed AI, Iqbal M (2016) Modulation of antioxidant enzymes in *Juniperus procera* needles in relation to habitat environment and dieback incidence. *Trees* 30: 1669-1681.

Arora D, Jain P, Singh N, Kaur H, Bhatla SC (2016). Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants. *Free Radical Research* 50: 291-303.

Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141: 391-396.

Ashraf M (2009) Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances* 27: 84-93.

Atkin OK, Macherel D (2009) The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany* 103: 581-597.

Baxter A, Mittler R, Suzuki N (2014) ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* 65: 1229-1240.

Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44:276-287.

Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Chaki M, Valderrama R, Mata-Pérez C, López-Jaramillo J, Barroso JB (2013) Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* 396.

Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Chaki M, Valderrama R, Mata-Pérez C, López-Jaramillo J, Barroso JB (2014) Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* 65: 527-538.

Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Chaki M, Valderrama R, Mata-Pérez C, Padilla MN, Barroso JB (2015) Modulation of the Ascorbate–Glutathione Cycle Antioxidant Capacity by Posttranslational Modifications Mediated by Nitric Oxide in Abiotic Stress Situations. In *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress* (pp. 305-320). Springer International Publishing.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Chance B, Maehley AC (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology* 2:755-764.

Clark RB (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23: 458-460.

Corpas FJ, Leterrier M, Valderrama R, Airaki M, Chaki M, Palma JM, Barroso JB (2011) Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science* 181: 604-611.

Cushman JC, Bohnert HJ (1997) Molecular genetics of Crassulacean acid metabolism. *Plant Physiology* 113: 667-76.

Das K, Roychoudhury A (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 2: 53.

De Costa W, Zörb C, Hartung W, Schubert S (2007) Salt resistance is determined by osmotic adjustment and abscisic acid in newly developed maize hybrids in the first phase of salt stress. *Physiologia Plantarum* 131: 311-321.

De Pinto MC, Tommasi F, Gara LD (2002) Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 Cells *Plant Physiology* 130:698-708.

De Pinto MC, Locato V, De Gara L (2012) Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant, Cell & Environment* 35: 234-244.

Demidchik V, Shabala SN, Coutts KB, Tester MA, Davies JM (2003) Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca^{2+} - and K^{+} -permeable channels in plant root cells. *Journal of Cell Science* 116: 81-88.

Demidchik V, Cuin TA, Svistunenko D, Smith SJ, Miller AJ, Shabala S, Yurin V (2010) Arabidopsis root K^{+} -efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science* 123: 1468-1479.

Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* 109: 212-228.

Dong YJ, Jinc SS, Liu S, Xu LL, Kong J (2014) Effects of exogenous nitric oxide on growth of cotton seedlings under NaCl stress. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 14: 1-13.

Fancy NN, Bahlmann AK, Loake GJ (2017) Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell & Environmental* 40:462-472.

Farnese FS, Menezes-Silva PE, Gusman GS, Oliveira JA (2016). When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science* 7.

Foyer CH e Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* 17: 1866-1875.

Fukuto JM, Carrington SJ (2011) HNO signaling mechanisms. *Antioxidants & Redox Signaling* 14: 1649-1657.

Gapińska M, Skłodowska M, Gabara B (2008) Effect of short-and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 11.

Gay C, Gebicki JM (2000) A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xynol orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry* 284:217-220.

Gechev TS, Hille J (2005) Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *The Journal of Cell Biology* 168: 17-20.

Gengmao Z, Yu H, Xing S, Shihui L, Quanmei S, Changhai W (2015) Salinity stress increases secondary metabolites and enzyme activity in safflower. *Industrial Crops and Products* 64: 175-181.

Ghannoum O (2009) C4 photosynthesis and water stress. *Annals of Botany* 103:635-44.

Giannopolitis CN e Ries SK (1977) Superoxide dismutase In higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.

Gill SS e Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.

Groß F, Durner J, Gaupels F (2013) Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science* 4: 419.

Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam MM, Fujita M (2012a) Exogenous nitric oxide alleviates high temperature induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by modulating the antioxidant defense and glyoxalase system. *Australian Journal of Crop Science* 6: 1314.

Hasanuzzaman M, Hossain MA, da Silva JAT, Fujita M (2012b) Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In *Crop Stress and Its Management: Perspectives and Strategies* (pp. 261-315). Springer Netherlands.

Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84:450-455.

Hayat S, Yadav S, Wani AS, Irfan M, Alyemini MN, Ahmad A (2012) Impact of sodium nitroprusside on nitrate reductase, proline content, and antioxidant system in tomato under salinity stress. *Horticulture, Environment & Biotechnology* 53: 362-367.

Hernández JA, Almansa MS (2002) Short- term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum* 115: 251-257.

Hernández JA, Barba-Espín G, Clemente-Moreno MJ, Díaz-Vivancos P (2017) Plant Responses to Salinity Through an Antioxidative Metabolism and Proteomic Point of View. In *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective*, Volume 2 (pp. 173-200). Springer International Publishing.

Hill BG, Dranka BP, Bailey SM, Lancaster JR, Darley-Usmar VM (2010) What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *Journal of Biological Chemistry* 285: 19699-19704.

Hossain MA, Hasanuzzaman M, Fujita M (2011) Coordinate induction of antioxidant defense and glyoxalase system by exogenous proline and glycinebetaine is correlated with salt tolerance in mung bean. *Frontiers of Agriculture in China* 5: 1-14.

Houmani H, Corpas FJ (2016) Differential responses to salt-induced oxidative stress in three phylogenetically related plant species: *Arabidopsis thaliana* (glycophyte), *Thellungiella salsuginea* and *Cakile maritima* (halophytes). Involvement of ROS and NO in the control of K⁺/Na⁺ homeostasis. *Aims Biophysics* 3: 380-397.

Hsu SY, Kao CH (2003) Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. *Plant Growth Regulation* 39:83-90.

Iqbal N, Umar S, Khan NA (2015) Nitrogen availability regulates proline and ethylene production and alleviates salinity stress in mustard (*Brassica juncea*). *Journal of Plant Physiology* 178: 84-91.

Ismail A, Takeda S, Nick P (2014) Life and death under salt stress: same players, different timing?. *Journal of Experimental Botany* 65: 2963-2979.

Joseph B, Jini D (2010) Salinity induced programmed cell death in plants: challenges and opportunities for salt-tolerant plants. *Journal of Plant Sciences* 5: 376-390.

Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57:315-319.

Karpinski S, Gabrys H, Mateo A, Karpinska B, Mullineaux PM (2003) Light perception in plant disease defence signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 390-396.

Kato Y, Miura E, Matsushima R, Sakamoto W (2007) White leaf sectors in yellow variegated are formed by viable cells with undifferentiated plastids. *Plant Physiology* 144: 952-960.

Kausar F, Shahbaz M, Ashraf M (2013) Protective role of foliar-applied nitric oxide in *Triticum aestivum* under saline stress. *Turkish Journal of Botany* 37: 1155-1165.

Keyster M, Klein A, Ludidi N (2012) Caspase-like enzymatic activity and the ascorbate-glutathione cycle participate in salt stress tolerance of maize conferred by exogenously applied nitric oxide. *Plant Signaling & Behavior* 7: 349-360.

Khan MN, Siddiqui MH, Mohammad F, Naeem M (2012) Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. *Nitric Oxide* 27: 210-218.

Kim Y, Wang M, Bai Y, Zeng Z, Guo F, Han N, Zhu M (2014) Bcl-2 suppresses activation of VPEs by inhibiting cytosolic Ca^{2+} level with elevated K^{+} efflux in NaCl induced PCD in rice. *Plant Physiology and Biochemistry* 80: 168-175.

Koshiha T (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiology* 34:713-721.

Kuo MC, Kao CH (2003) Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biology Plantarum* 46:149-152.

Leegood RC, Lea PJ, Adcock MD, Häusler RE (1995) The regulation and control of photorespiration. *Journal of Experimental Botany* 46: 1397-1414.

Lei P, Xu Z, Liang J, Luo X, Zhang Y, Feng X, Xu H (2016) Poly (γ -glutamic acid) enhanced tolerance to salt stress by promoting proline accumulation in *Brassica napus* L. *Plant Growth Regulation* 78: 233-241.

Leitner M, Vandelle E, Gaupels F, Bellin D, Delledonne M (2009) NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 451-458.

Leshem Y, Seri L, Levine A (2007) Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *The Plant Journal* 51: 185-197.

Ma L, Zhang H, Sun L, Jiao Y, Zhang G, Miao C, Hao F (2011) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na^+/K^+ homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress. *Journal of Experimental Botany* 280.

Ma L, Zhang H, Sun L, Jiao Y, Zhang G, Miao C, Hao F (2012) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na^+/K^+ homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress. *Journal of Experimental Botany* 63: 305-317.

Magalhaes JR, Monte DC, Durzan D (2000) Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 6: 117-127.

Maksimović JD, Zhan J, Zeng F, Živanović BD, Shabala L, Zhou M, Shabala S (2013) Linking oxidative and salinity stress tolerance in barley: can root antioxidant enzyme activity be used as a measure of stress tolerance?. *Plant and Soil* 365: 141-155.

Manai J, Kalai T, Gouia H, Corpas FJ (2014) Exogenous nitric oxide (NO) ameliorates salinity-induced oxidative stress in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 14: 433-446.

Medeiros CD, Oliveira MT, Rivas R, Baldani JI, Kido EA, Santos MG (2012) Gas exchange, growth, and antioxidant activity in sugarcane under biological nitrogen fixation. *Photosynthetica* 1-10.

Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environmental* 33: 453-467.

Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.

Mittler R (2017) ROS are good. *Trends in Plant Science* 22: 11-19.

Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Van Breusegem F (2011) ROS signaling: the new wave?. *Trends in plant science* 16: 300-309.

Molassiotis A, Tanou G, Diamantidis G (2010) NO says more than ‘YES’ to salt tolerance: salt priming and systemic nitric oxide signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior* 5: 209-212.

Monetti E, Kadono T, Tran D, Azzarello E, Arbelet-Bonnin D, Biligui B, Bouteau F (2014) Deciphering early events involved in hyperosmotic stress-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells. *Journal of Experimental Botany*, ert460.

Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology 59:651-681.

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology 22:867-880.

Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Biology 49: 249-279.

Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Driscoll S, Novitskaya L, Foyer CH (2002) Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration?. Annals of Botany 89: 841-850.

Norman C, Howell KA, Millar AH, Whelan JM, Day DA (2004) Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. Plant Physiology 134: 492-501.

Nxele X, Klein A, Ndimba BK (2017) Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. South African Journal of Botany 108: 261-266.

O'Brien JA, Daudi A, Butt VS, Bolwell GP (2012) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. Planta 236: 765-779.

Oukarroum A, Bussotti F, Goltsev V e Kalaji HM (2015) Correlation between reactive oxygen species production and photochemistry of photosystems I and II in *Lemna gibba* L. plants under salt stress. Environmental and Experimental Botany 109: 80-88.

Ozgun R, Uzilday B, Sekmen AH, Turkan I (2013) Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes. Functional Plant Biology 40: 832-847.

Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety 60: 324-349.

Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'ana R, Mosquim PR, Moreira MA (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 11:137-143.

Petrov VD, Van Breusegem F (2012) Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. AoB Plants, pls014.

Petrov V, Hille J, Mueller-Roeber B, Gechev TS (2015) ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. Frontiers in Plant Science 6: 69.

Pimentel C, Sarr B, Diouf O, Abboud ACS, Macauley HR (2002) Tolerância protoplasmática foliar à seca, em dois genótipos de caupi cultivados em campo. *Revista Universo Rural* 22:07-14.

Rejeb KB, Benzarti M, Debez A, Bailly C, Savoure A, Abdelly C (2015) NADPH oxidase-dependent H₂O₂ production is required for salt-induced antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 174: 5-15.

Rizwan M, Ali S, Ibrahim M, Farid M, Adrees M, Bharwana SA, Abbas F (2015) Mechanisms of silicon-mediated alleviation of drought and salt stress in plants: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 15416-15431.

Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Sandalio LM (2013) Protein S-nitrosylation in plants under abiotic stress: an overview. *Frontiers in Plant Science* 4: 373.

Ros Barceló A (2005) Xylem parenchyma cells deliver the H₂O₂ necessary for lignification in differentiating xylem vessels. *Planta* 220:747-756.

Saha J, Brauer EK, Sengupta A, Popescu SC, Gupta K, Gupta B (2015) Polyamines as redox homeostasis regulators during salt stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 3: 21.

Salgado I, Oliveira HC, Gaspar M (2017) Plant nitric oxide signaling under environmental stresses. *Mechanism of Plant Hormone Signaling Under Stress: A Functional Genomic Frontier*.

Sehrawat A, Abat JK, Deswal R (2013) RuBisCO depletion improved proteome coverage of cold responsive S-nitrosylated targets in *Brassica juncea*. *Frontiers in plant science* 4: 342.

Shabala S (2009) Salinity and programmed cell death: unravelling mechanisms for ion specific signalling. *Journal of Experimental Botany* 60: 709-712.

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012.

Sheokand S, Bhankar V, Sawhney V (2010) Ameliorative effect of exogenous nitric oxide on oxidative metabolism in NaCl treated chickpea plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 22: 81-90.

Sheokand S, Kumari A (2015) Nitric Oxide and Abiotic Stress-Induced Oxidative Stress. Nitric Oxide Action in Abiotic Stress Responses in Plants (pp. 43-63). Springer International Publishing.

Simaei M, Khavari-Nejad RA, Saadatm S, Bernard F, Fahimi H (2011) Effects of salicylic acid and nitric oxide on antioxidant capacity and proline accumulation in *Glycine max* L. treated with NaCl salinity. African Journal of Agricultural Research 6: 3775-3782.

Sofo A, Scopa A, Nuzzaci M, Vitti A (2015) Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. International Journal of Molecular Sciences 16: 13561-13578.

Spadaro D, Yun BW, Spoel SH, Chu C, Wang YQ, Loake GJ (2010) The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. Physiologia Plantarum 138: 360-371.

Srinieng K, Saisavoey T, Karnchanatat A (2015) Effect of salinity stress on antioxidative enzyme activities in tomato cultured in vitro. Pakistan Journal of Botany 47: 1.

Taïbi K, Taïbi F, Abderrahim LA, Ennajah A, Belkhodja M, Mulet JM (2016) Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. South African Journal of Botany 105: 306-312.

Tanou G, Job C, Rajjou L, Arc E, Belghazi M, Diamantidis G, Job D (2009) Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. The Plant Journal 60: 795-804.

Tanou G, Job C, Belghazi M, Molassiotis A, Diamantidis G, Job D (2010) Proteomic signatures uncover hydrogen peroxide and nitric oxide cross-talk signaling network in citrus plants. Journal of Proteome Research 9: 5994-6006.

Tanou G, Filippou P, Belghazi M, Job D, Diamantidis G, Fotopoulos V, Molassiotis A (2012) Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. The Plant Journal 72: 585-599.

Toledo JrJC, Augusto O (2012) Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. Chemical Research in Toxicology 25: 975-989.

Uchida A, Jagendorf AT, Hibino T, Takabe T, Takabe T (2002) Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science* 163: 515-523.

Van Doorn WG (2011a) Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *Journal of Experimental Botany* 62:4749-4761.

Van Doorn WG, Beers EP, Dangl JL, Franklin-Tong VE, Gallois P, Hara-Nishimura I, Mur LAJ (2011b) Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation* 18: 1241.

Vasquez-Tello A, Zuily-Fodil Y, Pham Thi AT, Silva JBV (1990) Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. *Journal Experimental Botany* 41: 827-832.

Wang H, Liang X, Wan Q, Wang X, Bi Y (2009) Ethylene and nitric oxide are involved in maintaining ion homeostasis in *Arabidopsis* callus under salt stress. *Planta* 230: 293-307.

Wang J, Li X, Liu Y, Zhao X (2010) Salt stress induces programmed cell death in *Thellungiella halophila* suspension-cultured cells. *Journal of Plant Physiology* 167: 1145-1151.

Wang Y, Lin A, Loake GJ, Chu C (2013a) H₂O₂-induced leaf cell death and the crosstalk of reactive nitric/oxygen species. *Journal of Integrative Plant Biology* 55:202-208.

Wang Y, Loake GJ, Chu C (2013b) Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death. *Frontiers in Plant Science* 4: 314.

Wu X, Zhu W, Zhang H, Ding H, Zhang HJ (2011) Exogenous nitric oxide protects against salt-induced oxidative stress in the leaves from two genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 1199-1209.

Yang H, Mu J, Chen L, Feng J, Hu J, Li L, Zuo J (2015) S-nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses. *Plant Physiology* 167: 1604-1615.

Yousuf PY, Ahmad A, Ganie AH, Sareer O, Krishnapriya V, Aref IM, Iqbal M (2017) Antioxidant response and proteomic modulations in Indian mustard grown under salt stress. *Plant Growth Regulation* 81: 31-50.

Yun BW, Feechan A, Yin M, Saidi NB, Le Bihan T, Yu M, Pallas JA (2011) S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* 478: 264.

Zhang Y, Wang L, Liu Y, Zhang Q, Wei Q, Zhang W (2006) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast. *Planta* 224: 545-555.

Zörb C, Herbst R, Forreiter C, Schubert S (2009) Short-term effects of salt exposure on the maize chloroplast protein pattern. *Proteomics* 9: 4209-4220.

CAPÍTULO II

Óxido nítrico otimiza os mecanismos fisiológicos de plantas de *Lactuca sativa* L. expostas ao estresse salino de curta duração

RESUMO

CAMPOS, Fernanda Vidal de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2017. **Óxido nítrico otimiza os mecanismos fisiológicos de plantas de *Lactuca sativa* L. expostas ao estresse salino de curta duração**. Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Atualmente, o óxido nítrico (NO) tem sido considerado um importante agente sinalizador na mediação das respostas das plantas aos estresses ambientais. Nesse sentido, o presente estudo teve por objetivo avaliar a atuação do NO nas principais respostas fisiológicas de *Lactuca sativa*, alface, exposta ao estresse salino de curta duração. As plantas foram aclimatadas por 5 dias em solução nutritiva de Clarck ½ força iônica, pH 6,5, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob irradiância de $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo luminoso de 16 horas, sendo mantidas sob aeração constante. Decorrido esse período foram submetidas aos tratamentos: controle (apenas solução nutritiva); nitroprussiato de sódio (SNP-doador de NO) (70 μM); cloreto de sódio (NaCl) (80 mM) e NaCl + SNP (80 mM e 70 μM , respectivamente). As plantas permaneceram nos tratamentos por períodos de 6 e 24 horas para avaliação da concentração de prolina e pigmentos cloroplastídicos; por 24 horas para avaliação das trocas gasosas e conteúdo hormonal; por 3 dias para as análises de crescimento e concentração de nutrientes e, por 3 e 9 dias para o registro da sintomatologia visual. O crescimento de *L. sativa* foi significativamente afetado pelo curto período de exposição ao NaCl, o que pode estar relacionado com desequilíbrio hormonal, menor concentração de nutrientes essenciais, excesso de Na^+ tóxico e redução no desempenho fotossintético observados nas plantas nessa condição. Pela análise de sintomatologia visual foi possível observar que o NaCl afeta principalmente o crescimento foliar, o que pode indicar sinais de danos ou uma estratégia de defesa para evitar a perda de água em uma condição em que o ambiente salino gera déficit hídrico. No entanto, a presença do NO, suprido na forma de SNP, promoveu equilíbrio nutricional e hormonal, aumento na concentração do osmoprotetor prolina e incrementou a fotossíntese líquida, o que resultou na melhoria da taxa de crescimento. Diante dos resultados apresentados é

possível concluir que a breve exposição ao NaCl já é suficiente para desencadear danos sobre o desenvolvimento de plantas de alface, entretanto, o NO se mostrou um agente sinalizador importante ao otimizar as respostas fisiológicas das plantas frente ao estresse.

ABSTRACT

CAMPOS, Fernanda Vidal de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, december, 2017. Nitric oxide optimizes the physiological mechanisms of *Lactuca sativa* L. plants exposed to short-term saline stress. Adviser: Juraci Alves de Oliveira.

Currently, nitric oxide (NO) has been considered an important signaling agent in the mediation of plant responses to environmental stresses. In this sense, the present study aimed to evaluate the performance of NO in the main physiological responses of *Lactuca sativa*, lettuce, exposed to short duration saline stress. The plants were acclimated for 5 days in Clark nutrient solution $\frac{1}{2}$ ionic strength, pH 6,5, at $25 \pm 2^\circ \text{C}$, under irradiance of $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and light photoperiod of 16 hours, being maintained under constant aeration. After this period, they were submitted to the treatments: control (nutrient solution only); sodium nitroprusside (SNP-donor NO) ($70 \mu\text{M}$); sodium chloride (NaCl) (80 mM) and NaCl + SNP (80 mM and $70 \mu\text{M}$, respectively). The plants remained in the treatments for periods of 6 and 24 hours to evaluate the concentration of proline and chloroplastic pigments; for 24 hours for evaluation of gas exchange and hormonal content; for 3 days for analysis of growth and nutrient concentration, and for 3 and 9 days for visual symptomatology. The growth of *L. sativa* was significantly affected by the short period of exposure to NaCl, which may be related to hormone imbalance, lower concentration of essential nutrients, excess Na^+ toxic and reduction in the photosynthetic performance observed in the plants in this condition. By the analysis of visual symptomatology it was possible to observe that the NaCl mainly affects the leaf growth, which can indicate signs of damage or a defense strategy to avoid the loss of water in a condition in which the saline environment generates water deficit. However, the presence of NO, in the form of SNP, promoted nutritional and hormonal balance, an increase in the proline osmoprotectant concentration and increased liquid photosynthesis, which resulted in an improvement in the growth rate. In view of the results presented, it is possible to conclude that the brief exposure to NaCl is enough to trigger damage on the

development of lettuce plants, however, NO was shown to be an important signal agent when optimizing the physiological responses of plants to stress.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a agricultura mundial enfrenta muitos desafios, uma vez que precisa produzir mais alimento para suprir a demanda populacional que cresce exponencialmente. Entretanto, a produtividade das culturas não está aumentando paralelamente à procura de alimentos, devido, principalmente, aos vários estresses ambientais. Dentre esses, destaca-se a alta salinidade dos solos, que têm sido considerado um dos fatores de estresse que mais compromete o desempenho agrícola (FAO, 2009; Shanker e Venkateswarlu, 2011; Ahmad et al., 2012; Mantri et al., 2012; Hussain et al., 2014).

Um dos efeitos iniciais do estresse salino é a redução da taxa de crescimento vegetal, a qual pode ser afetada em duas fases. Inicialmente, a presença do sal reduz a capacidade de captação de água pela planta, o que provoca redução rápida na taxa de crescimento em decorrência do efeito osmótico do estresse. A segunda fase, por outro lado, é mais lenta e está relacionada ao acúmulo de íons tóxicos na planta, podendo resultar posteriormente na abscisão foliar e redução do suplemento fotossintético, o que afeta o seu rendimento (Silveira et al., 2010; Parihar et al., 2015).

Dessa forma, a salinidade pode causar declínio no crescimento e produtividade vegetal por afetar processos essenciais, especialmente a fotossíntese. A redução na taxa fotossintética em decorrência da salinidade está relacionada ao efeito osmótico e iônico desse estresse. A resposta inicial das plantas ao déficit de água, promovido pelo excesso de sal é fechar os estômatos, o que reduz a disponibilidade de CO₂ no sítio de atuação da RUBISCO e compromete sua fixação. Além disso, a salinidade promove distúrbios nutricionais devido a absorção competitiva dos íons salinos com os íons essenciais à célula. Assim, a carência de alguns nutrientes, juntamente com o excesso de Na⁺ e Cl⁻ pode ocasionar redução na concentração de pigmentos fotossintéticos e danos na estrutura dos cloroplastos e enzimas essenciais a fotossíntese (Heuer, 2005; Hu e Schmidhalter, 2005; Demetriou et al., 2007; Bhardwaj et al., 2015; Gururani et al., 2015).

Diante disso, com a finalidade de impedir danos ocasionados pela salinidade, as plantas apresentam duas estratégias de ajuste celular conhecidos como “ajustamento

iônico” e “ajustamento osmótico”. Na primeira delas, evita-se a acumulação dos sais no citoplasma celular, sequestrando-os no apoplasto ou vacúolos, o que reduz os danos às vias metabólicas. Já a segunda estratégia visa aumentar o potencial osmótico da planta para restabelecer o seu turgor celular. Dessa forma, o mecanismo mais eficiente consiste em sintetizar e acumular compostos orgânicos osmoticamente ativos ou osmoprotetores que mantêm um gradiente de potencial hídrico entre a planta e o solo, garantindo o influxo de água (Pilon-Smits et al., 1999; Hossain e Fujita 2010; Ranganayakulu et al., 2013; Filippou et al., 2014; Singh et al., 2015).

Assim, ao empregar essas estratégias para proteger sua maquinaria celular, as plantas passam por mudanças metabólicas, que garantem a manutenção do seu crescimento e produtividade em ambientes estressantes (Tuteja, 2007; Saud et al., 2014). Entretanto, para ocorrer tais mudanças é necessário mecanismos para perceber os estímulos e assim desencadear cascatas de transdução de sinais, que culminarão nas respostas ao agente estressor.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora envolvida em uma ampla gama de respostas a estímulos ambientais. Por apresentar um elétron desemparelhado, pertence a família das espécies reativas de nitrogênio (RNS) podendo interagir com outras moléculas reativas como as EROs, eliminando-as diretamente da célula. Além disso, pode interagir e modificar enzimas antioxidantes aumentando a sua atividade (Corpas et al., 2011; Arora et al., 2016; Salgado et al., 2017). Assim, sob condições de estresse salino o NO é agente sinalizador importante na regulação da homeostase redox celular.

Além de atuar como uma molécula antioxidante, o NO atua promovendo tolerância à salinidade ao garantir a homeostase iônica e osmótica da célula. Estudos evidenciam que o fornecimento exógeno de NO aumenta a relação K^+/Na^+ em plantas, o que está relacionado com o aumento da atividade de transportadores da membrana plasmática e vacuolar, envolvidos na exclusão e compartimentalização do Na^+ , respectivamente. Além disso, esse agente sinalizador pode contribuir para a manutenção do turgor celular ao regular o metabolismo da prolina, molécula envolvida na regulação osmótica, eliminação de EROs e manutenção da integridade de proteínas (Zhao et al., 2004; Zhang et al., 2006; Szabados e Savouré, 2010; Molassiotis et al., 2010; Khan et al., 2012).

Os hormônios vegetais são considerados moléculas endógenas essenciais na regulação do desenvolvimento e tolerância ou susceptibilidade das plantas aos

estresses ambientais, incluindo o estresse salino. Estudos têm demonstrado que o NO atua em muitas respostas fisiológicas a agentes estressores, que também estão sob a influência dos hormônios (Mioto et al., 2014; Ryu e Cho, 2015). Sendo relatada a sua atuação como molécula intermediária na sinalização da citocinina (Scherer e Holk, 2000; Tun et al., 2008; Liu et al., 2013), ácido abscísico (Desikan et al., 2002; Hancock et al., 2011; Daszkowska-Golec e Szarejko, 2013), auxina (Kolbert et al., 2008; Chen et al., 2010; Fernández-Marcos et al., 2011; Terrile et al., 2012) e etileno (Leshem e Pinchasov, 2000; Manjunatha et al., 2012). Embora o NO seja considerado uma importante molécula de sinalização, a suas possíveis interações com os hormônios ainda não são completamente compreendidas, pois esses agentes sinalizadores podem atuar compartilhando uma cascata sinalizatória comum ou modular o mesmo evento, por vias de sinalização paralelas, tornando-se crucial mais estudos nesta área, afim de elucidar a natureza exata dessas interações (Freschi et al., 2013).

A espécie *Lactuca sativa*, alface, é considerada o vegetal folhoso mais consumido na alimentação humana, o que torna a sua produção de grande relevância econômica. No entanto, essa planta é considerada moderadamente sensível ao estresse salino, apresentando crescimento reduzido sob condições de elevada salinidade (Lucini e Bernardo, 2015). Contudo, espera-se que na presença do NO, suprido na forma de SNP, os mecanismos fisiológicos de *L. sativa* sejam alterados de forma a proporcionar melhorias frente ao estresse, resultando na otimização do crescimento. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atuação do NO nas principais respostas fisiológicas de plantas de *L. sativa* expostas ao estresse salino de curta duração.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivo, aclimação e aplicação dos tratamentos

Plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.), cultivar crespa Vanda, de aproximadamente vinte dias de germinação, foram selecionadas quanto ao vigor e a uniformidade da parte aérea e da raiz. Após isso, foram submetidas a um período aclimatativo de 5 dias em solução nutritiva de Clark (1975) ½ força iônica e pH 6,5, sob aeração constante. As plântulas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 2 °C, irradiância de $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo luminoso de 16 horas. Após esse período foram aplicados os seguintes tratamentos: (a) controle

(apenas solução nutritiva); (b) SNP (70 μ M); (c) NaCl (80 mM); (d) SNP + NaCl (70 μ M + 80 mM, respectivamente).

As plantas permaneceram nos tratamentos por períodos de 6 e 24 horas para avaliação da concentração de prolina e pigmentos cloroplastídicos; por 24 horas para avaliação das trocas gasosas e conteúdo endógeno dos hormônios vegetais; por 3 dias para análises de crescimento, índice de tolerância, concentração de nutrientes e relação K^+/Na^+ e, por 3 e 9 dias para o registro da sintomatologia visual.

2.2. Taxa de crescimento relativo (TCR) e índice de tolerância (IT)

A taxa de crescimento relativo de *L. sativa* foi determinada após a exposição das plantas aos tratamentos por 3 dias. Tal parâmetro foi calculado utilizando-se a equação proposta por Hunt (1978): $R_w = (In_{w1} - In_{w0}) \times 1000 / (t_1 - t_0)$, em que: R_w = taxa de crescimento relativo, em termos de massa seca (MS), no período experimental ($mg\ g^{-1}\ dia^{-1}$); In_{w1} e In_{w0} = logaritmo neperiano da massa seca no final e no início do experimento, respectivamente; $t_1 - t_0$ = duração do experimento (em dias).

A tolerância de *L. sativa* ao NaCl foi estimada pelo cálculo do índice de tolerância (IT) proposto por Wilkins (1978): $IT\ (\%) = (R_w^* / R_w) \times 100$, em que R_w^* é a taxa de crescimento da planta na solução com NaCl (ou NaCl + SNP) e R_w é a taxa de crescimento da planta na solução controle.

2.3. Sintomatologia visual

O registro fotográfico dos sintomas visuais foi realizado com auxílio de câmara digital (Canon Powershot SX30IS), sendo utilizadas plantas padronizadas quanto ao tamanho (aproximadamente 16 cm), que foram expostas aos tratamentos por 3 e 9 dias.

2.4. Concentração dos nutrientes minerais e relação K^+/Na^+

Amostras de raízes e folhas de *L. sativa* submetidas aos tratamentos por 3 dias foram secas em estufa a 80 °C até a obtenção da massa seca constante. Em seguida, 0,1 g do material vegetal foi mineralizado com mistura nitro-perclórica (2:1), em um bloco digestor com temperatura controlada em torno de 100 a 120 °C até a completa oxidação do material vegetal (Marin et al., 1993). Após, foi determinada a concentração dos elementos sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) no material mineralizado utilizando espectrofotômetro de absorção atômica e de emissão em chama (Shimadzu 6701F). Após a determinação da concentração de K^+

e Na^+ (mg g^{-1} MS), foi feita a relação K^+/Na^+ .

2.5. Concentração dos pigmentos cloroplastídicos

Amostras de 0,02 g de massa fresca foram maceradas em nitrogênio líquido e submetidas à extração etanólica, em que foram adicionados 250 μL de álcool etílico 98% ao material macerado. As amostras foram incubadas por 20 minutos a 80 °C, sob agitação de 400 $\times\text{g}$. Após esse período os microtubos foram centrifugados a 14.000 $\times\text{g}$ por 10 minutos à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em um novo tubo, enquanto o precipitado resultante foi submetido a outras duas extrações conforme descrito acima, utilizando 250 μL de álcool etílico 80% e 50%. Os sobrenadantes obtidos nessas etapas foram combinados e utilizados para a análise da concentração de pigmentos cloroplastídicos, em que absorvância foi determinada a 665, 652 e 470 nm (Nunes-Nesi et al., 2007). Para cálculo da concentração de clorofila a, clorofila b e carotenoides totais foram utilizadas as equações propostas por Wellburn (1994).

2.6. Determinação dos parâmetros de trocas gasosas

Os parâmetros de trocas gasosas foram determinados em folhas de *L. sativa* completamente expandidas, iluminadas com 500 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com o auxílio de um analisador de gás no infravermelho (IRGA LCpro-SD, ADC BioScientific), no horário entre 08:00 e 10:00 horas. Foram avaliadas a fotossíntese líquida (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração interna de CO_2 (C_i).

2.7. Concentração de prolina no material vegetal

Amostras de 0,1 g de folhas e raízes foram homogeneizadas em 2 mL de ácido sulfossalicílico 3% (p/v) e centrifugados a 6300 $\times\text{g}$ por 10 minutos. Alíquotas de 75 μL do extrato foram adicionados a 375 μL de solução ácida de ninhidrina (1,25 g de ninhidrina, 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico 6 M) e a mistura foi incubada a 100 °C por 1 hora. A reação foi paralisada em banho de gelo e a absorvância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm. As absorvâncias foram comparadas à curva-padrão de prolina (0 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Bates, 1973) e os resultados expressos em $\text{nmol prolina g}^{-1} \text{MF}^{-1}$.

2.8. Conteúdo endógeno dos hormônios vegetais

A extração dos hormônios foi executada segundo método proposto por Muller e Munné-Bosch (2011) com modificações. Cerca de 200 mg de material vegetal fresco foi triturado em nitrogênio líquido e em seguida foram adicionados 600 µL de uma solução extratora (metanol 20% - Isopropanol 79% - ácido acético 1%). Cada amostra foi vortexada 4 vezes por 20 segundos e sonicadas por 10 minutos. Após serem deixadas no gelo por 30 minutos, as amostras foram sonicadas por 10 minutos e centrifugadas a 13.000 g por 10 minutos a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para novos tubos e um novo ciclo de extração foi realizado com o precipitado para maximizar a eficiência de extração. As amostras contendo os hormônios foram filtradas e armazenadas a -80°C até o momento da análise por LC/MS do tipo UHPLC QqQ. Para o monitoramento e quantificação dos hormônios aproximadamente 300 µL das amostras extraídas foram colocadas em vials e 5,0 µL dos extratos foram injetados no sistema LC/MS pertencente ao NuBioMol do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da Universidade Federal de Viçosa. Utilizou-se a coluna cromatográfica (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1.8 µm, 2.1x50 mm) com fluxo de 0,3 mL/min, acoplada online a um espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo QqQ (Agilent). O espectrômetro de massa operou alternando o modo positivo e negativo de acordo com tempo de retenção para cada hormônio e escaneou a amostra no modo MRM (multiple reaction monitoring) para detecção de cada hormônio. Os ensaios foram realizados utilizando cinco réplicas biológicas para cada tratamento. Os espectros de massas gerados foram processados utilizando o software MassHunter para obtenção dos cromatogramas extraído (XIC) de cada transição e para obtenção dos valores de área como indicativo da abundância de cada hormônio. Uma curva padrão de cada hormônio, variando concentrações de 0,1 a 300 ng/mL, foi utilizada para converter os valores de área em quantidade massas em ng/g de tecido vegetal.

2.9. Delineamento experimental e análise estatística

Todos os experimentos foram conduzidos no delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, sendo cada unidade experimental constituída de duas plantas, apresentando cinco repetições. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SISVAR desenvolvido por Ferreira (1999).

3. RESULTADOS

3.1. Taxa de crescimento relativo (TCR) e índice de tolerância (IT)

Plantas de *L. sativa* expostas à salinidade apresentaram redução significativa na taxa de crescimento relativo (TCR) quando comparadas às plantas controle, sendo essa redução de aproximadamente 36%. No entanto, quando as mesmas foram expostas ao agente estressor juntamente com o SNP, a TCR foi restaurada em aproximadamente 29%. Apesar do incremento observado nesse tratamento, a TCR manteve valores inferiores aos encontrados para plantas controle (Figura 1).

A exposição das plantas ao NaCl acrescido do SNP resultou em aumento significativo no índice de tolerância, indicando que NO está envolvido na tolerância de *L. sativa* ao estresse salino (Tabela 1).

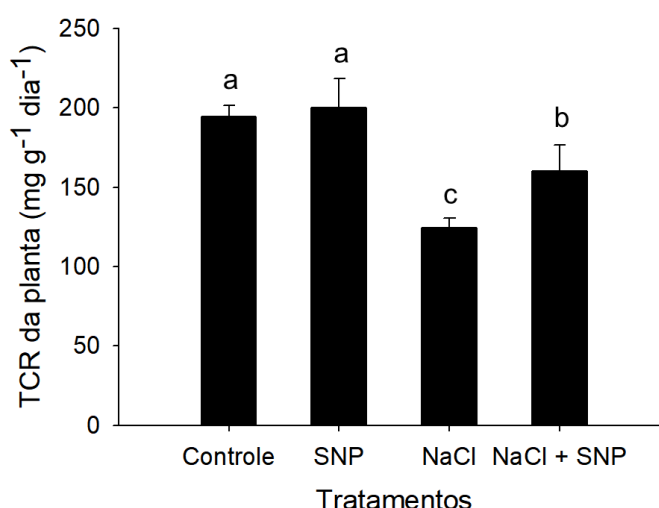


Figura 1. Taxa de crescimento relativo (TCR) de plantas de *L. sativa* expostas aos tratamentos por três dias. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 1. Índice de Tolerância em plantas de *L. sativa* expostas aos tratamentos com NaCl e NaCl acrescido do SNP por três dias.

Tratamentos	Índice de Tolerância (%)
NaCl	63,91 ± 2,97 b
NaCl + SNP	82,32 ± 8,33 a

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.2. Sintomatologia visual

Após 3 e 9 dias de exposição ao NaCl foi observada em folhas de *L. sativa* menor desenvolvimento foliar quando comparado aos demais tratamentos. Entretanto, a exposição ao NaCl junto ao doador de NO, permitiu que o desenvolvimento foliar apresentasse padrão similar ao encontrado no controle. Sinais de clorose e necrose no limbo foliar, sintomas clássicos do estresse salino, não foram observados no presente estudo (Figura 2A, 2C, 2E e 2G).

Em relação ao aspecto das raízes de *L. sativa*, a análise de sintomatologia visual não demonstrou evidências de variações entre os tratamentos analisados (Figura 2B, 2D, 2F e 2H).

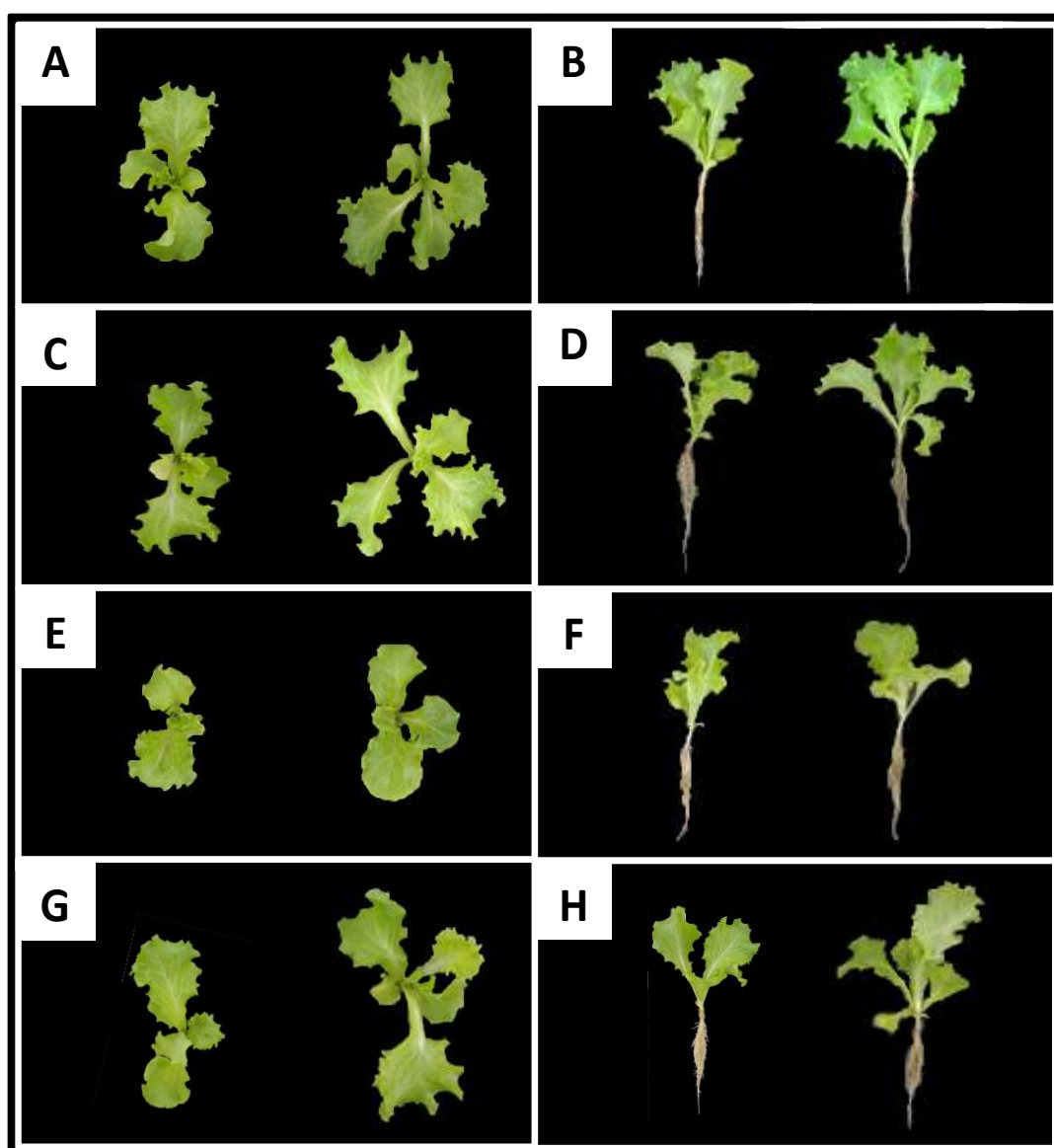


Figura 2. Sintomatologia visual das folhas e raízes de *L. sativa* expostas aos tratamentos: controle (A e B), SNP (C e D), NaCl (E e F), NaCl + SNP (G e H) por três e nove dias.

3.3. Concentração dos nutrientes minerais e relação K^+/Na^+

Em plantas de *L. sativa* submetidas aos diferentes tratamentos a concentração de cálcio (Ca^{2+}) apresentou padrão similar em folhas e raízes. Redução significativa desse nutriente foi observado quando as plantas foram expostas ao NaCl, sendo essa redução na ordem de 60% em folhas e 87% em raízes, ambos comparados aos respectivos controles. No entanto, a exposição ao NaCl acrescido do SNP resultou em incremento de aproximadamente 76% em folhas e 92% em raízes (Figura 3A).

Tal como observado para o Ca^{2+} , a concentração do nutriente potássio (K^+) reduziu significativamente em plantas expostas ao NaCl, sendo essa redução de aproximadamente 21% em folhas e 32% em raízes, comparados aos respectivos controles. Em folhas a exposição ao agente estressor junto ao SNP resultou em incremento de aproximadamente 23% em relação às folhas de plantas expostas apenas ao NaCl, enquanto, em raízes a exposição ao mesmo tratamento não resultou em variação significativa (Figura 3B).

Em folhas e raízes de plantas expostas ao NaCl, a concentração de magnésio (Mg^{2+}) não apresentou variação significativa em relação aos controles, entretanto, verificou-se que quando comparados aos tratamentos com apenas SNP, ocorreu redução significativa desse elemento na ordem de 26% em folhas e 44% em raízes. Em folhas a exposição ao NaCl acrescido do SNP resultou em incremento no concentração de Mg^{2+} de aproximadamente 34% em relação ao tratamento com apenas NaCl, enquanto em raízes não foi observado variação significativa (Figura 3C).

A concentração do elemento sódio (Na^+) aumentou acentuadamente em plantas de *L. sativa* expostas ao NaCl, sendo esse aumento de aproximadamente 15 vezes em raízes e 7 vezes em folhas. No entanto, para ambos os órgãos analisados, a exposição ao NaCl junto ao SNP fez com que os valores obtidos para o Na^+ fossem inferiores aos detectados em plantas expostas somente ao NaCl, mas superiores ao observado em plantas controle (Figura 3D).

Plantas expostas ao NaCl apresentaram redução significativa na relação K^+/Na^+ quando comparadas ao controle. Sendo esse decréscimo de aproximadamente 88% em folhas e 95% em raízes. A exposição ao NaCl acrescido do SNP não resultou em variação significativa na relação K^+/Na^+ em folhas quando comparado ao tratamento com NaCl isoladamente, no entanto, em raízes observou-se incremento em aproximadamente 6 vezes (Figura 4).

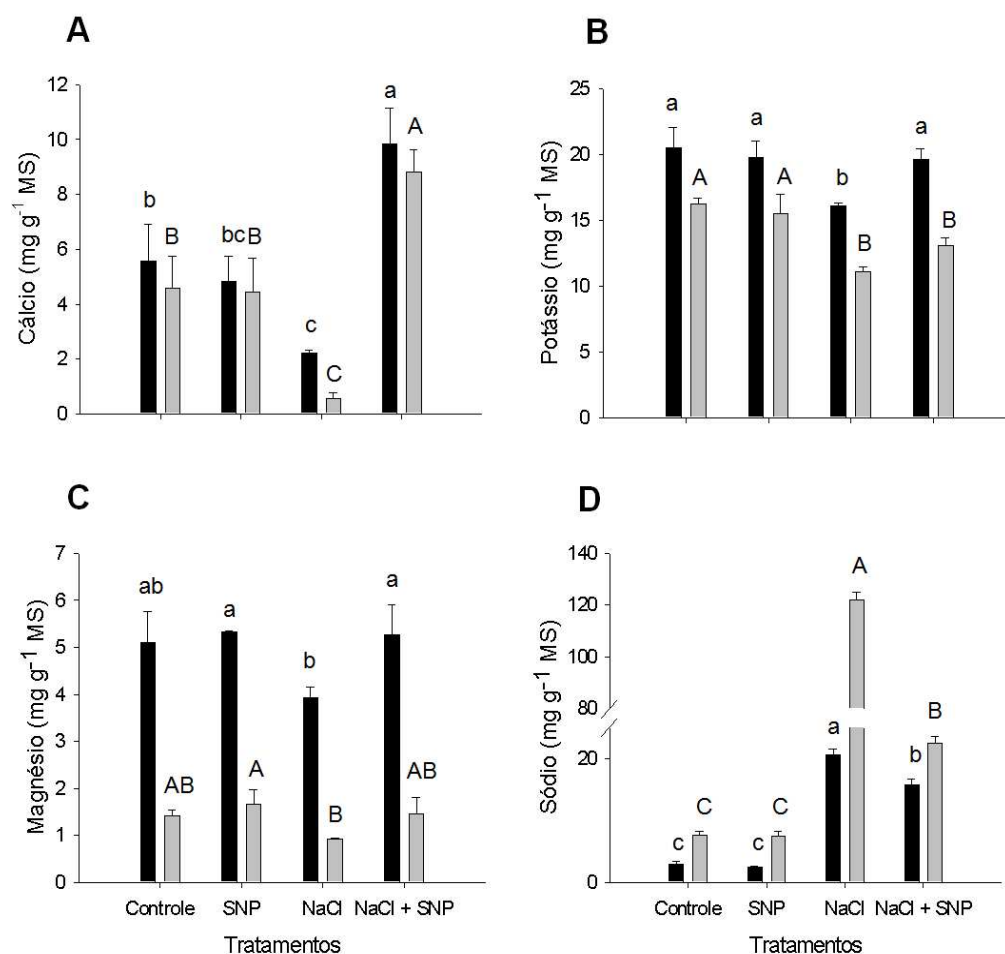


Figura 3. Concentração de nutrientes minerais em folhas (■) e raízes (▒) de *L. sativa* exposta aos tratamentos por três dias: cálcio (A), potássio (B), magnésio (C) e sódio (D). Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (folha) e maiúsculas (raízes) não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

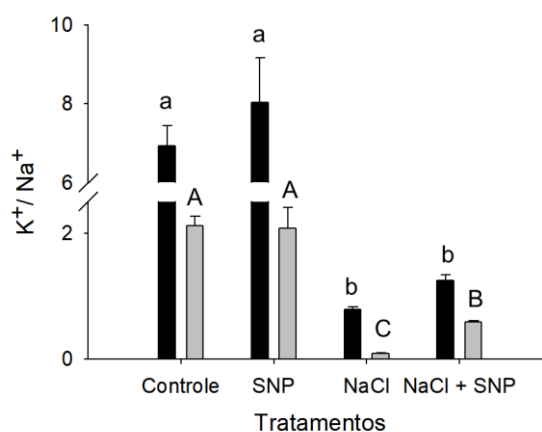


Figura 4. Relação K^+/Na^+ em folhas (■) e raízes (▒) de plantas de *L. sativa* expostas aos tratamentos por três dias. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (folha) e maiúsculas (raízes) não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.4. Concentração de prolina

A concentração de prolina apresentou valores similares em folhas de *L. sativa* expostas aos diferentes tratamentos por 6 horas (Figura 5A). Entretanto, a exposição ao tratamento com NaCl junto ao SNP por 24 horas resultou em incremento na concentração desse osmólito em aproximadamente 88% quando comparado ao controle. Já os demais tratamentos não variaram significativamente entre si (Figura 5B).

Em raízes expostas ao SNP ou NaCl, isoladamente, observou-se acréscimos semelhantes na concentração de prolina, durante os dois períodos de exposição aos tratamentos analisados. Entretanto, a adição conjunta de NaCl e SNP ampliou esse aumento, alcançando valores 71% e 169% maiores, em 6 e 24 horas de exposição, respectivamente (Figura 5A e 5B).

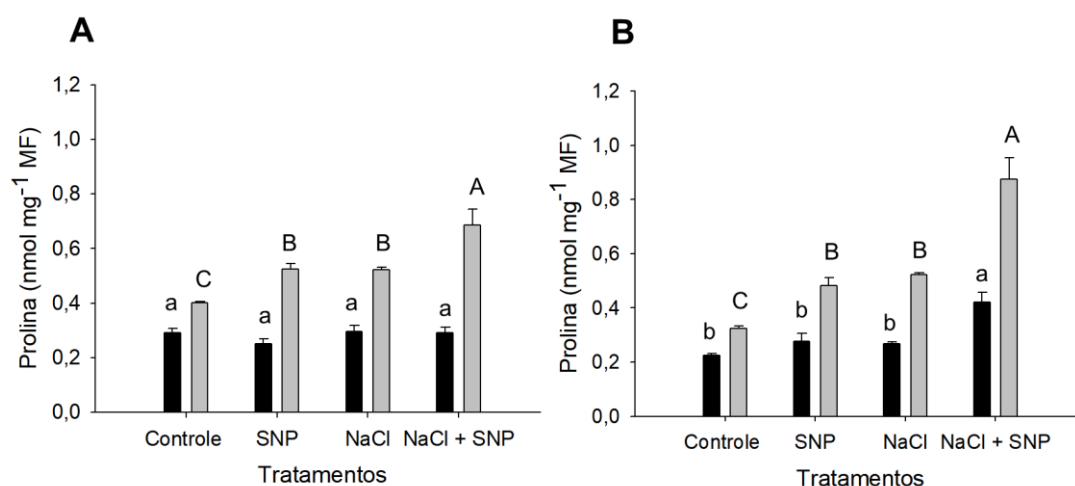


Figura 5. Concentração de prolina em folhas (■) e raízes (▒) de *L. sativa* expostas aos tratamentos por 6 (A) e 24 (B) horas. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (folha) e maiúsculas (raízes) não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.5. Concentração dos pigmentos cloroplásticos

Plantas de *L. sativa* não apresentaram variação significativa na concentração de clorofila a, clorofila b e clorofilas totais quando expostas aos diferentes tratamentos por 6 e 24 horas (Figura 6A, 6B, 6C, 6D, 6E e 6F). Entretanto, durante os dois tempos analisados, observou-se incremento na concentração de carotenoides quando as plantas foram expostas ao NaCl, sendo esse aumento de aproximadamente 41% após 6 e 24 horas de tratamento. Plantas expostas aos tratamentos controle, SNP e NaCl junto ao SNP, por 6 horas, apresentaram valores similares na concentração de

carotenoides. Entretanto, após 24 horas, foi detectado aumento na concentração desse pigmento em aproximadamente 26% em plantas expostas ao SNP e 34% quando expostas ao NaCl junto ao SNP, ambos comparados ao controle (Figura 6E e 6F).

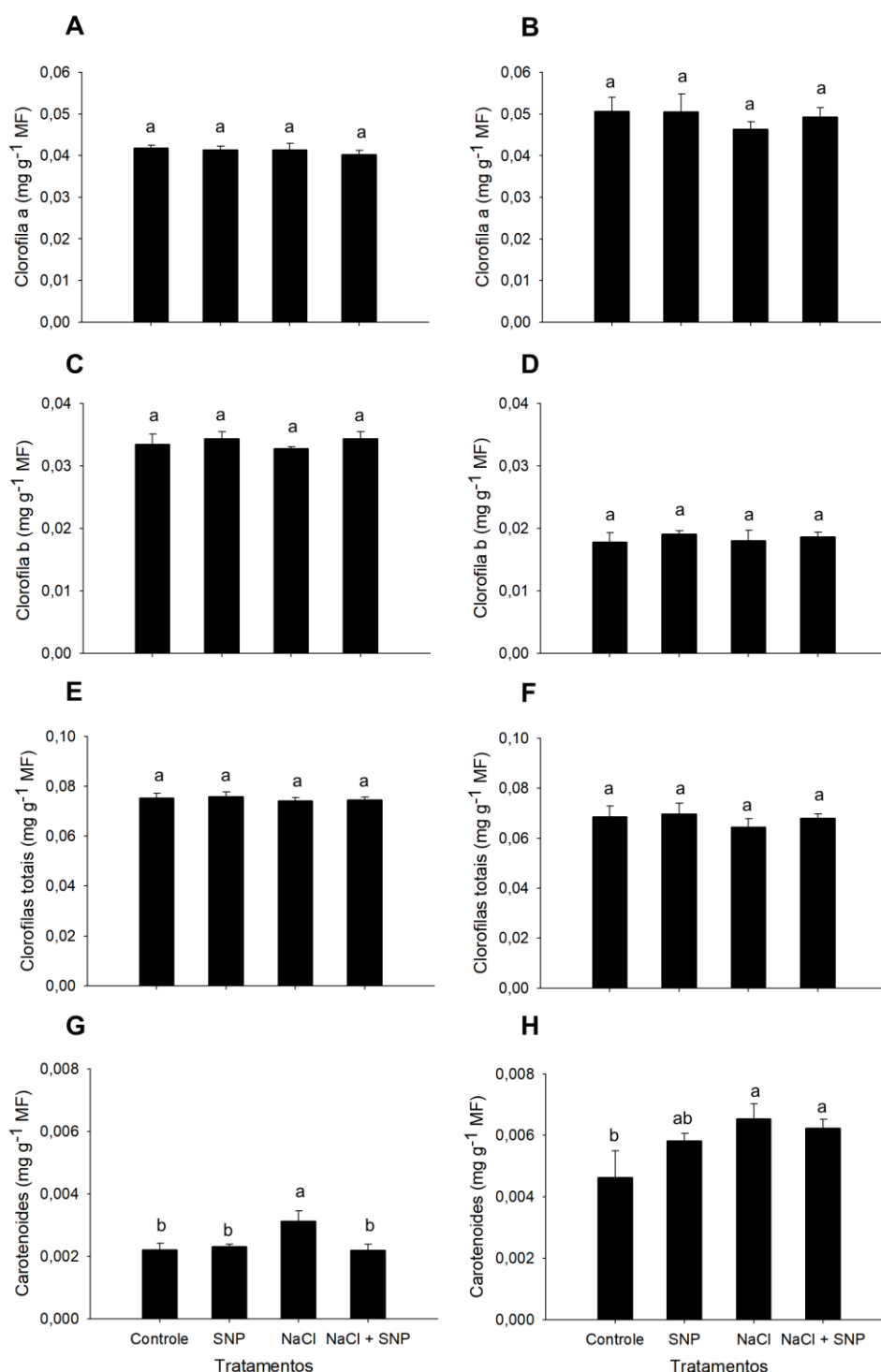


Figura 6. Concentração dos pigmentos cloroplásticos: clorofila a (A e B), clorofila b (C e D), clorofilas totais (E e F) e carotenoides (G e H) em folhas de *L. sativa* expostas aos tratamentos por 6 e 24 horas, respectivamente. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.6. Parâmetros de trocas gasosas

Plantas de *L. sativa* apresentaram redução significativa na taxa fotossintética quando expostas à salinidade, sendo essa redução na ordem de 59% quando comparado ao controle. O declínio na fotossíntese líquida (A) observado nesse tratamento foi acompanhado por redução em aproximadamente 68% na condutância estomática (g_s), 32% na concentração interna de CO_2 (C_i) e 53% na transpiração (E) (Figura 7).

A exposição ao agente estressor juntamente com o NO resultou em melhorias nos parâmetros de trocas gasosas quando comparados ao tratamento com apenas NaCl. Sendo tais melhorias verificadas pelo incremento de aproximadamente 78% na fotossíntese, 66% na g_s , 35% em C_i e 33% em E. Entretanto os valores encontrados foram inferiores aos observados em plantas controle (Figura 7).

Plantas submetidas ao tratamento com apenas SNP apresentaram para todos os parâmetros de trocas gasosas valores que não variaram significativamente aos encontrados no controle (Figura 7).

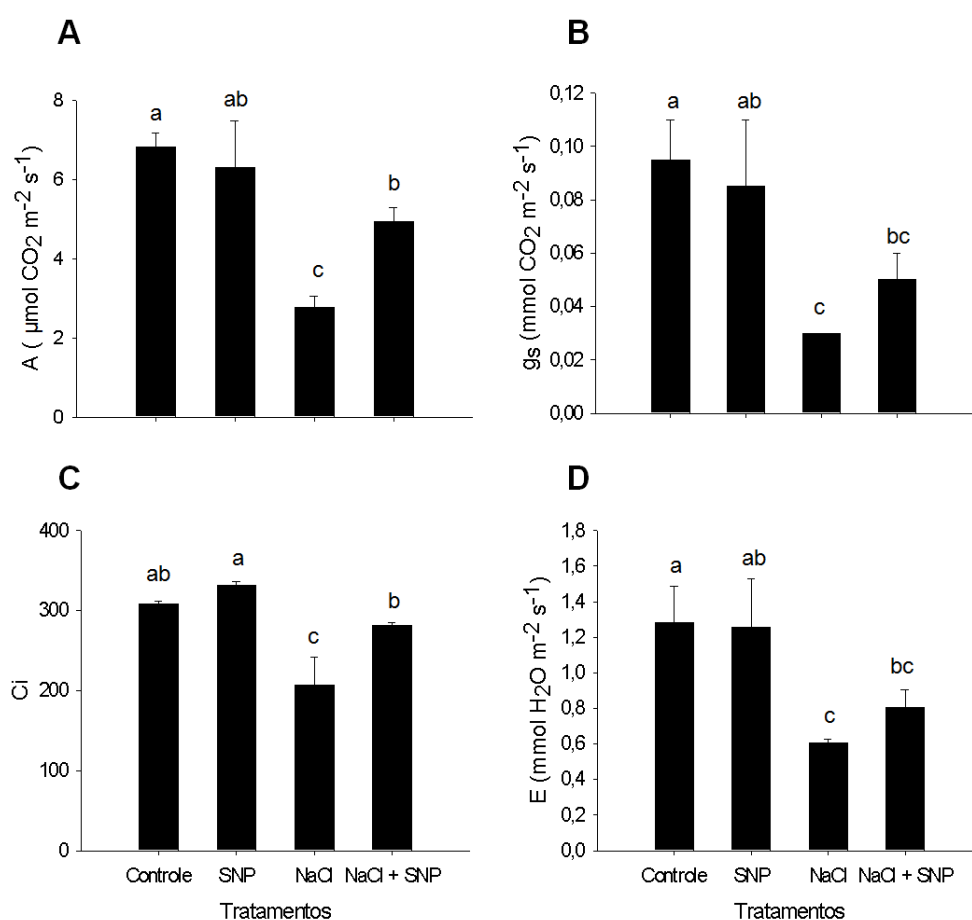


Figura 7. Parâmetros de trocas gasosas em plantas de *L. sativa* expostas aos tratamentos: fotossíntese líquida (A); condutância estomática (B); concentração interna de CO_2 (C) e transpiração (D). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.7. Conteúdo endógeno dos hormônios vegetais

Em folhas de *L. sativa* a concentração de ácido abscísico (ABA) aumentou significativamente em plantas expostas ao tratamento com NaCl, sendo esse aumento de aproximadamente 157% em relação ao controle. A exposição aos tratamentos com SNP e SNP junto ao NaCl resultou em valores similares de ABA nas folhas, sendo observado incremento de 71% em relação ao controle e um decréscimo de aproximadamente 33% quando comparado ao tratamento com apenas NaCl (Figura 8A).

A concentração do ácido indolacético (AIA) em folhas reduziu significativamente em plantas expostas à salinidade quando comparadas ao controle, sendo essa redução na ordem de 75%. A exposição ao SNP resultou em aumento de aproximadamente 47%, mas em plantas expostas ao SNP junto ao NaCl os valores observados foram similares ao controle (Figura 8B).

Em relação ao precursor do hormônio etileno, ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC), foi observado em folhas aumento significativo na sua concentração em plantas expostas ao NaCl, sendo esse aumento de aproximadamente 34%. Já a exposição ao SNP resultou em decréscimo de aproximadamente 40% na concentração de ACC quando comparado ao controle. Em contrapartida a exposição ao SNP junto ao agente estressor resultou em valores similares ao observado no controle (Figura 8C).

Em raízes de *L. sativa* os hormônios ABA, AIA e ACC apresentaram comportamento similar, em que não foi observada variação significativa em suas concentrações entre os tratamentos analisados (Figura 8A, 8B e 8C).

A zeatina, citocinina encontrada em maior abundância nos vegetais, apresentou redução significativa em folhas de plantas expostas ao NaCl, sendo essa redução de aproximadamente 76% quando comparado ao controle. No entanto, a exposição ao NaCl junto ao doador de NO, resultou em incremento de 170% em relação ao tratamento com apenas NaCl. Folhas de plantas expostas ao SNP não apresentaram variação significativa na concentração de zeatina em relação ao controle. Em raízes a exposição ao tratamento com SNP junto ao NaCl resultou em valores similares de zeatina encontrado no controle. Entretanto, em plantas expostas ao SNP e NaCl isoladamente as concentrações desse hormônio foram similares e apresentaram valores

inferiores em relação ao controle, sendo a redução de aproximadamente 25% e 35% em plantas expostas ao SNP e ao NaCl, respectivamente (Figura 8D).

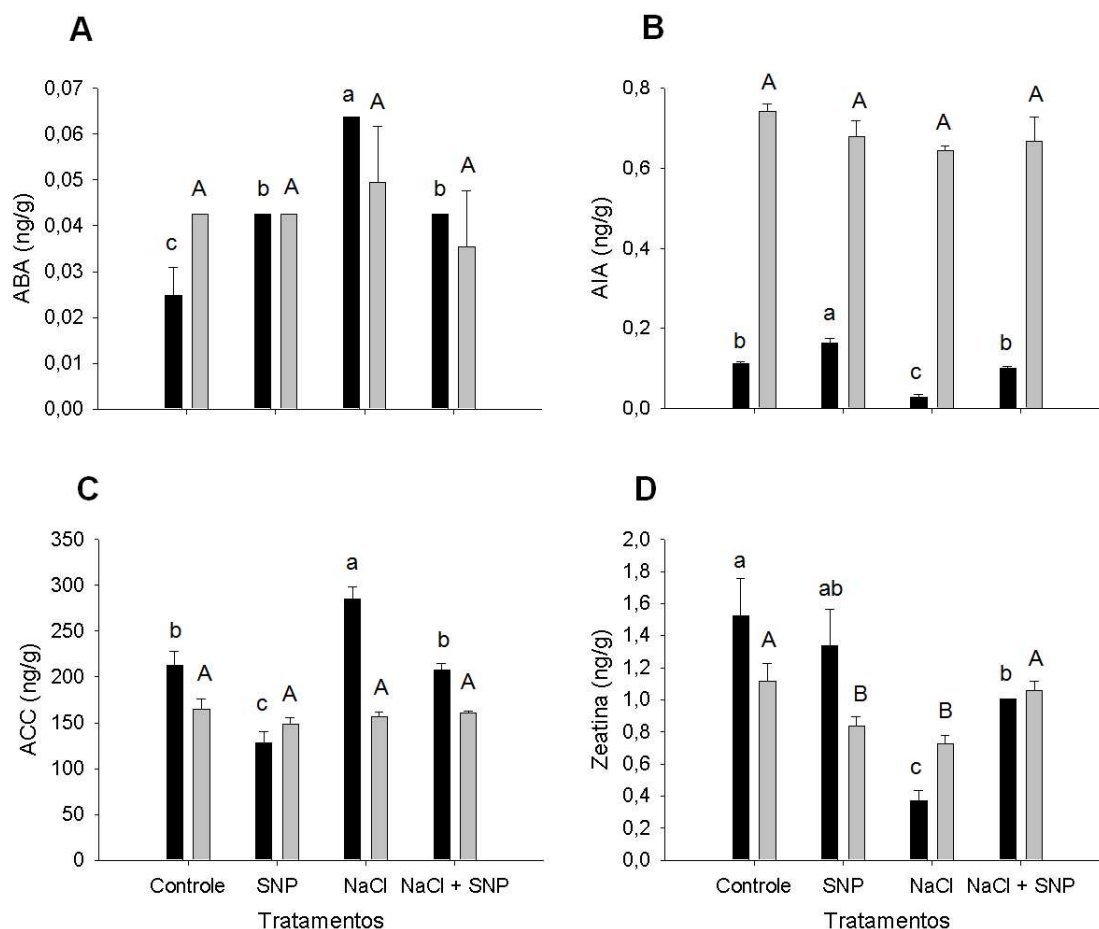


Figura 8. Detecção de hormônios em folhas (■) e raízes (▒) de *L. sativa* expostas aos tratamentos por 24 horas: ácido abscísico (ABA) (A); ácido indolacético (AIA) (B); ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC) (C) e zeatina (D). Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (folha) e maiúsculas (raízes) não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

A salinização dos solos é um problema mundial que afeta a produtividade das culturas por ocasionar alterações na fisiologia das plantas em resposta a fatores como o estresse osmótico, toxicidade iônica, desequilíbrio nutricional, hormonal e danos oxidativos (Hasanuzzaman et al., 2013; Qadir et al., 2014; Negrão et al., 2017).

Segundo Tavakkoli et al. (2011), a resposta geral das plantas expostas à salinidade é apresentar o crescimento reduzido. Tal afirmação condiz com dados encontrados no presente estudo, em que plantas de *L. sativa* apresentaram redução significativa na taxa de crescimento relativo ao serem expostas a 80 mM de sal. Tais resultados também foram observados em outras espécies, como o tomate (Latef e

Chaoxing, 2011), trigo (Kausar et al., 2013), pimenta (Abdel Latef e Chaoxing, 2014), arroz (Mostofa et al., 2015) e grão-de-bico (Ahmad et al., 2016).

A redução no crescimento das plantas pode ocorrer inicialmente devido ao efeito dos sais na região externa à zona radicular, gerando desequilíbrio osmótico que conduz a redução da disponibilidade de água para planta e perda da pressão de turgescência nas células. Assim, essa resposta inicial resulta em inibição do alongamento celular, interferindo no crescimento das raízes e folhas. Ao longo dos dias de exposição ao sal, o crescimento passa a ser afetado pelo excesso de íons tóxicos, Na^+ e Cl^- , no interior da planta, gerando a toxicidade iônica, que por sua vez está relacionada a inibição de enzimas essenciais a processos vitais, como a fotossíntese (Munns, 2005; Silveira et al., 2010; Hasanuzzaman et al., 2013; Roy et al., 2014).

Através da análise de sintomatologia visual foi possível observar que exposição ao sal interfere de forma mais evidente o crescimento foliar de alface. Tal resultado também foi encontrado em estudo anterior com alface, em que essa resposta fisiológica foi apresentada como um mecanismo de proteção da planta contra o estresse hídrico gerado pelas condições salinas (Garrido et al., 2014).

Entretanto, a aplicação do NO, suprido na forma de SNP, permitiu melhor taxa de crescimento em plantas de *L. sativa* expostas à salinidade. Segundo, Ya'Acov e Haramaty (1996) o NO atua sobre a bicamada fosfolipídica da membrana aumentando a sua fluidez e também, pode atuar relaxando a parede celular, contribuindo para o crescimento. Outros estudos demonstraram que o NO aumenta o desempenho das plantas através da sua capacidade em estimular a atividade das enzimas antioxidantes e/ou eliminar diretamente as EROs. Além disso, esse agente sinalizador pode atuar na homeostase iônica e osmótica da célula (Wu et al., 2011; Khan et al., 2012; Mostofa et al., 2015; Singh et al., 2015).

Plantas expostas ao estresse salino podem ter seu desempenho afetado por distúrbios nutricionais induzidos pela menor disponibilidade de água que conduz a redução na absorção de nutrientes e/ou pela absorção competitiva dos íons (Yadav et al., 2011; Parihar et al., 2015). Estudos já demonstraram que o Na^+ pode competir por sítios de absorção com o potássio (K^+), magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}), enquanto o Cl^- pode competir com o nitrato (NO_3^-) (Rozeff, 1995; Munns, 2002; Hu e Schmidhalter, 2005). A exposição ao sal ocasionou em plantas de *L. sativa* redução na concentração de Ca^{2+} e K^+ , que foi acompanhado pelo aumento acentuado na

concentração de Na^+ . Redução na concentração desses nutrientes também foram observados em outros estudos anteriores (Asch et al., 2000; Khan et al., 2000; Keutgen e Pawelzik, 2009; Li et al., 2010; Hussin et al., 2013).

A absorção do K^+ é mediada por canais e transportadores iônicos que se distinguem pelos níveis de seletividade e afinidade, sendo requerida a absorção desse nutriente em grandes quantidades para o crescimento da planta, uma vez que está envolvido em diversos processos fisiológicos como a fotossíntese, osmoregulação, ativação enzimática e síntese protéica. Assim, a resistência ao estresse salino está relacionada principalmente a capacidade das plantas de manter alta relação K^+/Na^+ (Ashley et al., 2005; Houmani e Corpas, 2016; Park et al., 2016). Entretanto em plantas de alface essa relação se manteve baixa, possivelmente devido a interferência do Na^+ na absorção do K^+ pelo sistema de baixa seletividade. Além disso, segundo Pyo et al. (2010), em *Arabidopsis* a atividade do AKT1, um importante canal seletivo de potássio que medeia a absorção desse nutriente sob baixas concentrações, é inibido por altas concentrações de NaCl citoplasmáticas.

O Ca^{2+} é um nutriente de grande importância para a planta ao atuar na estabilidade da membrana e sinalização intracelular (Rengel, 1992; Park et al., 2016). Sob condições de estresse salino, o Ca^{2+} é fundamental por atuar como sinalizador estimulando a via SOS, que culmina na ativação dos antiportes Na^+/H^+ na membrana plasmática e vacuolar, responsáveis pelo efluxo de Na^+ do citossol e sua compartimentalização no vacúolo, respectivamente (Zhu, 2003; Jiang et al., 2010; Barragán et al., 2012). Alguns estudos demonstram redução na concentração de Ca^{2+} sob condição de estresse salino, enquanto outros revelam aumento no nível desse nutriente (Zhu, 2001; Muchate et al., 2016). Em alface o Ca^{2+} foi o elemento que apresentou redução mais acentuada na presença do sal e paralelamente foi detectada concentrações elevadas de Na^+ nas folhas e raízes. Possivelmente esses elementos apresentaram uma absorção competitiva, que resultou em menor concentração de Ca^{2+} para ativar os antiportes envolvidos na homeostase do Na^+ , culminando na sua elevada concentração na planta.

No entanto, a presença do NO junto ao NaCl resultou em incremento nas concentrações dos nutrientes Ca^{2+} , K^+ e Mg^{2+} e redução na concentração de Na^+ nos tecidos vegetais de *L. sativa*. O NO é considerado um componente chave no controle da homeostase de Ca^{2+} no citoplasma celular. Esse agente sinalizador atua modulando diretamente a atividade dos canais de influxo de Ca^{2+} através de modificações do tipo

S-nitrosilação ou indiretamente através da regulação de mensageiros secundários envolvidos na ativação desses canais. Além disso, o NO pode atuar estimulando a mobilização de Ca^{2+} a partir das reservas intracelulares, assim esses mecanismos resultam no aumento desse íon no citoplasma celular, o que é fundamental para ativar a via SOS, envolvida na homeostase de Na^+ na célula e ativar canais sensíveis ao Ca^{2+} , como os canais de K^+ , desencadeando aumento nos níveis desse íon na planta. Além de promover aumento de Ca^{2+} citossólico, o NO exerce papel crucial na homeostase iônica ao atuar estimulando a atividade das H^+ -ATPases na membrana plasmática e H^+ -ATPase e H^+ -PPase no tonoplasto, que são cruciais na formação de uma gradiente de prótons que permite o fluxo de Na^+ para o interior do vacúolo ou para o apoplasto e aquisição de nutrientes essenciais à célula. Assim, esses mecanismos juntos permitem manter a maior relação K^+/Na^+ , que é fundamental na tolerância a salinidade (Zhao et al., 2004; Lamotte et al., 2006; Zhang et al., 2006; Besson-Bard et al., 2008; Wang et al., 2009; Molassiotis et al., 2010; Khan et al., 2012).

Além de promover quebra da homeostase iônica, a salinidade diminui a disponibilidade de água para a planta devido ao excesso de sais que reduz o potencial hídrico do solo. Assim, as mesmas conseguem reverter tal situação ao acumular solutos osmoticamente ativos ou osmoprotetores, que mantêm um gradiente de potencial hídrico entre a planta e o solo, garantindo o influxo de água e a manutenção do turgor celular (Ranganayakulu et al., 2013; Filippou et al., 2014).

As plantas podem sintetizar osmoprotetores com diferentes naturezas químicas, entretanto, o aminoácido prolina têm sido um dos mais estudados em condições de estresse salino. O papel da prolina na tolerância a salinidade, vai além da sua atuação no ajustamento osmótico da célula, estudos têm demonstrado que esta molécula pode eliminar EROs, estabilizar proteínas/enzimas e ajustar o estado redox celular sob condições de estresse. Desta forma, têm sido estabelecido uma correlação positiva entre o acúmulo de prolina e a tolerância ao estresse salino (Hare e Cress, 1997; Szabados e Savouré, 2010; Hayat et al., 2012; Liang et al., 2013; Rejeb et al., 2014).

Em plantas de *L. sativa* a exposição ao sal não resultou em variação na concentração de prolina em folhas, enquanto em raízes observou-se aumento em relação ao controle. Entretanto, nos dois órgãos analisados a exposição ao NaCl acrescido do NO resultou em aumento acentuado na concentração desse osmoprotetor. O NO aumenta a atividade da enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS)

envolvida na biossíntese de prolina e inibe a atividade da enzima prolina desidrogenase (PDH), envolvida na sua degradação (Uchida et al., 2002; Ruan et al., 2002; Fan et al., 2012).

De forma geral, os estresses abióticos prejudicam severamente a fotossíntese em plantas ao interromper o fluxo de elétrons nos fotossistemas, o sistema de geração de ATP, prejudicar a condutância estomática e a fixação de carbono e danificar pigmentos cloroplastídicos (Nouri et al., 2015).

A influência do estresse salino na concentração de clorofila (Chl) varia de acordo com a espécie analisada, de forma que estudos demonstraram aumento na concentração desse pigmento em espécies tolerantes ao sal e redução nas espécies mais sensíveis (Ashraf e Harris, 2013). Em plantas de *L. sativa* a presença do sal não resultou em variações na concentração de Chl, mas ocasionou incremento na concentração de carotenoides. Em condições de estresse salino, a alta concentração de Cl^- é considerado danosa por prejudicar a produção de Chl, desencadeando a clorose nas folhas (Tavakkoli et al., 2011). Entretanto, segundo Negrão et al. (2017), na maioria das espécies, o Na^+ acumula em concentrações tóxicas nas células antes no Cl^- , o que justifica o fato de não ter sido encontrado em alface degradação na Chl e sinais de clorose na análise de sintomatologia, uma vez que o presente estudo avaliou o estresse salino de curta duração. Resultados similares foram encontrados em plantas de feijão que reduziram intensamente seu crescimento foliar sem, entretanto, exibirem sintomas de toxicidade por Cl^- (Maia et al., 2010; Silveira et al., 2010).

Os carotenoides são pigmentos que atuam protegendo o aparato fotossintético da fotooxidação (Yang et al., 2013; Gururani et al., 2015; Ahmad et al., 2016). Neste sentido, o incremento na concentração dos carotenoides observado em plantas de *L. sativa* pode ter ocorrido como um mecanismo de proteção para minimizar os danos oxidativos induzidos pelo sal.

O impacto do estresse salino na fotossíntese pode ocorrer diretamente através do desequilíbrio osmótico e iônico, que conduzem ao fechamento estomático e toxicidade celular, respectivamente, mas também pode ocorrer devido aos estresses secundários, como o estresse oxidativo (Chaves et al., 2009; Roy et al., 2014). Em plantas de *L. sativa* observou-se redução significativa no desempenho fotossintético quando as plantas foram expostas ao NaCl, sendo essa redução acompanhada pela menor condutância estomática (g_s) e concentração interna de CO_2 (C_i). Tais resultados corroboram com dados encontrados em estudo anterior com alface (Neocleous et al.,

2014) e também outras espécies: trigo (Kanwal et al., 2011); arroz (Habib et al., 2013); berinjela (Shaheen et al., 2013); algodão (Liu et al., 2014).

Atualmente é bem compreendido que a regulação estomática é afetada negativamente na maioria das plantas submetidas ao estresse salino (Akram & Ashraf 2011). O fechamento parcial dos estômatos é uma resposta adaptativa inicial das plantas para evitar a perda excessiva de água por transpiração em decorrência do déficit hídrico gerado pelo efeito osmótico da salinidade. Tal mecanismo é induzido pelo hormônio ácido abscísico (ABA), que inicia uma cascata de transdução de sinais envolvendo o NO, que culminará na regulação das células guarda e na menor disponibilidade de CO₂ para ser fixado no Ciclo de Calvin (Desikan et al., 2004; Freschi, 2013; Fahad et al., 2015).

No presente estudo, plantas de *L. sativa* expostas ao NaCl acrescido do SNP apresentaram incremento na C_i e fotossíntese líquida superior ao encontrado em plantas expostas somente ao NaCl. Segundo Wang et al. (2015), o NO pode atuar regulando negativamente a sinalização mediada pelo ABA ao promover a S-nitrosilação e inativar a cinase OST1, fundamental no encerramento estomático. Tal resposta pode ser considerada uma estratégia de tolerância ao estresse ao permitir o fornecimento de CO₂ para realização da fotossíntese, a fim de manter o crescimento sob condições de estresse.

Além disso, o NO pode ter aumentado o desempenho fotossintético em plantas de alface ao otimizar a absorção de nutrientes essenciais, como o K⁺, fundamental na ativação da enzima RUBISCO, atuar sobre os pigmentos cloroplastídicos evitando a degradação da clorofila e promover aumento na atividade das enzimas antioxidantes, reduzindo a peroxidação lipídica nos cloroplastos. (Procházková et al., 2013; Fatma et al., 2016; Misra et al., 2017). Segundo Farnese et al. (2017), o NO também pode contribuir para a manutenção da integridade do fotossistema II (PSII) ao aumentar o quenching não fotoquímico (NPQ), que é um indicador de dissipação térmica da antena do PSII, sendo um mecanismo de grande relevância em condições de estresse.

Apesar do estresse salino envolver vários componentes, os hormônios, por estarem envolvidos diretamente com o crescimento e desenvolvimento das plantas, são considerados cruciais na modulação das respostas fisiológicas que promovem a tolerância ao estresse. Dados da literatura têm demonstrado que até certo grau todos os hormônios atuam de forma integrada com o NO na mediação dessas respostas. Através de modificações pós-traducionais do tipo S-nitrosilação, o NO pode modificar

componentes envolvidos na percepção, biossíntese, catabolismo, conjugação e transporte dos hormônios vegetais (Freschi, 2013; Fahad et al., 2015).

No presente estudo observou-se aumento na concentração de ácido abscísico (ABA) em plantas de *L. sativa* expostas à salinidade. O incremento na concentração desse hormônio acompanhada por mudanças na expressão gênica e mudanças fisiológicas adaptativas são respostas comuns em condições de estresse salino. O ABA pode atuar sobre os componentes iônico e osmótico do estresse, uma vez que já foi relatado estar envolvido na regulação da expressão do transportador NHX1 e das proteínas H⁺-ATPases, que atuam na compartimentação de Na⁺ no vacúolo e apresenta papel fundamental no controle estomático (Wang et al., 2001; Fukuda e Tanaka, 2006; Javid et al., 2011; Fahad et al., 2015). Sob condições de estresse salino o ABA limita a transpiração ao controlar as células-guarda através de vias sinalizatórias envolvendo aumento na concentração de NO, Ca²⁺ e H₂O₂, ativação de canais de ânions na membrana e inibição do influxo de K⁺, culminando na perda de turgor e fechamento estomático (Wilkinson e Davies, 2010; Freschi, 2013). Em plantas de *L. sativa* expostas à salinidade, o aumento na concentração de ABA foi acompanhado por menor condutância estomática, transpiração e concentração interna de CO₂, culminando na redução da fotossíntese líquida.

O papel do NO na sinalização do ABA durante o encerramento estomático é bem documentada, sendo que esse sinalizador atua liberando Ca²⁺ a partir de compartimentos intracelulares e consequentemente promove a desativação de canais de influxo de K⁺ e ativa canais de ânions (Garcia-Mata et al., 2003). Entretanto, em folhas de *L. sativa* expostas ao doador de NO acrescido do NaCl a concentração de ABA observada foi inferior ao encontrado em plantas expostas somente ao NaCl. Uma vez que o NO atuou estimulando a produção de prolina em *L. sativa*, essas plantas podem ter mantido um potencial hídrico favorável a absorção de água e restabelecimento do turgor celular. Assim, nessas condições baixas concentrações de ABA tornam-se favorável ao permitir que as plantas mantenham maior abertura estomática e consequentemente tenham incremento na concentração de carbono. Entretanto, os mecanismos pelo qual o NO atua sobre a concentração endógena de ABA ainda são pouco relatados. Segundo Liu et al. (2009), em plantas de *Arabidopsis* expostas ao NO foram observados aumento na transcrição e concentração da proteína ABA 8-hidroxilase CYP707A2, enzima chave envolvida no catabolismo do ABA.

Em relação ao hormônio auxina (AIA), existem poucas informações a respeito da concentração de AIA em plantas sob estresse salino e o seu papel em mitigar danos nessas condições (Javid et al., 2011). Em folhas de *L. sativa* expostas ao NaCl observou-se redução no conteúdo endógeno desse hormônio, sendo essa resposta também observada em plantas de arroz (Nilsen e Orcutt, 1996) e milho (Fahad e Bano, 2012) expostas à salinidade. O decréscimo na concentração de AIA está relacionado com a redução no crescimento das plantas, o que pode tornar-se um mecanismo de tolerância, no sentido de armazenar recursos energéticos para superar o período de estresse (Fahad et al., 2015).

No entanto, em folhas de plantas expostas ao NaCl acrescido do SNP a concentração de AIA manteve valores similares ao observado no controle. Atualmente, a maioria dos estudos sobre a interação AIA e NO estão concentrados na respostas das raízes, havendo poucas informações sobre a parte aérea (Freschi, 2013; Simontacchi et al., 2013). Segundo Fahad et al. (2015), o NO pode modular o níveis de AIA, controlando sua degradação. Plantas tratadas com NO e expostas ao cádmio apresentaram aumento na concentração de AIA através da redução na sua degradação via oxidases do AIA, melhorando a tolerância ao estresse (Xu et al., 2010).

O etileno é um hormônio gasoso, conhecido como “hormônio de estresse”, pois sua biossíntese é induzida por uma grande diversidade de estresses ambientais. Entretanto, em relação ao estresse salino o seu papel é questionado, pois estudos recentes indicam que o etileno interage em cascatas sinalizatórias de outros hormônios para aumentar a tolerância ao estresse (Wang et al., 2011; Nawaz et al., 2017). Folhas de *L. sativa* expostas à salinidade apresentaram aumento significativo na concentração de ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC), precursor do etileno, em contrapartida ao serem expostas ao agente estressor acrescido do SNP, a concentração de ACC apresentou redução. Segundo Manjunatha et al. (2010), o NO atua reduzindo a emissão de etileno através da regulação das enzimas envolvidas na sua biossíntese. De forma que, ao promover a S-nitrosilação da enzima ACC sintase, regula negativamente a sua atuação e o acúmulo de ACC na planta. Além disso, já foi demonstrado que o NO pode afetar negativamente a produção de ACC ao interferir na atividade de enzimas envolvidas na síntese do S-adenosilmetionina (SAM), principal molécula precursora do ACC (Lindermayr et al., 2006).

No presente estudo, a concentração de zeatina, uma citocinina, apresentou decréscimo em raízes e folhas de *L. sativa* exposta ao NaCl. Estudos têm demonstrado

que a redução no conteúdo endógeno desse hormônio e o seu menor transporte para a parte aérea é uma resposta inicial ao estresse salino. Tal resposta é importante para a expressão de genes na parte aérea essenciais na mitigação de danos, tais como genes que codificam fatores de transcrição e sensores de Ca^{2+} . Entretanto, os mecanismos pelos quais as citocininas são reduzidas sob condições salinas ainda são desconhecidos (Hare et al., 1997; Fahad et al., 2015).

Nos últimos anos, muitos estudos têm demonstrado interação complexa entre as citocininas e o NO, podendo ser essas interações sinérgicas ou antagônicas de acordo com o contexto fisiológico e espécie vegetal analisada. Em plantas de alface expostas ao NaCl acrescido do SNP, a concentração de zeatina apresentou incremento. As citocininas são conhecidos por aliviar os efeitos adversos da salinidade no crescimento das plantas, pois podem atuar como eliminador direto de radicais livres, regular positivamente a fotossíntese ao interferir na permeabilidade da membrana a alguns íons, estimulando a abertura estomática e, também está envolvida no acúmulo de prolina (Chakrabarti e Mukherji, 2003; Hadiarto e Tran, 2011; Wu et al., 2014; Fahad et al., 2014).

De forma geral, no presente estudo o NO restabeleceu a concentração dos hormônios para valores mais próximos aos observados em plantas controle. Tal resposta pode ser crucial na tolerância à salinidade, uma vez que, o desequilíbrio hormonal é considerada uma das principais causas de redução na produtividade vegetal em condições de estresse (Iqbal et al., 2012).

Assim, diante dos resultados encontrados é possível concluir que durante o início do estresse salino a atuação do NO como agente sinalizador de mitigação dos danos já é relatada, sendo seus efeitos benéficos evidenciados pela melhoria no crescimento, concentração de prolina, desempenho fotossintético, equilíbrio nutricional e hormonal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad P, John R, Sarwat M, Umar S (2012) Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. International Journal of Plant Production 2: 353-366.

Ahmad P, Abdel Latef AA, Hashem A, Abd Allah EF, Gucel S, Tran LSP (2016) Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea. Frontiers in Plant Science 7: 347.

Akram MS, Ashraf M (2011) Exogenous application of potassium dihydrogen phosphate can alleviate the adverse effects of salt stress on sunflower. *Journal of Plant Nutrition* 34: 1041-1057.

Arora D, Jain P, Singh N, Kaur H, Bhatla SC (2016). Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants. *Free Radical Research* 50: 291-303.

Asch F, Dingkuhn M, Dörffling K, Miezan K (2000) Leaf K/Na ratio predicts salinity induced yield loss in irrigated rice. *Euphytica* 113: 109.

Ashley MK, Grant M, Grabov A (2005) Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *Journal of Experimental Botany* 57: 425-436.

Ashraf M, Harris PJC (2013) Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica* 51: 163-190.

Barragán V, Leidi EO, Andrés Z, Rubio L, De Luca A, Fernández JA, Pardo JM (2012). Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24: 1127-1142.

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.

Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 59: 21-39.

Bhardwaj R, Kaur R, Bali S, Kau P, Sirhindi GK, Thukral AP, Vig A (2015) Role of various hormones in photosynthetic responses of green plants under environmental stresses. *Current Protein and Peptide Science* 16: 435-449.

Chakrabarti N, Mukherji S (2003) Alleviation of NaCl stress by pretreatment with phytohormones in *Vigna radiata*. *Biologia Plantarum* 46: 589-594.

Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103: 551-560.

Chen WW, Yang JL, Qin C, Jin CW, Mo JH, Ye T, Zheng SJ (2010) Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 154: 810-819.

Clark RB (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23: 458-460.

Corpas FJ, Leterrier M, Valderrama R, Airaki M, Chaki M, Palma JM, Barroso JB (2011) Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science* 181: 604-611.

Daszkowska-Golec A, Szarejko I (2013) Open or close the gate—stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Frontiers in Plant Science* 4: 138.

Demetriou G, Neonaki C, Navakoudis E, Kotzabasis K (2007) Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus- the protective role of polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1767: 272-280.

Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 16314-16318.

Desikan R, Cheung MK, Bright J, Henson D, Hancock JT, Neill SJ (2004) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of Experimental Botany* 55: 205-212.

Fahad S, Bano A (2012) Effect of salicylic acid on physiological and biochemical characterization of maize grown in saline area. *Pakistan Journal of Botany* 44: 1433-1438.

Fahad S, Hussain S, Bano A, Saud S, Hassan S, Shan D, Tabassum MA (2015) Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 4907-4921.

Fahad S, Hussain S, Matloob A, Khan FA, Khaliq A, Saud S, Faiq M (2015) Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation* 75: 391-404.

Fan HF, Du CX, Guo SR (2012) Effect of nitric oxide on proline metabolism in cucumber seedlings under salinity stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 137: 127-133.

Fancy NN, Bahlmann AK, Loake GJ (2017) Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* 40: 462-472.

FAO (2009) Fishstat Plus (v. 2.32) issued 02.03.2009. FAO, Rome.

Farnese FS, Oliveira JA, Paiva EA, Menezes-Silva PE, da Silva AA, Campos FV, Ribeiro C (2017) The involvement of nitric oxide in integration of plant physiological and ultrastructural adjustments in response to arsenic. *Frontiers in Plant Science* 8.

Fatma M, Masood A, Per TS, Khan NA (2016) Nitric oxide alleviates salt stress inhibited photosynthetic performance by interacting with sulfur assimilation in mustard. *Frontiers in Plant Science* 7.

Fernández-Marcos M, Sanz L, Lewis DR, Muday GK, Lorenzo O (2011) Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 18506-18511.

Ferreira DF (1999) SISVAR - Sistema de análises estatísticas. Lavras-UFLA.

Filippou P, Bouchagier P, Skotti E, Fotopoulos V (2014) Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. *Environmental and Experimental Botany* 97: 1-10.

Freschi L (2013) Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 4.

Fukuda A, Tanaka Y (2006) Effects of ABA, auxin, and gibberellin on the expression of genes for vacuolar H⁺-inorganic pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiporter in barley. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 351-358.

Garcia-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L, Blatt MR (2003) Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 11116-11121.

García MJ, Suárez V, Romera FJ, Alcántara E, Pérez-Vicente R (2011) A new model involving ethylene, nitric oxide and Fe to explain the regulation of Fe-acquisition genes in Strategy I plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 537-544.

Garrido Y, Tudela JA, Marín A, Mestre T, Martínez V, Gil MI (2014) Physiological, phytochemical and structural changes of multi-leaf lettuce caused by salt stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 1592-1599.

Gururani MA, Venkatesh J, Tran LSP (2015) Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Molecular Plant* 8: 1304-1320.

Habib NOMAN, Ashraf MUHAMMAD, Shahbaz M (2013). Effect of exogenously applied nitric oxide on some key physiological attributes of rice (*Oryza sativa* L.) plants under salt stress. *Pakistan Journal of Botany* 45: 1563-1569.

Hadiarto T, Tran LSP (2011) Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Reports* 30: 297-310.

Hancock JT, Neill SJ, Wilson ID (2011) Nitric oxide and ABA in the control of plant function. *Plant Science* 181: 555-559.

Hare P, Cress W (1997) Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21: 79-102.

Hare PD, Cress WA, Van Staden J (1997) The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. *Plant Growth Regulation* 23: 79-103.

Hasanuzzaman M, Nahar K, Fujita M (2013) Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. *Ecophysiology and Responses of Plants Under Salt Stress* 25-87. Springer New York.

Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A (2012) Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling & Behavior* 7: 1456-1466.

Heuer B (2005) Photosynthetic carbon metabolism of crops under salt stress. *Handbook of Photosynthesis*, Second Edition. CRC Press.

Hossain MA, Fujita M (2010) Evidence for a role of exogenous glycinebetaine and proline in antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in mung bean seedlings under salt stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 16: 19-29.

Houmani H, Corpas FJ (2016) Differential responses to salt-induced oxidative stress in three phylogenetically related plant species: *Arabidopsis thaliana* (glycophyte), *Thellungiella salsuginea* and *Cakile maritima* (halophytes). Involvement of ROS and NO in the control of K^+/Na^+ homeostasis. *Aims Biophysics* 3: 380-397.

Hu Y, Schmidhalter U (2005) Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168: 541-549.

Hunt R (1978) Demography versus plant growth analysis. *New Phytologist* 80: 269-272.

Hussain I, Ashraf MA, Anwar F, Rasheed R, Niaz M, Wahid A (2014) Biochemical characterization of maize (*Zea mays* L.) for salt tolerance. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 148: 1016-1026.

Hussin S, Geissler N, Koyro HW (2013) Effect of NaCl salinity on *Atriplex nummularia* (L.) with special emphasis on carbon and nitrogen metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 1025-1038.

Iqbal N, Masood A, Khan NA (2012) Phytohormones in salinity tolerance: ethylene and gibberellins cross talk. *Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Springer Berlin Heidelberg 77-98.

Javid MG, Sorooshzadeh A, Moradi F, Modarres Sanavy SAM, Allahdadi I (2011) The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. *Australian Journal of Crop Science* 5: 726.

Jiang X, Leidi EO, Pardo JM (2010) How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance?. *Plant Signaling & Behavior* 5: 792-795.

- Kanwal H, Ashraf M, Shahbaz M (2011) Assessment of salt tolerance of some newly developed and candidate wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars using gas exchange and chlorophyll fluorescence attributes. *Pakistan Journal of Botany* 43: 2693-2699.
- Keutgen AJ, Pawelzik E (2009) Impacts of NaCl stress on plant growth and mineral nutrient assimilation in two cultivars of strawberry. *Environmental and Experimental Botany* 65: 170-176.
- Khan MA, Ungar IA, Showalter AM (2000) The effect of salinity on the growth, water status, and ion content of a leaf succulent perennial halophyte, *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk. *Journal of Arid Environments* 45: 73-84.
- Khan MN, Siddiqui MH, Mohammad F, Naeem M (2012) Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. *Nitric Oxide* 27: 210-218.
- Kolbert Z, Bartha B, Erdei L (2008) Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *Journal of Plant Physiology* 165: 967-975.
- Lamotte O, Courtois C, Dobrowolska G, Besson A, Pugin A, Wendehenne D (2006) Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radical Biology and Medicine* 40(8): 1369-1376.
- Latef AAHA, Chaoxing H (2011) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae* 127: 228-233.
- Latef AAHA, Chaoxing H (2014) Does inoculation with *Glomus mosseae* improve salt tolerance in pepper plants?. *Journal of Plant Growth Regulation* 33: 644-653.
- Leshem YY, Pinchasov Y (2000) Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Dutch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *Journal of Experimental Botany* 51: 1471-1473.
- Li R, Shi F, Fukuda K, Yang Y (2010) Effects of salt and alkali stresses on germination, growth, photosynthesis and ion accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Soil Science & Plant Nutrition* 56: 725-733.
- Liang X, Zhang L, Natarajan SK, Becker DF (2013) Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & Redox Signaling* 19: 998-1011.
- Lindermayr C, Saalbach G, Bahnweg G, Durner J (2006) Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *Journal of Biological Chemistry* 281: 4285-4291.

Liu Y, Shi L, Ye N, Liu R, Jia W, Zhang J (2009) Nitric oxide- induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 183: 1030-1042.

Liu WZ, Kong DD, Gu XX, Gao HB, Wang JZ, Xia M, Hu Y (2013) Cytokinins can act as suppressors of nitric oxide in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 1548-1553.

Liu S, Dong Y, Xu L, Kong J (2014) Effects of foliar applications of nitric oxide and salicylic acid on salt-induced changes in photosynthesis and antioxidative metabolism of cotton seedlings. *Plant Growth Regulation* 73: 67-78.

Lucini L, Bernardo L (2015) Comparison of proteome response to saline and zinc stress in lettuce. *Frontiers in Plant Science* 6.

Maia JM, De Macedo CC, Voigt EL, Freitas JBS, Silveira JAG (2010) Antioxidative enzymatic protection in leaves of two contrasting cowpea cultivars under salinity. *Biologia Plantarum* 54: 159-163.

Manjunatha G, Lokesh V, Neelwarne B (2010) Nitric oxide in fruit ripening: trends and opportunities. *Biotechnology Advances* 28: 489-499.

Manjunatha G, Gupta KJ, Lokesh V, Mur LA, Neelwarne B (2012) Nitric oxide counters ethylene effects on ripening fruits. *Plant Signaling & Behavior* 7: 476-483.

Mantri N, Patade V, Penna S, Ford R, Pang E (2012) Abiotic stress responses in plants: present and future. *Abiotic Stress Responses in Plants*. Springer New York 1-19.

Marin AR, Pezeshki SR, Masscheleyn PH, Choi HS (1993) Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic and photosynthesis in rice plants. *Journal Plant Nutrition* 16:865-880.

Miot PT, Freschi L, Mercier H (2014) Phytohormones and Nitric Oxide Interactions During Abiotic Stress Responses. In *Nitric Oxide in Plants: Metabolism and Role in Stress Physiology*. Springer International Publishing 211-224.

Misra AN, Singh R, Misra M, Vladkova R, Dobrikova AG, Apostolova EL (2017) Nitric Oxide Mediated Effects on Chloroplasts. In *Photosynthesis: Structures, Mechanisms, and Applications*. Springer International Publishing 305-320.

Molassiotis A, Tanou G, Diamantidis G (2010) NO says more than ‘YES’ to salt tolerance: salt priming and systemic nitric oxide signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior* 5: 209-212.

Mostofa MG, Hossain MA, Fujita M (2015) Trehalose pretreatment induces salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings: oxidative damage and co-induction of antioxidant defense and glyoxalase systems. *Protoplasma* 252: 461-475.

Muchate NS, Nikalje GC, Rajurkar NS, Suprasanna P, Nikam TD (2016) Plant Salt Stress: Adaptive Responses, Tolerance Mechanism and Bioengineering for Salt Tolerance. *The Botanical Review* 82: 371-406.

Müller M, Munné-Bosch S (2011) Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* 7: 37.

Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment* 25: 239-250.

Munns R (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167: 645-663.

Nawaz F, Shabbir RN, Shahbaz M, Majeed S, Raheel M, Hassan W, Sohail MA (2017) Cross Talk between Nitric Oxide and Phytohormones Regulate Plant Development during Abiotic Stresses. In *Phytohormones-Signaling Mechanisms and Crosstalk in Plant Development and Stress Responses*. InTech.

Negrão S, Schmöckel SM, Tester M (2017) Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany* 119: 1-11.

Neocleous D, Koukounaras A, Siomos AS, Vasilakakis M (2014) Changes in photosynthesis, yield, and quality of baby lettuce under salinity stress. *Journal of Agricultural Science and Technology* 16: 1335-1343.

Nilsen ETO, David M (1996) The physiology of plants under stress: abiotic factors/Erik T. Nilsen, David M. Orcutt.

Nouri MZ, Moumeni A, Komatsu S (2015) Abiotic stresses: insight into gene regulation and protein expression in photosynthetic pathways of plants. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 20392-20416.

Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007) Deficiency of Mitochondrial Fumarate Activity in Tomato Plants Impairs Photosynthesis Via an Effect on Stomatal Function. *Plant Journal* 50: 1093- 1106.

Parihar P, Singh S, Singh R, Singh VP, Prasad SM (2015) Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 4056-4075.

Park HJ, Kim WY, Yun DJ (2016) A new insight of salt stress signaling in plant. *Molecules and Cells* 39: 447.

Pilon-Smits EA, Terry N, Sears T, Van Dun K (1999) Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiology and Biochemistry* 37: 313-317.

- Procházková D, Haisel D, Wilhelmová N, Pavlíková D, Száková J (2013) Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis. *Photosynthetica* 51: 483-489.
- Pyo YJ, Gierth M, Schroeder JI, Cho MH (2010) High-affinity K⁺ transport in Arabidopsis: AtHAK5 and AKT1 are vital for seedling establishment and postgermination growth under low-potassium conditions. *Plant Physiology* 153: 863-875.
- Qadir M, Ghafoor A, Murtaza G (2000) Amelioration strategies for saline soils: a review. *Land Degradation & Development* 11: 501-521.
- Ranganayakulu GS, Veeranagamallaiah G, Sudhakar C (2013) Effect of salt stress on osmolyte accumulation in two groundnut cultivars (*Arachis hypogaea* L.) with contrasting salt tolerance. *African Journal of Plant Science* 7: 586-592.
- Rejeb KB, Abdelly C, Saviouré A (2014) How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry* 80: 278-284.
- Rengel Z (1992) The role of calcium in salt toxicity. *Plant, Cell & Environment* 15: 625-632.
- Roy SJ, Negrão S, Tester M (2014) Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* 26: 115-124.
- Rozeff N (1995) Sugarcane and salinity: a review paper. *Sugar Cane (United Kingdom)*.
- Ruan H, Shen W, Ye M, Xu L (2002) Protective effects of nitric oxide on salt stress-induced oxidative damage to wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Chinese Science Bulletin* 47: 677-681.
- Ryu H, Cho YG (2015) Plant hormones in salt stress tolerance. *Journal of Plant Biology* 58: 147-155.
- Salgado I, Oliveira HC, Gaspar M (2017) Plant nitric oxide signaling under environmental stresses. *Mechanism of Plant Hormone Signaling Under Stress: A Functional Genomic Frontier*.
- Saud S, Li X, Chen Y, Zhang L, Fahad S, Hussain S, Chen Y (2014) Silicon application increases drought tolerance of kentucky bluegrass by improving plant water relations and morphophysiological functions. *The Scientific World Journal*.
- Scherer GF, Holk A (2000) NO donors mimic and NO inhibitors inhibit cytokinin action in betalaine accumulation in *Amaranthus caudatus*. *Plant Growth Regulation* 32: 345-350.

Shaheen S, Naseer S, Ashraf M, Akram NA (2013) Salt stress affects water relations, photosynthesis, and oxidative defense mechanisms in *Solanum melongena* L. Journal of Plant Interactions 8: 85-96.

Shanker AK, Venkateswarlu B (2011) Chromium: environmental pollution, health effects and mode of action.

Silveira JA, Silva SL, Silva EN, Viégas RA (2010) Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados. Fortaleza: INCTSal 11: 161-180.

Simontacchi M, García-Mata C, Bartoli CG, Santa-María GE, Lamattina L (2013) Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. Plant Cell Reports 32: 853-866.

Singh M, Kumar J, Singh S, Singh VP, Prasad SM (2015) Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. Reviews in Environmental Science and Biotechnology 14: 407-426.

Szabados L, Savoure A (2010) Proline: a multifunctional amino acid. Trends in Plant Science 15: 89-97.

Tavakkoli E, Fatehi F, Coventry S, Rengasamy P, McDonald GK (2011) Additive effects of Na⁺ and Cl⁻ ions on barley growth under salinity stress. Journal of Experimental Botany 62: 2189-2203.

Terrile MC, París R, Calderón-Villalobos LI, Iglesias MJ, Lamattina L, Estelle M, Casalengué CA (2012) Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the *Arabidopsis* TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. The Plant Journal 70: 492-500.

Tun NN, Livaja M, Kieber JJ, Scherer GF (2008) Zeatin-induced nitric oxide (NO) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants of NO biosynthesis and of two-component signaling genes. New Phytologist 178: 515-531.

Tuteja N (2007) Chapter twenty-four-mechanisms of high salinity tolerance in plants. Methods in Enzymology 428: 419-438.

Uchida A, Jagendorf AT, Hibino T, Takabe T, Takabe T (2002) Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. Plant Science 163: 515-523.

Wang Y, Mopper S, Hasenstein KH (2001) Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA, and SA in *Iris hexagona*. Journal of Chemical Ecology 27: 327-342.

- Wang H, Liang X, Wan Q, Wang X, Bi Y (2009) Ethylene and nitric oxide are involved in maintaining ion homeostasis in *Arabidopsis* callus under salt stress. *Planta* 230(2): 293-307.
- Wang B, Zhang J, Xia X, Zhang WH (2011) Ameliorative effect of brassinosteroid and ethylene on germination of cucumber seeds in the presence of sodium chloride. *Plant Growth Regulation* 65: 407.
- Wang P, Du Y, Hou YJ, Zhao Y, Hsu CC, Yuan F, Zhu JK (2015) Nitric oxide negatively regulates abscisic acid signaling in guard cells by S-nitrosylation of OST1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 613-618.
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307-313.
- Wilkins DA (1978) The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. *New Phytologist* 80: 623-633.
- Wilkinson S, Davies WJ (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, cell & environment* 33: 510-525.
- Wu X, Zhu W, Zhang H, Ding H, Zhang HJ (2011) Exogenous nitric oxide protects against salt-induced oxidative stress in the leaves from two genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 1199-1209.
- Wu X, He J, Chen J, Yang S, Zha D (2014) Alleviation of exogenous 6-benzyladenine on two genotypes of egg plant (*Solanum melongena* Mill.) growth under salt stress. *Protoplasma* 251: 169-176.
- Xu J, Wang W, Yin H, Liu X, Sun H, Mi Q (2010) Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress. *Plant and Soil* 326: 321.
- Ya'Acov YL, Haramaty E (1996) The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *Journal of Plant Physiology* 148: 258-263.
- Yadav S, Irfan M, Ahmad A, Hayat S (2011) Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: a review. *Journal of Environmental Biology* 32: 667.
- Yang L, Han R, Sun Y (2013) Effects of exogenous nitric oxide on wheat exposed to enhanced ultraviolet-B radiation. *American Journal of Plant Sciences* 4: 1285.

Zhang Y, Wang L, Liu Y, Zhang Q, Wei Q, Zhang W (2006) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na^+/H^+ antiport in the tonoplast. *Planta* 224: 545-555.

Zhao L, Zhang F, Guo J, Yang Y, Li B, Zhang L (2004) Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiology* 134: 849-857.

Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.

Zhu JK (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 441-445.

CONCLUSÕES GERAIS

As respostas das plantas à salinidade depende de alguns fatores, tais como, a concentração de sal aplicada, a idade da planta, duração do estresse e a sensibilidade ao agente estressor. Nesse contexto, a dose de NaCl definida no presente estudo e o curto período de exposição ao estresse foram suficientes para desencadear danos em plantas de *L. sativa*, evidenciados pelo aumento na concentração de H_2O_2 , danos de membrana, sinais de morte celular, desequilíbrio nutricional, alteração hormonal e redução no desempenho fotossintético, que culminaram, em última instância, no declínio do crescimento (Figura 1).

No entanto, o NO, suprido na forma de SNP, reverteu parcialmente os danos desencadeados pela salinidade, através da sua atuação como antioxidante e agente promotor da homeostase iônica e osmótica da célula, o que resultou na otimização da fotossíntese e crescimento sob condições de elevada salinidade (Figura 1). Assim, o NO atuou na mitigação dos danos em plantas de alface expostas ao estresse salino de curta duração, entretanto, sabe-se que as mudanças ocasionadas por esse agente sinalizador são em sua maioria reversíveis, apresentando um padrão de atuação temporal e que o NO exógeno pode induzir a síntese de NO endógeno, que por sua vez pode exercer funções de sinalização mesmo depois do doador de NO ser esgotado do meio de cultivo. Assim, estudos que avaliem o papel desse agente sinalizador, também, a longo prazo seria de grande relevância no fornecimento de subsídios para melhor compreensão da atuação do NO em todas as fases do estresse salino.

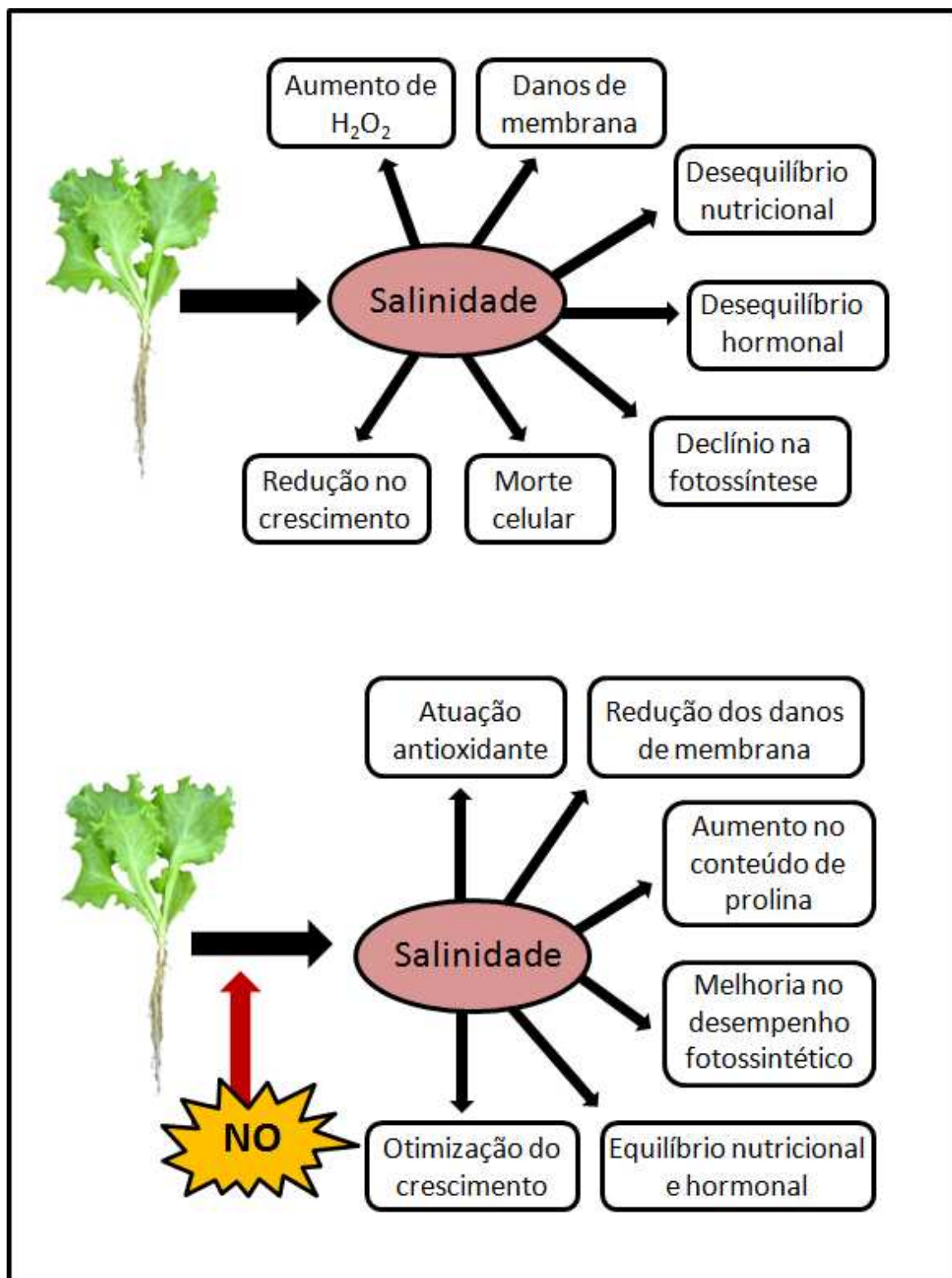


Figura 1. Esquema representativo dos principais danos observados em plantas de *L. sativa* expostas ao estresse salino de curta duração e os mecanismos pelo qual o óxido nítrico (NO) atua para mitigar os danos.