

**ISABELLY CRISTINA DA SILVA MARQUES**

**ÓXIDO NÍTRICO COMO AGENTE AMENIZADOR DO ESTRESSE SALINO EM  
ALFACE SEMI-HIDROPÔNICA**

**Botucatu**

**2020**



**ISABELLY CRISTINA DA SILVA MARQUES**

**ÓXIDO NÍTRICO COMO AGENTE AMENIZADOR DO ESTRESSE SALINO EM  
ALFACE SEMI-HIDROPÔNICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da Unesp, Campus de Botucatu,  
para obtenção do título de Mestre em Agronomia  
(Horticultura).

Orientador: Prof. Dr. João Domingos Rodrigues

**Botucatu**

**2020**

M357o

Marques, Isabelly Cristina da Silva

Óxido nítrico como agente amenizador do estresse salino em alface semi-hidropônica / Isabelly Cristina da Silva Marques. -- Botucatu, 2020

85 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientador: João Domingos Rodrigues

1. Lactuca sativa. 2. Salinidade. 3. Nitroprussiato de sódio. 4. Hidroponia. 5. Enzimas antioxidantes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

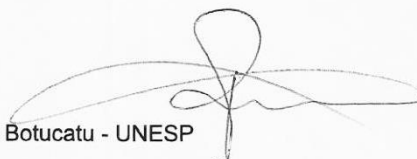
Título: **“ÓXIDO NÍTRICO COMO AGENTE AMENIZADOR DO ESTRESSE SALINO EM ALFACE SEMI-HIDROPÔNICA”**

AUTORA: ISABELLY CRISTINA DA SILVA MARQUES

ORIENTADOR: JOÃO DOMINGOS RODRIGUES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOÃO DOMINGOS RODRIGUES  
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ELIZABETH ORIKA ONO  
Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Pesquisadora Dr.<sup>a</sup> ANA CLAUDIA MACEDO  
Pesquisa e Desenvolvimento / Stoller do Brasil



Botucatu, 26 de fevereiro de 2020.



*Dedico este trabalho aos meus pais, Marta e João, que são a minha maior fonte de  
inspiração e incentivo diário.*





## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por toda força a mim atribuída ao longo dessa jornada que impulsionou alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Marta e João Mario, meus guerreiros, que são minha fonte de inspiração diária, meu exemplo de vida e garra. A eles que se fizeram presente em todas as dificuldades ao longo dessa jornada.

À minha família querida que incentivou desde o primeiro momento e confiou na minha competência.

Ao meu querido amigo, Prof. Thikão, que me encorajou em cada etapa desse trabalho e que muito contribui para minha formação profissional.

Às minhas primas, Kaliane, Darliane, Vanderlange e Thayrene, que são as irmãs que não tive, que me dão todo suporte para encarar esses desafios e sempre me recebem com um sorriso no rosto quando volto pra casa.

Ao meu querido e amado Vitor, por suas contribuições em todo o desenvolvimento deste trabalho, mesmo que a longa distância. Por sua lealdade, generosidade e companhia diária.

À você, minha brava e doce nordestina, Dayane, que me surpreende a cada dia com tantas experiências enriquecedoras. Agradeço por toda a ajuda em cada detalhe da concretização desse trabalho e por toda companhia durante essa caminhada.

A todos os amigos que fiz ao longo dessa jornada, em especial a você, Emanuelle, que me acolheu desde o primeiro dia de aula. Agradeço por seu companheirismo, pelas gargalhadas nas horas difíceis e por partilhar tantos bons momentos.

Ao homem mais gentil que já conheci, Prof. João Domingos, meu orientador e amigo, que sempre se preocupa com meu bem-estar. Que está sempre disposto a me ajudar e a escutar todas as minhas ideias. Que contribui exponencialmente na minha carreira profissional e que me convida para conversar sobre o universo magnífico dos super-heróis.

À professora Beth por escutar e ler os esboços iniciais que levaram à concretização deste trabalho, sempre incentivando e sugerindo boas ideias.

Aos companheiros do meu grupo de pesquisa, em especial, a Geane e a Thaís, por todo suporte e ensinamentos nas atividades do laboratório.

À Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”/Botucatu pela oportunidade de alcançar mais uma etapa profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.



## RESUMO

Perante a atual demanda hídrica para manutenção de cultivos intensos e sucessivos, faz-se necessária a busca de alternativas para o manejo correto da água a fim de reduzir seu desperdício. Uma dessas alternativas se concentra na utilização de águas de qualidade inferior como, por exemplo, águas salobras. No entanto, uso de águas salobras podem ocasionar diversas alterações no metabolismo das plantas, necessitando de estratégias que permitam o uso dessas águas. Na busca dessas alternativas, busca-se substâncias biológicas ou sintéticas que gerem respostas fisiológicas e bioquímicas que promovam a adaptação das plantas às condições ambientais adversas, a exemplo do óxido nítrico (NO). Partindo desse pressuposto, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito atenuante do óxido nítrico em plantas de alface crespa, cv. Vera, cultivada sob estresse salino. O experimento foi realizado em casa de vegetação nos meses de abril e maio de 2019, da Fazenda Experimental de São Manuel da FCA, localizada no município de São Manuel/SP. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, em esquema fatorial de 5 x 2, sendo o primeiro fator compreendido por cinco concentrações de nitroprussiato de sódio (NPS) (0, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{mol}$ ) e o segundo fator foi composto por dois níveis salinos da água de irrigação (0,2 e 3,5  $\text{dS m}^{-1}$ , respectivamente, sem e com estresse salino), com quatro repetições. As concentrações de NPS foram aplicadas semanalmente (via foliar), totalizando três aplicações durante o ciclo. As variáveis analisadas foram: variáveis bioquímicas (peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica, enzimas antioxidantes e prolina), análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a, determinação de pigmentos e variáveis biométricas (massa de matéria fresca de parte aérea, número de folhas, massa de matéria seca total, área foliar e conteúdo relativo de água). De modo geral, a análise estatística dos dados revelou efeito da interação entre os fatores (concentrações de NPS x níveis salinos) para a maioria das variáveis analisadas. Para as variáveis bioquímicas, a peroxidação lipídica e os níveis de peróxido de hidrogênio foram reduzidos com a aplicação das concentrações de NPS em plantas estressadas, promovendo também maior atividade das enzimas antioxidantes, bem como, o acúmulo de prolina nessas plantas. Para as análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a, o estresse salino afetou negativamente essas variáveis; no entanto, a aplicação de NPS resultou na atenuação do estresse, promovendo também aumento no teor de carotenoides. Além disso, houve incrementos na massa de matéria fresca total e sobre o número de folhas das plantas na condição de estresse salino, evidenciando, portanto, efeito positivo na mitigação do estresse salino pela aplicação do doador de óxido nítrico.

**Palavras-chave:** *Lactuca sativa*. Salinidade. Nitroprussiato de sódio. Hidroponia. Enzimas antioxidantes.



## ABSTRACT

In view of the current water demand for maintaining intense and successive crops, it is necessary to search for alternatives for the correct management of water in order to reduce its waste. One of these alternatives focuses on the use of lower quality water, such as brackish water. However, the use of brackish water can cause several changes in the metabolism of plants, requiring strategies that allow the use of these waters. In the search for these alternatives, biological or synthetic substances are sought that generate physiological and biochemical responses that promote the adaptation of plants to adverse environmental conditions, such as nitric oxide (NO). Based on this assumption, the aim of this study was to evaluate the attenuating effect of nitric oxide on crisp lettuce plants, cv. Vera, grown under salt stress. The experiment was carried out in a greenhouse in the months of April and May 2019, at the São Manuel da FCA Experimental Farm, located in the municipality of São Manuel / SP. The experimental design adopted was that of randomized blocks, in a 5 x 2 factorial scheme, the first factor being comprised of five concentrations of sodium nitroprusside (SNP) (0, 50, 100, 150 and 200  $\mu\text{mol}$ ) and the second factor was composed of two saline levels of irrigation water (0.2 and 3.5  $\text{dS m}^{-1}$ , respectively, without and with salt stress), with four repetitions. SNP concentrations were applied weekly (via leaf), totaling three applications during the cycle. The variables analyzed were: biochemical variables (hydrogen peroxide, lipid peroxidation, antioxidant enzymes and proline), analysis of gas exchange and chlorophyll a fluorescence, determination of pigments and biometric variables (fresh matter of aerial part, number of leaves, total dry matter mass, leaf area and relative water content). In general, the statistical analysis of the data revealed the effect of the interaction between the factors (SNP concentrations x saline levels) for most of the analyzed variables. For biochemical variables, lipid peroxidation and hydrogen peroxide levels were reduced with the application of SNP concentrations in stressed plants, also promoting greater activity of antioxidant enzymes, as well as the accumulation of proline in these plants. For gas exchange and chlorophyll a fluorescence analyzes, saline stress negatively affected these variables; however, the application of SNP resulted in the attenuation of stress, also promoting an increase in the content of carotenoids. In addition, there were increases in the total fresh matter mass and the number of leaves of the plants in the condition of salt stress, thus showing a positive effect in mitigating salt stress by the application of the nitric oxide donor.

**Keywords:** *Lactuca sativa*. Salinity. Sodium nitroprusside. Hydroponics. Antioxidant enzymes.



## SUMÁRIO

|          |                                                                |           |
|----------|----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                         | <b>15</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                              | <b>17</b> |
| 2.1      | Aspectos gerais sobre a cultura da alface.....                 | 17        |
| 2.2      | Uso de água salina na agricultura.....                         | 18        |
| 2.3      | Cultivo hidropônico.....                                       | 19        |
| 2.4      | Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....             | 21        |
| 2.5      | Mecanismos de defesa frente ao estresse salino.....            | 22        |
| 2.5.1    | Absorção seletiva e compartimentalização.....                  | 23        |
| 2.5.2    | Ajuste osmótico.....                                           | 23        |
| 2.5.3    | Redução do estresse oxidativo.....                             | 24        |
| 2.6      | Óxido nítrico.....                                             | 26        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                 | <b>29</b> |
| 3.1      | Localização e implantação do experimento.....                  | 29        |
| 3.2      | Caracterização da cultivar, semeadura e produção de mudas..... | 30        |
| 3.3      | Delineamento experimental e condução das plantas .....         | 30        |
| 3.4      | Curva de salinidade.....                                       | 31        |
| 3.5      | Aplicação dos tratamentos.....                                 | 32        |
| 3.6      | Irrigação e fertirrigação aplicada.....                        | 33        |
| 3.7      | Variáveis analisadas.....                                      | 33        |
| 3.7.1    | Variáveis bioquímicas.....                                     | 33        |
| 3.7.2    | Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....             | 36        |
| 3.7.3    | Determinação de pigmentos.....                                 | 37        |
| 3.7.4    | Variáveis biométricas.....                                     | 37        |
| 3.8      | Análise estatística.....                                       | 38        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                             | <b>39</b> |
| 4.1      | Variáveis bioquímicas.....                                     | 39        |
| 4.2      | Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....             | 52        |
| 4.3      | Conteúdo de pigmentos fotossintéticos.....                     | 66        |
| 4.4      | Variáveis biométricas.....                                     | 68        |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÃO.....</b>                                          | <b>72</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                        | <b>73</b> |





## 1 INTRODUÇÃO

A alface é uma das hortaliças folhosas mais consumidas na forma *in natura* no Brasil e no mundo (CAVALCANTE et al., 2014), destacando-se nos novos hábitos alimentares, baseados em dietas mais balanceadas e naturais (POTRICH; PINHEIRO; SCHMIDT, 2012) alavancando, conseqüentemente, a sua importância econômica.

No Brasil, segundo a Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM), em 2018, a alface foi considerada a 3ª hortaliça mais consumida, totalizando 1,5 milhão de toneladas produzidas e movimentando anualmente cerca de R\$ 8 bilhões, apenas no varejo. No estado de São Paulo, a área produzida com alface foi estimada em 11.704 ha, com produção de 475.235 t e produtividade em torno de 40,6 t ha<sup>-1</sup> (IEA, 2017).

Visando a continuidade do desenvolvimento desse setor da agricultura, o cultivo de hortaliças no Brasil tem se voltado para a produção em ambiente protegido, com o objetivo de reduzir as perdas culturais causadas por intempéries climáticas, fator preocupante que pode limitar a produção e produtividade dos vegetais, acarretando perdas econômicas significativas (SALA; COSTA, 2012; SILVA; SILVA; PAGIUCA, 2014).

Entretanto, esse tipo de cultivo demanda maiores custos com mão de obra especializada para implantação, compra da estrutura e manutenção, como por exemplo, a instalação de sistema de irrigação, uma vez que são ambientes fechados não permitindo a incidência de chuvas para manutenção hídrica das culturas (SILVA; SILVA; PAGIUCA, 2014).

Para a manutenção desses cultivos, que compete diretamente com a utilização da água para consumo, surge a necessidade de se buscar alternativas para aproveitar na irrigação das culturas água de qualidade inferior, que num primeiro momento apresentam-se como impróprias para consumo humano direto, como é o caso de águas com grandes concentrações de sais.

Os cultivos hidropônicos parecem apresentar maior eficiência na utilização dessas águas salinas, havendo maior disponibilidade hídrica para a cultura nesse sistema de cultivo por ausência de potencial mátrico do solo se comparado ao sistema convencional. Além disso, o cultivo de hortaliças, sobretudo folhosas,

adapta-se bem ao cultivo hidropônico (SOARES et al., 2007; ALVES et al., 2019; CORDEIRO et al., 2019; GUIMARÃES et al., 2019).

No entanto, o uso de águas salobras pode ocasionar diversas alterações no metabolismo vegetal, uma vez que a alta concentração de sais na zona radicular de plantas sensíveis irá promover redução na absorção de água e, conseqüentemente, o fechamento dos estômatos levando à baixa captação de CO<sub>2</sub>, restringindo a fotossíntese, inibindo a divisão celular e resultando em menor crescimento da planta (CARILLO et al., 2019).

Quando acometidas por estresses, as plantas respondem a essas adversidades com a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que levam à alteração da sua homeostase e, conseqüentemente, à oxidação de diversos componentes celulares (MILLER et al., 2010).

Na busca de estratégias que possam contornar os possíveis danos advindos do estresse salino, é sabido que o óxido nítrico (NO) pode promover respostas fisiológicas que permitem a adaptação de vegetais em condições ambientais adversas (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Foi observado que sob essas condições, a concentração de NO endógeno pode aumentar, atuando na sinalização ou proteção do tecido vegetal (AHMAD et al., 2018). Em vista disso, é possível que a aplicação exógena de NO possa induzir efeito benéfico para aclimação de plantas sob estresse salino, minimizando as perdas provenientes desse estresse.

Diante disto, devido à escassez de estudos da utilização do óxido nítrico como agente mitigador do estresse salino na cultura da alface, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito atenuante do óxido nítrico em plantas de alface crespa cultivada sob estresse salino.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais sobre a cultura da alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertencente à família Asteraceae é originária de espécies silvestres, ainda encontradas atualmente em regiões de clima temperado, no sul da Europa e na Ásia Ocidental (FERRO; COSTA CRUZ; COSTA BARCELOS, 2012). Seu cultivo se caracteriza pela alta competitividade na comercialização, o que tem levado à crescente especialização e ampliação da escala de produção (CALLEGARI; SANTOS; SCAPIM, 2001).

Pode ser caracterizada como planta herbácea, delicada e de caule diminuto no qual se prendem as folhas. As folhas são amplas e desenvolvem-se no formato de roseta em volta do caule, podendo estas serem lisas ou crespas, dependendo do grupo de alface a qual pertence, podendo formar ou não “cabeça”. Apresentam coloração verde ou roxa, de acordo com a cultivar (FILGUEIRA, 2008).

De acordo com as cultivares disponíveis no mercado são separadas em vários grupos, com base na formação de “cabeça” e tipo de folhas: grupo repolhuda lisa (folhas lisas, delicadas e macias, cabeça compacta); grupo repolhuda crespa ou americana (folhas crespas, crocantes, com cabeça grande e bem compacta); grupo solta lisa (folhas lisas, delicadas, sem formação da cabeça); grupo solta crespa (folhas crespas, textura macia, sem formação da cabeça e de coloração verde ou roxa) e grupo romana (folhas alongadas, duras, com nervuras claras, de cabeça fofa e alongada, com formato cônico) (HENZ; SUINAGA, 2009).

A alface *in natura* apresenta a seguinte composição média, por 100 g comestíveis: água: 94%; valor calórico: 18 kcal; proteína: 1,3 g; gordura: 0,3 g; carboidratos totais: 3,5 g; fibra: 0,7 g; cálcio: 68 mg; fósforo: 27 mg; ferro: 1,4 mg; potássio: 264 mg; vitamina A: 1900 UI; tiamina: 0,05 mg; riboflavina: 0,08 mg; niacina: 0,4 mg; vitamina C: 18,0mg. Dessa forma, a importância da alface é indiscutível por ser boa fonte de vitaminas e sais minerais para a alimentação humana (SGARBIERI, 1987).

É considerada uma das folhosas mais consumidas pelo brasileiro, fato devido tanto ao sabor e qualidade nutritiva quanto pelo baixo custo (COMETTI et al., 2004), garantindo grande expressão econômica no Brasil.

O Seu cultivo é realizado predominantemente em condições de campo aberto, sendo esse sistema de cultivo ausente de barreiras eficientes que possam proteger as plantas das condições ambientais adversas. Em meio a isso, para vencer esses obstáculos, é crescente o cultivo dessa hortaliça em ambiente protegido, especialmente em sistema hidropônico, na qual é dispensável o uso de solo e os nutrientes passam a ser fornecidos via solução nutritiva, garantindo maior eficácia contra intempéries climáticas e maiores ganhos em uniformidade (SALA; COSTA, 2012).

## **2.2 Uso de água salina na agricultura**

Atualmente, a disponibilidade, distribuição e manutenção dos recursos hídricos, bem como a qualidade destes, são fatores preocupantes, que devem ser levados em consideração para uso e reaproveitamento da água em diversas esferas da sociedade. Nota-se no decorrer dos anos, elevação na demanda por água na manutenção de cultivos extensos e sucessivos, competindo assim com a disponibilidade desse recurso para o consumo humano (ALMEIDA, 2010).

Com o objetivo de reduzir essa competição, a utilização de água de qualidade inferior apresenta-se como uma alternativa, podendo ser empregada no cultivo e produção de hortaliças. Contudo, essa água pode apresentar elevada salinidade, sodicidade e toxicidade, que prejudicam o desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, elevam as perdas de produtividade.

A utilização de água salina deve estar condicionada com a tolerância da cultura e o manejo adequado da irrigação (MEDEIROS et al., 2007), pois, a tolerância das espécies à salinidade é variável, podendo estar relacionada a fatores como estágio de desenvolvimento, fatores ambientais, cultivar, tipos de sais, intensidade e duração do estresse salino, manejo cultural e da irrigação e condições edafoclimáticas (MUNNS, 2005).

A salinidade pode agir de maneira drástica no crescimento e desenvolvimento das plantas, pois altas concentrações de sais reduzem o potencial osmótico do solo, dificultando a absorção de água pelas raízes. Além disso, quando submetidas a estresse salino, as plantas sofrem alterações fisiológicas, como a redução da abertura estomática, acarretando menores concentrações de CO<sub>2</sub> no

tecido foliar, prejudicando a síntese de fotoassimilados e reduzindo assim a produção vegetal (MUNNS, 2005).

Quando submetidas ao estresse salino, as plantas apresentam sintomas visíveis do estresse, como queima das bordas foliares, raquitismo e clorose, afetando drasticamente sua produtividade (SANTOS et al., 2010).

Conforme estudo de Ayers e Westcot (1999), a alface pode ser considerada moderadamente sensível à salinidade, tendo sua produção decrescida em torno de 13% com o aumento unitário da condutividade elétrica do extrato de saturação acima de  $1,3 \text{ dS m}^{-1}$ ; em relação à condutividade elétrica apenas da água de irrigação, o limiar encontra-se em  $0,9 \text{ dS m}^{-1}$ , considerando a fração de lixiviação entre 0,15 e 0,20.

Entretanto, a utilização de águas salobras na agricultura pode ser facilitada através da técnica da mistura de água salina com água de baixa concentração de sais, apresentando-se como estratégia a inserção dessas águas de menor qualidade na produção vegetal (SILVA et al., 2014). Outra maneira seria a aplicação em cultivos hidropônicos (COVA et al., 2017), reduzindo os índices de contaminação do solo por sua ausência nesse sistema de cultivo (ALVES et al., 2011), bem como, a redução no tempo de exposição das plantas à condição salina, ajudando a diminuir os efeitos da salinidade (PAULUS et al., 2010).

Em estudo realizado por Fernandes et al. (2018), trabalhando com diferentes soluções nutritivas salinas, verificaram que as altas concentrações de sais na solução nutritiva prejudicam a massa fresca de parte aérea da alface americana. Moraes et al. (2014) observaram redução na massa de matéria seca da alface (6,64%) em função do incremento unitário da salinidade em solução nutritiva a partir de  $1,73 \text{ dS m}^{-1}$ . Assim como os demais autores, Paulus et al. (2012) também observaram redução na massa de matéria fresca da alface cultivada com águas salobras, sendo esta variável reduzida entre 6 e 6,5%.

## **2.3 Cultivo hidropônico**

Em cultivos protegidos, a hidroponia é um sistema de produção intensificada e muito adotada para o cultivo de alface, devido ao curto ciclo da cultura, além da fácil aceitação no mercado (LUZ; GUIMARÃES; KORNDÖRFER, 2006).

O cultivo hidropônico apresenta inúmeras vantagens em relação ao sistema convencional, como menor impacto ambiental, maior eficiência na utilização do recurso hídrico, redução no uso de defensivos agrícolas e maior qualidade dos produtos gerados, compensando o valor de empreendimento nesse tipo de sistema (RODRIGUES, 2002).

A hidroponia, por vezes, pode ser definida como a ciência do cultivo de plantas sem a utilização de solo. Nesse sistema há diversas formas quanto à sustentação da planta tanto em meio líquido ou em substratos, quanto ao reaproveitamento da solução nutritiva (circulante ou não circulante) e quanto ao fornecimento da solução nutritiva (contínua ou intermitente) (NETO; BARRETO, 2012).

Contudo, o cultivo hidropônico com substratos já é uma realidade aplicável e com inúmeras vantagens, como o uso da fibra de coco dispondo de propriedades físicas favoráveis como reação inerte com os nutrientes aplicados via solução nutritiva, durabilidade física do material, possibilidade de esterilização, matéria prima renovável e de baixo custo (CARRIJO; LIZ; NOZOMU, 2002).

Acerca disso, o cultivo em vasos com uso de substratos parece surgir como alternativa ao sistema mais utilizado na hidroponia, o NFT (Nutrient Film Technique), pois apresenta menor consumo de energia, uma vez que estes substratos retêm por mais tempo a água aplicada (ANDRIOLO et al., 2004).

Além disso, esse tipo de substrato apresenta ainda alta capacidade de absorção hídrica (85%), permitindo que o mesmo se mantenha em condições ideais de umidade na redução dos efeitos ocasionados pela alta salinidade da solução nutritiva (ROSA et al., 2002); além disso, apresenta boa aeração e drenagem, proporcionando excelente desenvolvimento radicular.

Acredita-se que o sistema hidropônico demonstre grande vantagem no uso eficiente de água e fertilizantes, gerando menor impacto ambiental.

Para utilização desse sistema de cultivo, assim como em outros, a qualidade da água é fator de grande importância para hidroponia, uma vez que esse sistema é totalmente alimentando por esse recurso; contudo, pesquisas salientam a possibilidade de utilizar águas salobras nesse sistema, podendo esta água apresentar mais de  $2500 \text{ mg L}^{-1}$  de sais, desde que ocorra movimentação livre da água no sistema radicular das culturas e boa drenagem (RODRIGUES, 2002).

O cultivo de alface submetida ao estresse salino em hidroponia, utilizando diferentes soluções nutritivas salinas, promoveu maior rendimento na cultura, além disso, a utilização de água salina para reposição de evapotranspiração não provoca prejuízos às características da produção e qualidade da planta. Desse modo é possível que haja maior tolerância da cultura em sistema hidropônico quando comparado ao cultivo em solo (SOARES et al., 2007; ALVES et al., 2011; DIAS et al., 2011).

O cultivo hidropônico com o uso de substratos pode ser caracterizado como sistema semi-hidropônico e ser de grande destaque para a produção de hortaliças. Nesse sistema, as plantas são dispostas em vasos contendo substratos inertes ou pouco ativos quimicamente, isolados ou em mistura, sendo considerado um sistema de cultivo aberto onde não ocorre o retorno da solução nutritiva aplicada para os reservatórios (SANTOS JÚNIOR et al., 2014).

Plantas de alface apresentaram melhor desempenho produtivo em cultivo hidropônico vertical com substrato em relação ao cultivo hidropônico NFT (COSTA et al., 2018). O uso do substrato fibra de coco no cultivo de melão melhorou a absorção de água pelas plantas, em função deste não apresentar potencial mátrico (DIAS et al., 2010). Plantas de rúculas foram menos afetadas pela salinidade em cultivo hidropônico com substrato até o nível  $2,4 \text{ dS m}^{-1}$  da solução nutritiva (OLIVEIRA et al., 2013b) em relação ao cultivo hidropônico em NFT (JESUS, 2011).

## **2.4 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a**

A fotossíntese é definida como a síntese de fotoassimilados através da energia luminosa, utilizando água e dióxido de carbono, liberando oxigênio. Dessa forma, há formação de ATP e  $\text{NADPH}_2$  que são utilizados na síntese de carboidratos pelo ciclo de Calvin-Benson no estroma do cloroplasto (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Para que a fotossíntese ocorra, as moléculas de clorofilas devem ser excitadas pela energia luminosa incidente na folha, onde essas moléculas tornam-se instáveis em um estado excitado e para retornar ao seu estado estável, existem três rotas alternativas: transferência de energia para uma molécula vizinha pela emissão de calor; transferência de energia para o centro de reação ocorrendo reações químicas (fotoquímica) e emissão de um fóton (fluorescência). Dessa maneira, vale

ressaltar a importância de estudos sobre a fotossíntese através das análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* (ZEMRI et al., 2012).

Sabe-se que a capacidade fotossintética da planta pode ser influenciada por diversos fatores, sejam eles genéticos, morfológicos ou ambientais. No que diz respeito aos fatores ambientais, a salinidade é uma das causas que mais afeta os processos fisiológicos das plantas, sendo atribuída a limitações de origem estomática e não estomática (MUNNS; TESTER, 2008).

Acredita-se que a atividade fotoquímica apresente resistência ao estresse salino dependente da sua duração, reduzindo os danos potenciais à eficiência quântica potencial do fotossistema II (PRAXEDES et al., 2010). No entanto, quando o estresse é prolongado altas concentrações de sais se acumulam no tecido e, consequentemente, afetam a atividade fotoquímica das plantas (SILVA et al., 2010).

Diante disto, o estudo funcional sobre o aparato fotossintético é considerado um indicador fisiológico muito útil na verificação da sensibilidade das plantas a condições adversas, uma vez que, a análise de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* é um método não destrutivo, rápido e confiável (OLIVEIRA et al., 2018).

## **2.5 Mecanismos de defesa frente ao estresse salino**

Em condições naturais, as plantas podem ser acometidas por diferentes estresses, sejam eles de origem biótica ou abiótica, os quais prejudicam seu desenvolvimento, crescimento e rendimento produtivo. Compreender como as plantas respondem a essas adversidades pode ser fator chave para alternativas que minimizem ou inibam os efeitos drásticos desses fatores estressantes, garantindo a segurança alimentar (NABI et al., 2019).

Quanto ao estresse salino, as plantas podem ser divididas em plantas halófitas, que são aquelas que demonstram maior tolerância ao sal na rizosfera sem que ocorra redução no seu crescimento e plantas glicófitas, que são aquelas afetadas pelo alto índice salino presente no meio (TAIZ; ZEIGER, 2017). A fim de promover a tolerância aos sais, essas plantas podem induzir diversos mecanismos como, seletividade e compartimentalização de íons no vacúolo, ajustamento osmótico e redução do estresse oxidativo (HASEGAWA et al., 2000).



### 2.5.1 Absorção seletiva e compartimentalização

Os íons de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ) são considerados tóxicos para as plantas, necessitando a limitação destes no tecido vegetal. No primeiro momento, a planta restringe a entrada de sódio ( $\text{Na}^+$ ), evitando seu acúmulo no citosol, através da seletividade de íons ou compartimentalização do  $\text{Na}^+$  para tecidos mais velhos, onde formará um ambiente estoque para, posteriormente, ser eliminado através da abscisão foliar (TAIZ; ZEIGER, 2017).

O sequestro de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  para o vacúolo, apoplasto ou em outras organelas, reduz a toxidez desses elementos no tecido vegetal, apresentando grande vantagem para o crescimento e ajuste osmótico estabelecido pela compartimentalização (FLOWERS; TROKE; YEO, 1977).

Sabe-se que o vacúolo pode ocupar até 95% de uma célula vegetal madura, logo, a compartimentalização de íons tóxicos como é o caso do sódio e cloro nessa estrutura permite maior eficiência na tolerância à salinidade (FERREIRA, 1992).

Para que ocorra o sequestro desses íons é crucial a atividade de proteínas com sistema antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  no tonoplasto ou membrana, uma vez que, o funcionamento desse sistema tem sido relatado em muitas espécies como trigo (XUE; WEISS; BAENZIGER, 2004), tomate (ZHANG; BLUMWALD, 2001) e soja (LI et al., 2006).

No entanto, existem plantas tolerantes ou não à salinidade que podem não apresentar os transportadores de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , nem no tonoplasto e nem na membrana plasmática. Logo, a estratégia dessas plantas seria reduzir a concentração de  $\text{Na}^+$  na célula através dos canais transportadores de  $\text{K}^+$ , favorecendo maior seletividade no acúmulo de  $\text{K}^+$  (MÄSER; GIERTH; SCHROEDER, 2002), sendo este elemento de grande importância para o ajuste osmótico e abertura e fechamento dos estômatos.

### 2.5.2 Ajuste osmótico

Além da seletividade e compartimentalização de íons, outro mecanismo pode ser utilizado como via de estratégia para amenizar os danos ocasionados pelo estresse salino, como é o caso da osmorregulação. Isso comumente ocorre quando há grande concentração de sais no solo, no qual ocorre a redução do potencial osmótico deste e, conseqüentemente, alteração no potencial hídrico do meio,

resultando em menor disponibilidade de água para as plantas. Para isso, as plantas tendem a acumular íons no vacúolo e, ou, solutos orgânicos de baixa massa molecular no citoplasma para manutenção da turgescência celular (HOPKINS, 1999; TESTER; DAVENPORT, 2003).

Na condição de estresse, o acúmulo de soluto irá manter o balanço osmótico celular para manutenção da integridade de elementos como, por exemplo, membranas e enzimas (CHAVES; OLIVEIRA, 2004), bem como, o funcionamento de processos fisiológicos como abertura estomática, fotossíntese, alongamento e divisão celular (SERRAJ; SINCLAIR, 2002).

O acúmulo de substâncias como carboidratos, proteínas e aminoácidos no interior da célula podem conferir tolerância à salinidade, visto que já foi comprovado que em plantas condicionadas ao estresse hídrico ou salino os teores do aminoácido prolina são elevados e, por se tratar de um metabólito relacionado ao estresse, pode atuar auxiliando na osmorregulação e favorecer o aumento da tolerância a certos níveis de estresse (TURKAN, 2011; TAIZ; ZEIGER, 2017).

Em alguns casos, as plantas também podem apresentar tolerância à salinidade pelo acúmulo de compostos nitrogenados. Estudos tem revelado acúmulo de compostos nitrogenados em condições de estresse salino (BARHOUMI et al., 2010). Essa tolerância pode ser conferida devido ao acúmulo de substâncias à base de N, como é o caso da prolina, aminoácidos livres e glicinabetaína, muito presentes em condições de estresse (MUNNS; TESTER, 2008).

### **2.5.3 Redução do estresse oxidativo**

As plantas normalmente respondem ao estresse (biótico ou abiótico) através da produção de espécies reativas de oxigênio, comumente chamadas ERO (JASPERS; KANGASJÄRVI, 2010). A síntese dessas espécies de oxigênio pode alterar a homeostase das plantas e causar estresse oxidativo e, em casos de grande produção das ERO, as células podem ser danificadas o suficiente para que ocorra necrose da folha (MILLER et al., 2010).

Geralmente, a produção de ERO ocorre nos cloroplastos e mitocôndrias, onde há alta atividade de oxidação metabólica ou fluxo intenso de elétrons (GILL; TUTEJA, 2010). Durante a fotossíntese, a formação de ERO ocorre por três processos: no primeiro deles, a luz mediada pela excitação da clorofila no

fotossistema II leva à formação da ERO pela não dissipação de energia da clorofila em seu estado tripleto; o segundo processo envolve a reação de Mehler no fotossistema I, em que o  $O_2$  é reduzido para o radical superóxido  $O_2^-$  na cadeia de transporte de elétrons e, por último, na fotorrespiração a reciclagem do fosfoglicolato formado pela Rubisco leva à produção de peróxido de hidrogênio (DINAKAR; DJILIANOV; BARTELS, 2012).

Dentre as espécies reativas de oxigênio, em condições de alto índice salino no solo, se formam no tecido vegetal oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (KUMAR et al., 2018), o que levará ao estresse oxidativo. Logo, o excesso na concentração de ERO nas células vegetais irá promover a degradação das membranas através da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, bem como, danos ao DNA (ROSSATTO et al., 2017).

Para contornar os danos causados pelo estresse oxidativo, as plantas iniciam seu processo de defesa, através de rotas enzimáticas e não enzimáticas, com um sistema de defesa antioxidante com função de eliminar a alta concentração de ERO presente nas células (KUMAR et al., 2018). O sistema de defesa enzimático conta com diversas enzimas antioxidantes, sendo elas a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase de ascorbato (APX), glutathione redutase (GR) e peroxidase (POD) (BARBOSA et al., 2014; CHEN et al., 2016).

A primeira linha de defesa conta com a ativação da SOD, enzima classificada de acordo com o metal presente, podendo este ser cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), ferro (Fe-SOD) e manganês (Mn-SOD) (GILL et al., 2015). Essa enzima atuará na restrição do ânion superóxido convertendo-o em  $H_2O_2$ , que é uma ERO menos reativa e pode ser degradada por outras enzimas (ALSCHER et al., 2002).

Para desintoxicação celular inicia-se o processo através da atividade da enzima CAT, atuando na dismutação do  $H_2O_2$  gerando  $H_2O$  e  $O_2$ , a fim de remover o peróxido gerado nos peroxissomos (GILL; TUTEJA, 2010) e glioxissomos (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). Além da catalase existem outras enzimas responsáveis na desintoxicação celular, podendo influenciar a atividade da CAT. A APX e POD podem ser uma delas, atuando também na degradação do peróxido de hidrogênio (FOYER; NOCTOR, 2003).

A isoenzima APX pode ser encontrada nas paredes celulares, citosol, mitocôndrias e peroxissomos e sua atividade é normalmente mediada pela taxa de ácido ascórbico. A APX exige o ácido ascórbico como redutor, tendo alta afinidade

com o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , permitindo a eliminação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  mesmo em baixas concentrações (SHARMA et al., 2012).

A POD também atua no sistema de defesa contra as ERO, degradando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  resultante do estresse oxidativo, bem como, o produzido pela atividade da SOD na dismutação do radical superóxido. Esta enzima pode ser encontrada, especialmente, no vacúolo e parede celular induzindo a resistência ao estresse em plantas (BARCELO et al., 1989).

Dentre os principais metabólitos de atividade antioxidante não enzimático, destacam-se o ácido ascórbico, a glutathiona, o  $\alpha$ -tocoferol e os carotenoides. Todos eles podem ser localizados nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (DINAKAR; DJILIANOV; BARTELS, 2012).

O ácido ascórbico (AsA) é considerado um dos mais importantes antioxidantes não enzimáticos podendo inativar várias ERO. Esse metabólito atua juntamente com a glutathiona (GSH) no ciclo do Ascorbato-Glutathiona onde o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é degradado pela ação da enzima APX através da peroxidação do AsA. Para a continuação do ciclo, a recuperação do AsA é mediada por meio da oxidação do GSH que torna a ser reduzido pela glutathiona redutase (DINAKAR; DJILIANOV; BARTELS, 2012; BARBOSA et al., 2014).

Além da ação do AsA e do GSH, o  $\alpha$ -tocoferol e os carotenoides atuam na redução do estresse oxidativo através do sequestro do oxigênio singlete que é produzido nas membranas dos tilacóides pelo fotossistema II, reduzindo os danos resultantes das ERO (BARBOSA et al., 2014).

## 2.6 Óxido nítrico

Diante de todas as consequências acometidas pelos estresses bióticos e abióticos em plantas, o estudo voltado para a busca de alternativas compensatórias tem crescido gradualmente, a fim de compreender e explorar possibilidades que gerem resultado satisfatório para minimização das perdas produtivas ao longo dos cultivos e redução de custos no manejo vegetal. Em função disso, a aplicação exógena de óxido nítrico pode ser uma das chaves para vencer esses desafios (NEILL et al., 2008).

O óxido nítrico é considerado uma molécula de espécie gasosa reativa ao oxigênio, sendo altamente difusível através das membranas celulares, podendo

atuar como antioxidante eliminando espécies reativas ou atuar como importante mensageiro de sinalização em uma cadeia de eventos, levando à expressão gênica em plantas submetidas a estresses ambientais, sobretudo, a alta salinidade. Dessa maneira, é visto que o interesse de pesquisadores sobre essa molécula (NO) e suas vias de biossíntese tem aumentado (SEABRA; MAHENDRA; NELSON, 2015).

Acredita-se que existem inúmeras vias de biossíntese da molécula de NO endógeno em plantas e segundo Neill et al. (2003), a contribuição de cada via para a produção de NO depende da espécie, fase de desenvolvimento e do ambiente no qual as plantas são cultivadas.

Além disso, a síntese de óxido nítrico pode ocorrer por meio de reações enzimáticas ou não enzimáticas. Em vias enzimáticas a produção endógena de NO pode ser dependente da enzima nitrato redutase por meio da redução dessa molécula (NO) usando  $\text{NADPH}_2$  como doador de elétrons. Já a síntese não enzimática pode estar condicionada à redução do nitrito no apoplasto em meio ácido em resposta à giberelina e ao ABA, bem como, por reação química pela presença de luz e carotenoides (BETHKE; BADGER; JONES, 2004).

Em alguns estudos pode ser constatada a influência do óxido nítrico em vários processos fisiológicos vegetais como na germinação de sementes (BELIGNI; LAMATTINA, 2000), regulação estomática (NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2002), crescimento de raízes (CORREA ARAGUNDE; GRAZIANO; LAMATTINA, 2004), sinalização por injúria (HUANG et al., 2004) e, especialmente, como molécula sinalizadora do estresse hídrico, salino e térmico (SONG et al., 2006).

O aumento de ERO no tecido vegetal pode ser contornado pela ação do óxido nítrico, uma vez que, este composto atua sinalizando para que as concentrações de espécies reativas de oxigênio mantenham-se em condições normais na célula vegetal (VRANOVÁ et al., 2002).

Em meio a isso, as variações de óxido nítrico endógeno aumentam quando a concentração de espécies reativas de oxigênio se torna tóxica, atuando possivelmente como um desintoxicante e minimizando os efeitos prejudiciais das ERO (LIPTON et al., 1993). De certa forma, é provável que a aplicação exógena de óxido nítrico possa minimizar os danos causados pelo estresse em plantas (AHMAD et al., 2018).

Segundo Shi et al. (2014) o óxido nítrico pode atenuar os efeitos do estresse oxidativo mediado pelas ERO através da inibição da peroxidação lipídica, aumento da fotossíntese e expressão das enzimas antioxidantes.

Em estudo realizado em pepino e arroz, foi constatado que a aplicação de óxido nítrico conferiu resistência à seca a essas plantas através do aumento de enzimas antioxidantes, promovendo efeito atenuador sobre as ERO (FAROOQ et al., 2009). Já para condições de estresse salino, a aplicação exógena de nitroprussiato de sódio (doador de óxido nítrico) em plântulas de arroz e pepino mitigou os danos do estresse através de incremento no crescimento das plantas (FAN; DU; GUO, 2013).

Contudo, embora demonstre grande papel funcional nas respostas das plantas submetidas ao estresse salino (BAI et al., 2011), os resultados apresentados até o momento sobre a aplicação exógena de óxido nítrico nessa condição ainda não são totalmente convincentes, devido às diferentes espécies de plantas, os tratamentos utilizados e quantidade de sais aplicados (MANAI et al., 2014), necessitando de mais estudos sobre o uso dessa substância como agente atenuador do estresse salino. Além disso, o estudo da utilização de óxido nítrico como agente protetor da alface acometida por estresse salino ainda são incipientes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

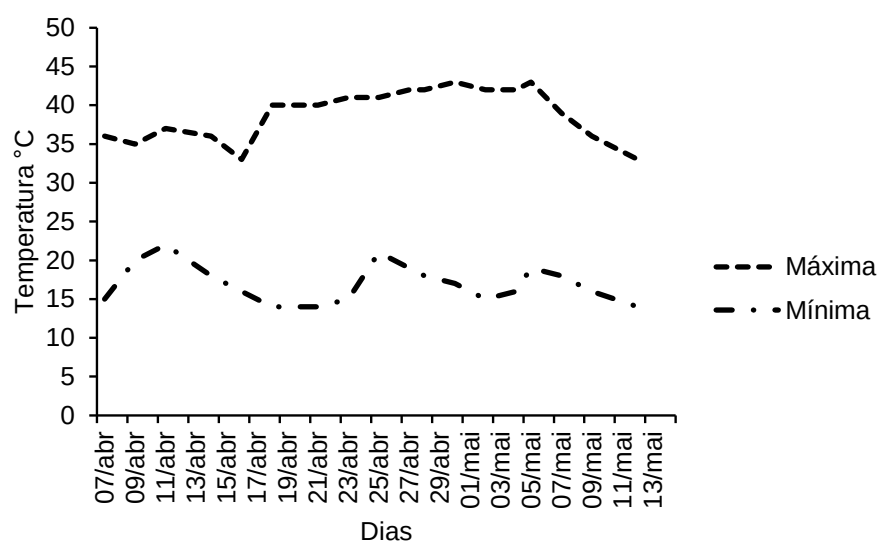
#### 3.1 Localização e implantação do experimento

O experimento foi realizado em casa de vegetação, entre os meses de abril e maio de 2019, na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Produção São Manuel, da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, localizada no Município de São Manuel – SP (22° 43' LS, 48° 34' LW e altitude de 709 m). Segundo classificação climática de Köppen-Geiger, o clima da região é mesotérmico do tipo Cwa, subtropical úmido, com precipitação média anual de 1.376mm e temperatura média do mês mais quente de 22°C (CUNHA; MARTINS, 2009).

A casa de vegetação utilizada apresenta estrutura com cobertura do tipo arco, medindo 50x14 m de comprimento e largura, respectivamente, e pé direito com 3 metros de altura, coberto com filme de polietileno de baixa densidade de 150  $\mu$ m aditivado e laterais de tela de monofilamento branca, com impedimento de 14% da entrada de luz.

Durante o período experimental foram coletadas medidas de temperaturas no interior da casa de vegetação com auxílio de termômetro de mercúrio, tipo capela, com precisão de  $\pm 1$  °C, na qual são registradas a temperatura máxima e mínima do dia anterior e temperatura atual (Figura 1).

**Figura 1 – Medidas de temperatura máxima e mínima observadas no interior da casa de vegetação durante condução do experimento, Botucatu/SP, 2019.**



### 3.2 Caracterização da cultivar, semeadura e produção de mudas

A cultivar utilizada durante o experimento foi a Vera, alface do tipo crespa, a qual apresenta planta de porte grande, folhas largas e alta crespicidade, com ciclo médio total de 60 dias e alto nível de resistência ao pendoamento precoce, sendo indicada para plantio em campo aberto e sistema hidropônico (SAKATA, 2019).

As mudas foram produzidas em parceria com o Departamento de Ciências Florestais, onde foram preparadas em bandeja de isopor, sendo disposta uma semente por célula contendo substrato comercial Carolina Soil®, composto por turfa, vermiculita, resíduo orgânico, resíduo orgânico agroindustrial classe A e calcário, apresentando baixa densidade e alta aeração para o bom desenvolvimento radicular das plantas.

### 3.3 Delineamento experimental e condução das plantas

O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, em esquema fatorial de 5 x 2, sendo o primeiro fator compreendido por cinco concentrações de nitroprussiato de sódio (NPS) (0, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{mol}$ ), o qual atua como doador de óxido nítrico e o segundo fator foi composto por dois níveis salinos da água de irrigação (0,2 e 3,5  $\text{dS m}^{-1}$ , respectivamente, sem e com estresse salino), com quatro repetições, totalizando 40 unidades experimentais, sendo a unidade experimental composta por 5 plantas, com uma planta por vaso.

O NPS foi utilizado na forma dihidratada apresentando as seguintes especificações:  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , com massa molecular de 297,95  $\text{g mol}^{-1}$ , teor Mln. 99%, Cloreto (Cl) Max. 0,02%; Sulfato ( $\text{SO}_4$ ) Max. 0,01% e materiais insolúveis Max. 0,01%.

Para o menor nível salino, foi utilizada água proveniente do setor de abastecimento da Fazenda Experimental São Manuel, a qual apresenta condutividade elétrica na faixa de 0,2  $\text{dS m}^{-1}$ ; o nível de maior índice salino, de 3,5  $\text{dS m}^{-1}$ , foi obtido através da dissolução de cloreto de sódio (NaCl) em água utilizada no nível salino de 0,2  $\text{dS m}^{-1}$ , cuja salinidade se manteve ajustada com auxílio de condutivímetro de bancada Tec-4MP (Tecnal®).



A água de abastecimento utilizada para irrigação apresentou as seguintes características: pH = 6,18; CE = 0,20 dS m<sup>-1</sup>; N = 22,00; P = 1,00; K<sup>+</sup> = 10,00; Ca<sup>2+</sup> = 14,00; Mg<sup>2+</sup> = 4,00; S = 4,00 e Na<sup>+</sup> = 0,80 expresso em mg L<sup>-1</sup>.

As mudas foram transplantadas aos 25 dias após semeadura (DAS), quando apresentavam três folhas desenvolvidas, e mantidas apenas sob fertirrigação para que ocorresse total estabelecimento das plantas e posterior início dos tratamentos. Estas foram acondicionadas em vasos plásticos de 2,8 L, preenchidos com substrato comercial inerte (fibra de coco). O substrato utilizado pertence ao grupo Sococo, da Amafibra, com as seguintes especificações: tipo 11/12, condutividade elétrica de 1,1 mS cm<sup>-1</sup>, capacidade de retenção de água de 507 mL por litro de substrato e com porosidade total de 95%.

### 3.4 Curva de salinidade

Essa etapa constou da obtenção de uma curva de condutividade elétrica para aplicação proporcional de cloreto de sódio ao nível salino desejado. Para encontrar a relação entre a condutividade elétrica da solução (CEs) foi utilizada inicialmente como referência a equação proposta por Richards (1954), apresentada na equação abaixo:

$$C = 640 \text{ CEs}$$

em que:

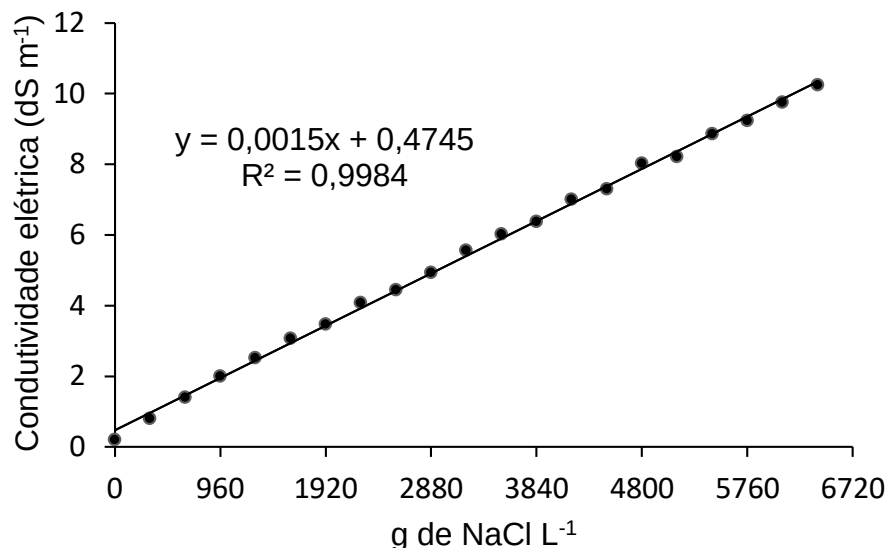
C = concentração de sais fertilizantes, mg L<sup>-1</sup>

CEs = condutividade elétrica da solução, dS m<sup>-1</sup>

Para o preparo da curva foi seguida a metodologia utilizada por Dias (2004), onde diferentes soluções de concentrações conhecidas foram preparadas a partir da diluição do NaCl em água de abastecimento da Fazenda Experimental São Manuel (0,2 dS m<sup>-1</sup>), de um padrão de 6400 mg L<sup>-1</sup>, totalizando 21 soluções. A concentração dessas soluções variou inicialmente de 0,2 (amostra em branco) até 6400 mg L<sup>-1</sup>, com intervalos de 320 mg L<sup>-1</sup>, o que correspondeu à salinidade variando de 0,2 até 10 dS m<sup>-1</sup>. A partir dessa preparação foi determinada a condutividade elétrica real das soluções, utilizando-se condutivímetro de bancada com leituras

autocompensadas para temperatura, relacionando-se a condutividade elétrica das soluções com as quantidades de NaCl utilizada em cada solução (Figura 2).

**Figura 2 – Curva padrão de salinidade para determinação das CE elétricas.**  
Laboratório de Ciências Florestais da Faculdade de Ciências Agronômicas - FCA/UNESP, Botucatu/SP, 2019.



### 3.5 Aplicação dos tratamentos

Após o período de estabilização do estande de plantas, teve início a adição do NaCl (595,2 g) em reservatório plástico de 310 L de capacidade, acrescido de fertirrigação para manutenção nutricional das plantas, para o preparo do maior nível salino (3,5 dS m<sup>-1</sup>); para o nível de menor salinidade foi utilizado apenas água de abastecimento da Fazenda Experimental São Manuel em um segundo reservatório (310 L), acrescida de fertirrigação. A quantidade de adubos utilizados para fertirrigação foi ajustada a 50% da força iônica devido ao uso da fibra de coco como substrato de sustentação das plantas, na qual pode contribuir para aumento da salinidade. Esse ajuste resultou em condutividade elétrica de 1,3 dS m<sup>-1</sup>.

As aplicações do NPS foram feitas semanalmente (via foliar), aos 9, 16 e 23 dias após transplântio (DAT), totalizando três aplicações ao longo do experimento. Para aplicação das concentrações foi previamente preparada a diluição de cada uma delas em água proveniente da Fazenda, para posterior aplicação em pulverizador manual de CO<sub>2</sub> pressurizado, com 0,3 kgf por cm<sup>2</sup>, bicos cônicos cheios, com auxílio de cortina plástica entre tratamentos para evitar deriva.

### 3.6 Irrigação e fertirrigação aplicada

O sistema de irrigação adotado foi adequado para cultivo hidropônico, onde as soluções nutritivas foram aplicadas diariamente, aplicando volume de solução suficiente para ocorrer a mínima drenagem dos vasos, não havendo retorno desta para os reservatórios. Para esse sistema foi utilizado gotejamento independente, acionado por duas eletrobombas (uma para cada reservatório de 310 L), linhas laterais de polietileno com diâmetro de 16 mm, emissores do tipo microtubos de 40 cm de comprimento e gotejo auto compensador com vazão de  $4,5 \text{ L h}^{-1}$ . Todo o sistema foi controlado através de temporizador digital, com eventos diários programados para a mínima drenagem dos vasos, alterando-se de acordo com o desenvolvimento da cultura.

A fertirrigação utilizada durante o experimento seguiu a recomendação de adubação segundo Furlani et al. (1999) para folhosas, para o preparo de 1.000 L de solução nutritiva, dispondo das seguintes quantidades de nutrientes:  $750 \text{ g m}^{-3}$  de nitrato de cálcio,  $500 \text{ g m}^{-3}$  de nitrato de potássio,  $150 \text{ g m}^{-3}$  de fosfato monoamônico (MAP),  $400 \text{ g m}^{-3}$  de sulfato de magnésio,  $0,15 \text{ g m}^{-3}$  de sulfato de cobre,  $0,3 \text{ g m}^{-3}$  de sulfato de zinco,  $1,5 \text{ g m}^{-3}$  de sulfato de manganês,  $1,8 \text{ g m}^{-3}$  de ácido bórico,  $0,15 \text{ g m}^{-3}$  de molibdato de sódio e  $16 \text{ g m}^{-3}$  de Fe-EDTA – 13%.

### 3.7 Variáveis analisadas

As plantas foram colhidas aos 35 DAT quando apresentavam padrão comercial (folhas completamente expandidas e ausência de pendoamento).

#### 3.7.3 Variáveis bioquímicas

Para as análises enzimáticas foram realizadas três coletas de folhas completamente expandidas. Cada coleta foi realizada 48h após aplicação do NPS, entre 8:00 e 11:00 h da manhã, aos 11, 18 e 25 DAT. As folhas foram guardadas em papel alumínio previamente identificados e imersas imediatamente em nitrogênio líquido para completa paralização da reação enzimática. Após a coleta, estas foram armazenadas em ultra freezer à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Para determinação da peroxidação de lipídios foi adotada a técnica sugerida por Heath e Packer (1968), citada por Rama Devi e Prasad (1998). Para isso foi utilizado 300 mg do material vegetal a  $-70^{\circ}\text{C}$ , colocada sobre almofariz contendo nitrogênio líquido e maceradas com auxílio de pistilo. Após, o material vegetal foi homogeneizado em 5 mL de solução composta por ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido tricloroacético (TCA) 10%. A solução extraída foi incubada em banho-maria a  $90^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho de gelo para o completo resfriamento para posterior centrifugação a  $10000 \times g$  por 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante resultante da centrifugação foi coletado para realização das leituras, sendo estas realizadas em dois comprimentos de ondas (560 e 600 nm) em espectrofotômetro. Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do malondialdeído ( $155 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

A determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio foi realizada segundo método de Alexiava et al. (2001). Para tanto, foram utilizadas 0,1 g de amostras maceradas e congeladas em nitrogênio líquido, nas quais foram adicionados 1 mL de TCA 0,1% e agitadas em vórtex; em seguida, foram centrifugadas a  $12000 g$  por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . A reação iniciou-se com a adição de 0,5 mL de extrato, 0,5 mL de tampão fosfato 0,1 M de pH 7,0 e 2,0 mL de iodeto de potássio a 1M. O conteúdo foi incubado no escuro por uma hora e realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 390 nm. Calculou-se a concentração de peróxido de hidrogênio nas amostras através de curva do próprio peróxido de hidrogênio.

A extração enzimática seguiu a metodologia proposta por Kar e Mishra (1976), na qual foram pesados 300 mg de folhas frescas congeladas e previamente trituradas em nitrogênio líquido. Após esse processo, foi adicionado o composto polivinilpirrolidona (PVP) para evitar oxidação do material vegetal, homogeneizando novamente junto com o PVP e nitrogênio líquido. Em seguida foi adicionado ao material vegetal 4 mL de tampão fosfato de potássio refrigerado (0,1 M – pH 6,8). A solução extraída foi centrifugada a  $10000 \times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O extrato obtido foi separado em eppendorfs de 1,5 mL e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior determinação.

A quantificação de proteína solúvel foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Bradford (1976). Para obtenção do sistema de reação, a curva padrão de proteína solúvel foi elaborada utilizando 50  $\mu\text{L}$  de solução de

caseína (0, 20, 40, 60 e 100  $\mu\text{L}$ ) por 2,5  $\mu\text{L}$  de reativo de Bradford. A reação permaneceu em ativa por 15 minutos para posterior leitura de absorbância em espectrofotômetro a 595 nm, expressa em mg de proteína  $\text{g}^{-1}$  de matéria fresca. Após obtenção da equação com curva padrão, procedeu-se a leitura das amostras utilizando também 50  $\mu\text{L}$  do extrato e 2,5  $\mu\text{L}$  de Bradford.

A determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizada pelo método de Giannopolitis e Reis (1977) e leva em consideração a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do NBT (azul de cloreto de nitrotetrazólio). Para a quantificação da SOD foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de extrato bruto, a uma solução contendo 13 mM de metionina, 75  $\mu\text{L}$  de NBT, 100 nM de EDTA e 2  $\mu\text{M}$  de riboflavina em 3,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8. Após o preparo do meio, a reação ocorreu pela iluminação dos tubos, em recipiente fechado composto por lâmpadas fluorescentes, durante 5 minutos. Após o decorrer do tempo de incubação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 560 nm. Para o cálculo da atividade específica da enzima considera-se a porcentagem de inibição obtida, o volume da amostra e a concentração de proteína solúvel da amostra ( $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ).

Conforme Peixoto et al. (1999), a quantificação da catalase (CAT) foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 240 nm pelo monitoramento na variação de absorção de peróxido de hidrogênio. Para isso, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de extrato bruto em 950  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 suplementado com peróxido de hidrogênio de concentração final de 12,5 mM. A variação de absorção foi calculada em intervalo de 80 segundos, com atividade da enzima utilizando coeficiente molar de  $39,4 \text{ mM cm}^{-1}$ . A atividade da CAT foi expressa em  $\mu\text{Kat } \mu\text{g prot}^{-1}$  levando em consideração os valores de proteína solúvel da amostra.

A atividade da enzima peroxidase (POD) seguiu a metodologia proposta por Teisseire e Guy (2000), sendo o sistema de reação composto pela adição de 30  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, tampão fosfato de potássio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  - pH 6,5; pirogalol (1,2,3-benzenotriol)  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ; totalizando um volume de 1,0 mL. A reação foi conduzida durante 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a formação de purpurogalina foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 430 nm e seu coeficiente de extinção molar (2,5

mmol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) foi usado para calcular a atividade específica da enzima, expressa em µmol de purpurogalina min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

Para quantificação do conteúdo de prolina foram utilizados 100 mg do material vegetal, sendo homogeneizado em 2 mL de ácido sulfossalicílico a 3% (p/v). Após isso, foi realizada a centrifugação da solução a 6300 x g por 10 minutos. Para reação foi adicionado 75 µL do extrato a 35 µL de solução ácida de ninhidrina (1,25 g de ninhidrina, 30mL de ácido acético glacial e 20mL de ácido fosfórico 6M) sendo a mistura resultante incubada a 100°C durante 60 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo e o sobrenadante de cada amostra foi coletado para a obtenção da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm. As absorbâncias foram comparadas à curva-padrão de prolina (0 a 100µg mL<sup>-1</sup>) e os resultados expressos em µmol prolina g<sup>-1</sup> MF<sup>-1</sup> (BATES; WAKLREN; TEARE, 1973).

### 3.7.2 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

Para as análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a foi utilizado o equipamento Infra Red Gas Analyser–IRGA, modelo LI-6400, LI-COR, sistema aberto de fotossíntese com analisador de CO<sub>2</sub> e vapor d'água por radiação infravermelha.

As medidas foram realizadas após as aplicações de NO, aos 14, 21 e 28 DAT, ocorrendo sempre no período entre 8:00 e 11:30 h da manhã.

Para obtenção das trocas gasosas foram analisadas: a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (*A*, µmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), taxa de transpiração (*E*, mmol vapor d'água m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), condutância estomática (*gs*, mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e concentração interna de CO<sub>2</sub> na folha (*Ci*, µmolCO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>ar). As medidas foram calculadas com a utilização da equação geral de trocas gasosas de Von Caemmerer e Farquhar (1981) através do programa de análise de dados do equipamento.

As medidas de eficiência do uso de água (EUA, µmol CO<sub>2</sub> (mmol H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>) foram definidas através da relação entre assimilação de CO<sub>2</sub> e taxa de transpiração e a eficiência de carboxilação (*A/Ci*) foi obtida através da relação entre a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> e concentração interna de CO<sub>2</sub> na folha.

A fluorescência da clorofila a foi quantificada com a utilização de fluorômetro portátil de luz modulada (OptiSciences, modelo OS1-FL, Hudson, USA), a partir do qual foi obtida a fluorescência máxima (*Fm*), a fluorescência no estado de equilíbrio

dinâmico ( $F'$ ) e a fluorescência mínima ( $F0'$ ), permitindo-se calcular os seguintes parâmetros (BAKER, 2008): eficiência quântica potencial do FSII ( $Fv/Fm$ ): representando o rendimento quântico da fase fotoquímica da fotossíntese; coeficiente de extinção fotoquímico ( $qP$ ): refletindo o metabolismo fotossintético do carbono; coeficiente de extinção não-fotoquímico ( $NPQ$ ): representando todas as outras formas de dissipação de energia, principalmente, calor e taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), de acordo com Schreiber (1986).

### 3.7.3 Determinação de pigmentos (clorofilas *a*, *b* e carotenoides)

Os teores de pigmentos foram determinados pela utilização de disco foliar de 1,2 cm, retirados de folha completamente expandida, mantendo imerso por 24 h em 1 mL de dimetilformamida. Após esse período, foi realizada leitura de absorbância das amostras coletadas em espectrofotômetro UV-2600 e UV-2700 (UVProbe software) nos comprimentos de onda de 665,1; 649,1 e 480nm. O cálculo das concentrações das clorofilas *a*, *b* e carotenoides foi baseado em metodologia descrita por Wellburn (1994).

### 3.7.4 Variáveis biométricas

**Massa de matéria fresca total** – As plantas foram pesadas em uma balança analítica (0,05 g) com caule e folhas, cuja massa foi expressa em gramas.

**Diâmetro do caule** – obtido com auxílio de paquímetro digital, com unidade expressa em mm.

**Número de folhas** – realizado pela contagem de todas as folhas desenvolvidas na planta.

**Massa de matéria seca total** – para quantificação da massa seca, as plantas foram acondicionadas em saco de papel identificado e disposto em estufa com circulação forçada de ar para completa secagem do material até massa constante, sob temperatura de 65°C ( $\pm 1$ ). Após secagem completa do material, estas foram pesadas em balança digital de precisão (0,01g).

**Área foliar** – foi determinada pela passagem unitária das folhas em medidor de área foliar (LI-3100 C, Li-Cor, Inc., Lincoln, NE, EUA), calibrado para 0,1 mm<sup>2</sup>.

**Conteúdo relativo de água (CRA)** – foram coletados dois discos foliares em posições diferentes da planta (base, intermediária e ápice), totalizando vinte e quatro unidades experimentais, tomando-se o cuidado de não amostrar a nervura central. O CRA foi obtido a partir da fórmula  $CRA = (MF-MS) / (MT-MS) \times 100\%$ , segundo Barrs e Weatherley (1962) onde MF, MS e MT representam a massa fresca, massa seca e a massa total, respectivamente. Os discos coletados foram acondicionados em placas de Petri com tampa para pesagem da massa fresca; em seguida adicionou-se água destilada nas placas, sendo estas colocadas na geladeira por 24 h com a finalidade de obter a massa túrgida. Para a massa seca, os discos foram secados a 60°C por 72 h.

### 3.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados quanto à distribuição de normalidade dos dados e submetidos ao teste Ryan-Joine (similar ao Shapiro-Wilk) através do software MINITAB® 17. Em seguida os dados foram submetidos às análises de variância pelo teste F, e as médias dos fatores qualitativos (estresse salino) foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, enquanto os resultados dos fatores quantitativos (concentrações de NPS) foram submetidos à análise de regressão. As análises foram realizadas através do software SISVAR (FERREIRA, 2011).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Variáveis bioquímicas

De acordo com análise de variância houve efeito significativo da interação entre os fatores estudados para todas as variáveis bioquímicas nas três épocas de coletas, exceto para o teor de peróxido de hidrogênio e peroxidação de lipídios na terceira coleta, havendo resposta apenas para os fatores isolados (concentrações de NPS e estresse salino) ao nível de 1% de significância (Tabela 1).

**Tabela 1 – Resumo da análise de variância da peroxidação de lipídios (LIPO) (MDA x 10<sup>3</sup>, nmol g massa fresca<sup>-1</sup>), teor de peróxido de hidrogênio (µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> g massa fresca<sup>-1</sup>), atividade da superóxido dismutase (SOD, U x 10<sup>-3</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína), atividade da catalase (CAT, µKat µg<sup>-1</sup> de proteína), atividade da peroxidase (POD, µmol de purpurogalina min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) e conteúdo de prolina (nmol prolina mg MF<sup>-1</sup>) de plantas de alface cv. Vera, tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino, durante a primeira, segunda e terceira aplicação. Botucatu/SP, UNESP, 2019**

| Fontes de Variação            | GL | Primeira Coleta (11 DAT)      |                    |          |                    |          |         |
|-------------------------------|----|-------------------------------|--------------------|----------|--------------------|----------|---------|
|                               |    | Quadrado médio                |                    |          |                    |          |         |
|                               |    | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | LIPO               | SOD      | CAT                | POD      | PROLINA |
| Estresse salino (E)           | 1  | 256,29**                      | 276,12**           | 159,24** | 0,09 <sup>ns</sup> | 210,00** | 8,46**  |
| Conc. de NPS (C) <sup>1</sup> | 4  | 21,27**                       | 46,24**            | 31,54**  | 0,21**             | 48,45**  | 4,65**  |
| Interação E x C               | 1  | 2,91*                         | 18,03*             | 16,64**  | 0,28**             | 9,60*    | 1,11*   |
| CV (%)                        |    | 5,02                          | 13,17              | 10,90    | 13,26              | 9,50     | 11,42   |
| Estresse salino               |    | Teste de médias               |                    |          |                    |          |         |
| SEM (0,2 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 17,85 b                       | 16,71 b            | 16,12 b  | 1,61 a             | 16,28 b  | 5,00 b  |
| COM (3,5 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 22,91 a                       | 21,96 a            | 20,11 a  | 1,71 a             | 20,86 a  | 5,92 a  |
| Fontes de variação            | GL | Segunda Coleta (18 DAT)       |                    |          |                    |          |         |
|                               |    | Quadrado médio                |                    |          |                    |          |         |
|                               |    | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | LIPO               | SOD      | CAT                | POD      | PROLINA |
| Estresse salino (E)           | 1  | 68,21**                       | 40,12**            | 819,53** | 3,93**             | 243,22** | 2,70**  |
| Conc. de NPS (C) <sup>1</sup> | 4  | 19,28**                       | 14,59**            | 329,60** | 0,89**             | 49,66**  | 1,84**  |
| Interação E x C               | 4  | 21,03**                       | 5,19*              | 152,34*  | 0,20*              | 3,68*    | 0,30*   |
| CV (%)                        |    | 9,24                          | 9,85               | 17,01    | 15,12              | 4,10     | 9,47    |
| Estresse salino               |    | Teste de médias               |                    |          |                    |          |         |
| SEM (0,2 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 17,59 b                       | 12,67 b            | 32,66 b  | 1,43 b             | 29,65 a  | 3,19 b  |
| COM (3,5 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 20,20 a                       | 14,68 a            | 41,72 a  | 2,05 a             | 24,72 b  | 3,71 a  |
| Fontes de variação            | GL | Terceira Coleta (25 DAT)      |                    |          |                    |          |         |
|                               |    | Quadrado médio                |                    |          |                    |          |         |
|                               |    | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | LIPO               | SOD      | CAT                | POD      | PROLINA |
| Estresse salino (E)           | 1  | 143,48**                      | 77,28**            | 755,31** | 4,97**             | 209,81** | 5,68**  |
| Conc. de NPS (C) <sup>1</sup> | 4  | 19,48**                       | 14,07**            | 215,78** | 1,71**             | 162,72** | 3,46**  |
| Interação E x C               | 4  | 1,16 <sup>ns</sup>            | 3,29 <sup>ns</sup> | 23,39**  | 0,41**             | 52,38*   | 1,67*   |
| CV (%)                        |    | 6,18                          | 12,05              | 3,92     | 12,25              | 15,02    | 15,83   |
| Estresse salino               |    | Teste de médias               |                    |          |                    |          |         |
| SEM (0,2 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 15,62 b                       | 10,44 b            | 38,32 b  | 2,76 a             | 30,09 a  | 3,71 b  |
| COM (3,5 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 19,41 a                       | 13,21 a            | 47,01 a  | 2,05 b             | 25,52 b  | 4,46 a  |

<sup>1</sup> – Concentrações de nitroprussiato de sódio;

\*, \*\* e ns – significativos a 5 e 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente (Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p≤0,05)).

Ao analisar os valores médios obtidos verifica-se que a condição de estresse salino apresentou maior valor médio em relação à ausência do estresse para a maioria das variáveis analisadas, durante as três épocas de coleta, exceto para atividade da catalase na primeira coleta onde não houve diferença estatística, bem como, para atividade da enzima peroxidase na segunda e terceira coleta, sendo essa atividade superior em plantas isentas do estresse em relação às plantas estressadas (Tabela 1).

Observa-se ainda que os valores médios, independente do estresse, da peroxidação de lipídios (LIPO) e teor de  $H_2O_2$  foram reduzidos após cada aplicação do NPS, ocorrendo reduções de 37 e 40% para a variável LIPO entre a primeira e última coleta, na condição de sem e com estresse, respectivamente. Já para o teor de  $H_2O_2$  as reduções foram de 12 e 15%, respectivamente (Tabela 1).

Altos níveis salinos podem contribuir para o dano nas membranas (LIPO) através da intensidade do estresse oxidativo em condições salinas, levando ao extravasamento de eletrólitos devido à degradação da camada lipídica e, conseqüentemente, redução do crescimento das plantas (MUNNS, 2011).

No entanto, a participação do NO em mecanismos de defesas frente ao estresse salino já tem sido relatada, dependendo da planta, da espécie e grau do tratamento adotado, o que explicaria a redução dos danos ocasionados pelo estresse observados nesse trabalho (ZHAO et al., 2004; BEGARA-MORALES et al., 2014).

Para a variável SOD, verifica-se que na presença de estresse salino, plantas de alface apresentaram ganhos na atividade dessa enzima, independente das concentrações de NPS, de 25; 28 e 23% em relação às plantas isentas de estresse na primeira, segunda e terceira coleta, respectivamente (Tabela 1).

A enzima SOD é a primeira a atuar na defesa do sistema antioxidante, atuando na dismutação do ânion superóxido para formação de  $H_2O_2$ , dessa maneira minimiza os danos ocasionados pelas ERO através da quebra de radicais superóxidos que são gerados pelo estresse oxidativo (SHAFI et al., 2015).

De acordo com Talukdar (2013), a expressão da atividade da enzima SOD pode ocorrer em diversos compartimentos celulares a fim de reduzir os radicais livres produzidos durante o estresse salino.

No entanto, deve-se levar em consideração que podem existir diversas variações na atividade da SOD, dependendo da espécie, duração e intensidade do

estresse avaliado, podendo comprometer a atividade da enzima (SERRAJ et al., 2011).

A maior atividade da CAT em plantas estressadas pela alta salinidade observada nesse trabalho condiz com a redução nos níveis de  $H_2O_2$  durante a segunda, uma vez que essa enzima atua diretamente na desintoxicação celular através da quebra de moléculas de  $H_2O_2$  (Tabela 1).

A maior atividade da enzima CAT em função do estresse salino em plantas já é vista em diversos estudos (MADHANIA et al., 2006; JESUS et al., 2015; CARVALHO et al., 2016).

De acordo com Miller et al. (2010) o aumento na atividade da CAT sob condições de salinidade é justificado devido à necessidade de remoção do  $H_2O_2$  da célula vegetal, que se acumula a medida que o estresse oxidativo se intensifica, sendo o peróxido de hidrogênio gerado também através da maior atividade da SOD que é primeira linha de defesa do sistema antioxidante das plantas.

Contudo, em alguns estudos já foi verificado que a intensidade do estresse salino pode acarretar na redução da atividade da enzima antioxidante CAT, dependendo da espécie (MAIA et al., 2012) e do nível salino adotado (FREITAS et al., 2011), o que explica o menor valor médio na atividade dessa enzima na terceira coleta, em comparação às plantas não submetidas ao estresse salino.

Assim como a CAT, a peroxidase atua na remoção do  $H_2O_2$ , logo, o maior valor obtido sob condições salinas demonstra que a baixa atividade da CAT pode ter ativado as peroxidases para redução dos níveis das ERO no tecido vegetal, como visto na primeira coleta. Já para as demais coletas, os valores inferiores na atividade da POD podem ser conferidos pelo alto índice salino afetando a expressão da enzima (Tabela 1).

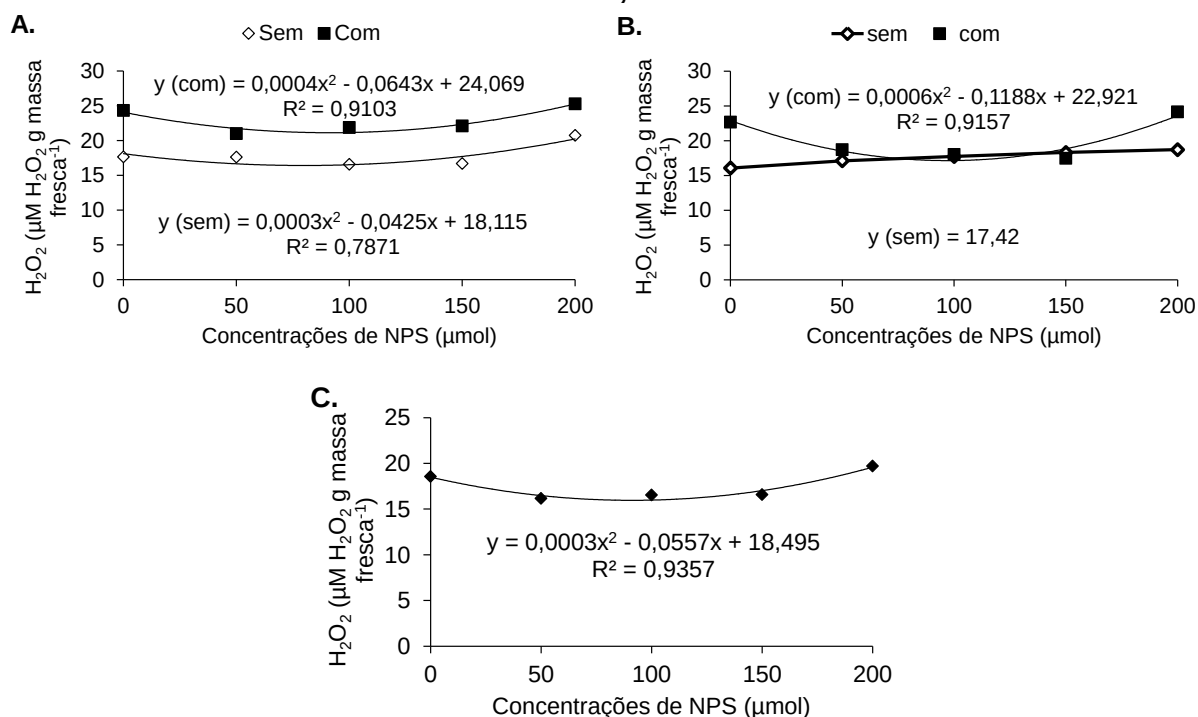
Para a variável prolina, os ganhos nos valores médios desse osmorregulador em plantas estressadas em comparação a plantas não estressadas foram de 18,4; 16,30 e 20,21% nas três coletas, respectivamente (Tabela 1).

O aumento no conteúdo de prolina no tecido vegetal é comumente observado sob condições de estresse salino (ASHRAF; McNEILLY, 2004; VERBRUGGEN; HERMANS, 2008; ASHRAF et al., 2011), atuando como osmorregulador de grande importância na conferência de tolerância à salinidade em plantas (JESUS et al., 2015).

Já foi observado que a concentração de prolina aumenta no tecido vegetal em condições de estresse salino como, por exemplo, em plantas de rúcula (JESUS et al., 2015), em plântulas de guandu (MONTEIRO et al., 2014) e em plantas de feijão (COELHO et al., 2017).

Ao analisar o efeito das concentrações de NPS sobre o teor de  $H_2O_2$  em plantas estressadas, tanto para a primeira (Figura 3A) como para a segunda coleta (Figura 3B), observa-se que houve comportamento quadrático em ambas as situações, ocorrendo redução nos níveis de  $H_2O_2$  com o aumento das concentrações de NPS.

**Figura 3 – Peroxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), durante a primeira (A), segunda (B) e terceira (C) aplicação de concentrações de nitroprussiato de sódio (NPS) em plantas de alface, na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



Na primeira coleta, as plantas submetidas ao estresse salino apresentaram menor concentração de  $H_2O_2$  em 80,37  $\mu\text{mol}$  de NPS (21,48  $\mu\text{M}$  de  $H_2O_2$  g massa fresca<sup>-1</sup>), 11% a menos que as plantas não tratadas. Já para a segunda coleta, o maior decréscimo dos níveis de  $H_2O_2$  foi observado em 99  $\mu\text{mol}$  de NPS (17,04  $\mu\text{M}$  de  $H_2O_2$  g massa fresca<sup>-1</sup>), correspondente a 25,60% de redução em comparação às plantas estressadas ausente da aplicação de óxido nítrico (Figura 3A e 3B).

Ainda na Figura 3A, a ausência de estresse salino em plantas de alface durante a primeira coleta demonstrou resultado semelhante às plantas estressadas, ocorrendo redução dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com o aumento das concentrações de NPS, com ponto de mínima em  $70,83 \mu\text{mol}$  de NPS, correspondente ao valor médio de  $16,61 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  g massa fresca<sup>-1</sup>. Esse valor representa 8,28% a menos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no tecido vegetal em comparação as plantas controle.

Na segunda coleta, não houve efeito das concentrações de NPS estudadas sobre a variável  $\text{H}_2\text{O}_2$  em plantas de alface isentas de estresse salino, resultando em valor médio de  $17,42 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  g massa fresca<sup>-1</sup> (Figura 3B).

Na última aplicação das concentrações de NPS, os resultados obtidos para a terceira coleta também mostraram redução na concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , independente da condição de estresse, cujo ajuste da curva se deu ao comportamento quadrático, com o valor mínimo do nível de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na concentração de  $92,83 \mu\text{mol}$  de NPS correspondendo a  $15,91 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  g massa fresca<sup>-1</sup>, com redução de 14% dessa molécula em comparação às plantas não tratadas (Figura 3C).

Os resultados obtidos mostram que a aplicação de óxido nítrico pode reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio em plantas submetidas ao estresse salino, evidenciando papel protetor dessa molécula.

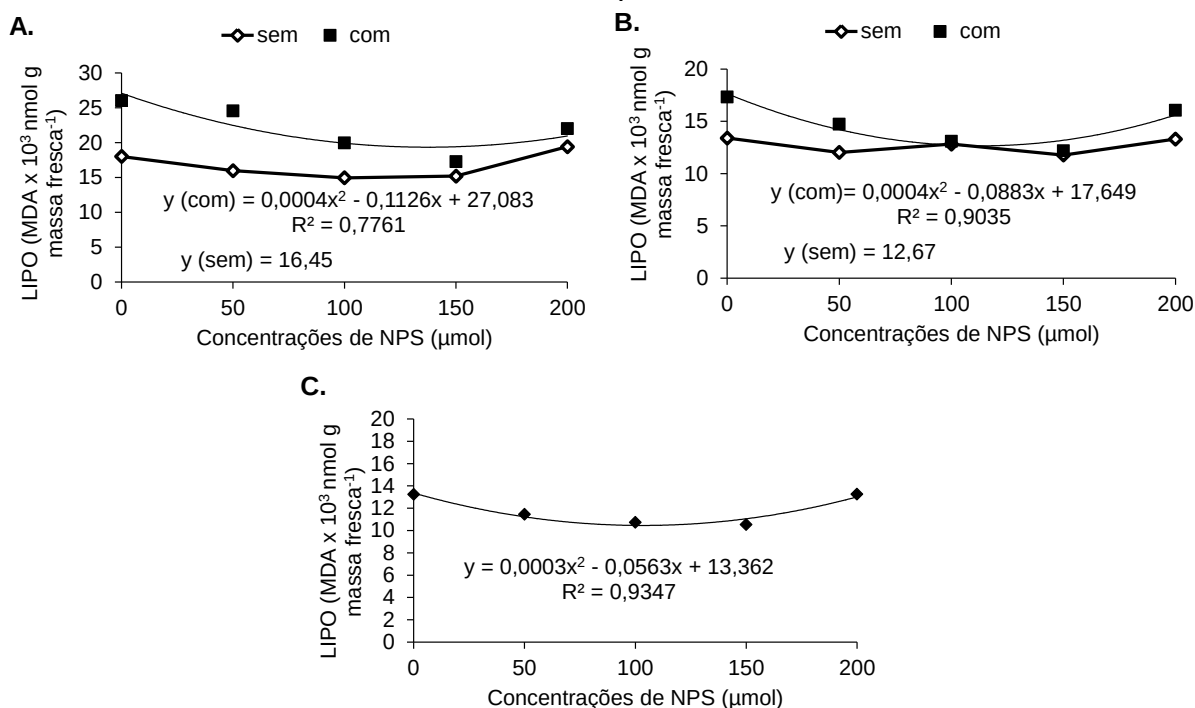
Isso pode ser justificado devido à ação direta do NO sobre as ERO, em função da redução destas espécies, seja pela indução na atividade de enzimas antioxidantes ou pela interação dessa molécula (NO) com o ânion superóxido, resultando na formação do peroxinitrito, que pode ser rapidamente decomposto em produtos estáveis e reduzir os danos causados pelas ERO (GROß; DURNER; GAUPELS, 2013; SHEOKAND; KUMARI, 2015).

Além disso, sabe-se que a presença de peróxido de hidrogênio é inevitável em níveis elevados do ânion superóxido. Logo, a aplicação de NO pode atuar diretamente sobre esse radical livre ( $\text{O}_2$ ) de alta reatividade, reduzindo os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na célula vegetal (ARORA et al., 2016).

Na Figura 4A e 4B, é apresentada a resposta da cultura ao efeito das concentrações de NPS para a variável LIPO, onde não houve efeito do fator concentrações em plantas não estressadas, tanto para a primeira quanto para a segunda coleta, apresentando valores médios de 16,45 e 12,67 de MDA  $\times 10^3$ , nmol g massa fresca<sup>-1</sup>, respectivamente.

Já nas plantas condicionadas ao estresse salino nota-se que os resultados foram semelhantes na primeira e segunda coleta, apresentando redução dessa variável com o aumento das concentrações de NPS, cujos valores mínimos de LIPO foram obtidos nas concentrações de 140,75 e 110,38  $\mu\text{mol}$  de NPS, nas quais se obteve 19,16 e 12,77  $\text{MDA} \times 10^3 \text{ nmol g massa fresca}^{-1}$ , apresentando redução de 29 e 28% de peroxidação lipídica, na primeira e segunda coleta, respectivamente, em relação às plantas controle (Figura 4A e 4B).

**Figura 4 – Peroxidação de lipídeos (LIPO), durante a primeira (A), segunda (B) e terceira (C) aplicação de concentrações de nitroprussiato de sódio (NPS) em plantas de alface, na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



Na terceira coleta verificou-se que o efeito das concentrações de NPS sobre a variável LIPO, independe da condição de estresse salino, onde o aumento dessas levou à redução da LIPO, com ajuste da curva ao comportamento quadrático, apresentando valor mínimo de 10,72  $\text{MDA} \times 10^3 \text{ nmol g massa fresca}^{-1}$ , na concentração de 93,8  $\mu\text{mol}$  de NPS (Figura 4C).

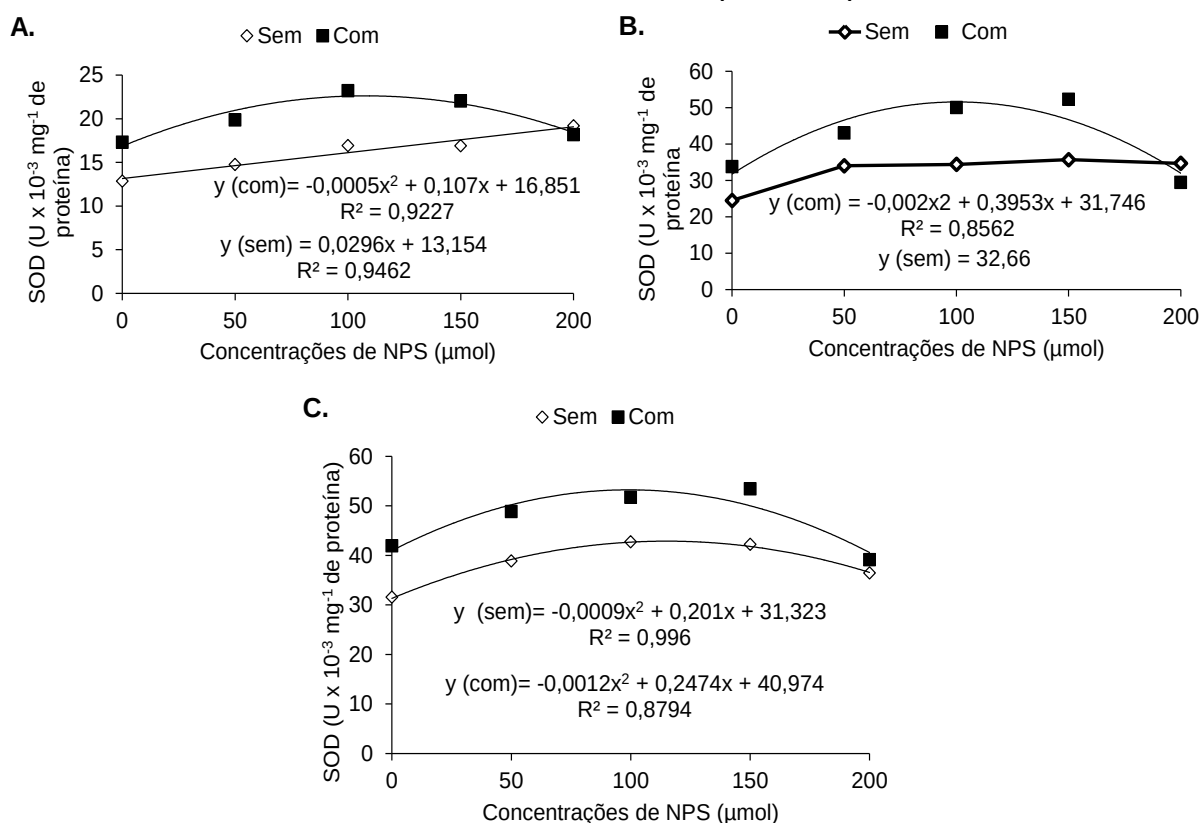
Por meio dos resultados obtidos, é possível salientar que aplicação do óxido nítrico em situações de estresse oxidativo, exerceu sinalização ou atividade antioxidante, aumentando a atividade das enzimas para extinguir as ERO através da redução do peróxido de hidrogênio e como consequência, levou à diminuição dos

níveis de peroxidação de lipídios, podendo assim, conferir tolerância às plantas (HASANUZZAMAN et al., 2018).

Resultados semelhantes sobre a redução no nível de peroxidação lipídica com uso de óxido nítrico já foi observado em plantas de alface (CAMPOS et al., 2019), mostarda (KHAN et al., 2012) e tomate (MANAI et al., 2014) submetidas ao estresse salino.

Para a atividade da enzima SOD, foram observadas respostas significativas às concentrações de NPS, em todas as épocas analisadas, ocorrendo aumento na expressão da enzima em função das concentrações adotadas para a condição de estresse salino (Figura 5).

**Figura 5 – Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), durante a primeira (A), segunda (B) e terceira (C) aplicação de concentrações de nitroprussiato de sódio (NPS) em plantas de alface, na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



Verifica-se que a máxima atividade da enzima SOD nas plantas estressadas ocorreu nas concentrações de 107 ( $22,57 U \times 10^{-3} \text{ mg}^{-1} \text{ de proteína}$ ), 98,82 ( $51,28 U \times 10^{-3} \text{ mg}^{-1} \text{ de proteína}$ ) e 103,08 ( $53,72 U \times 10^{-3} \text{ mg}^{-1} \text{ de proteína}$ )  $\mu\text{mol}$  de NPS, para os três períodos de coleta, respectivamente (Figura 5A, 5B e 5C).

Os valores médios obtidos na presença do estresse, ao ajuste das curvas, corresponderam a 33,9; 61,5 e 31,1% de incremento na atividade da SOD para a primeira, segunda e terceira coletas, respectivamente, em comparação às plantas não tratadas com NO (Figura 5A, 5B e 5C).

O aumento na atividade da superóxido dismutase pode estar ligado diretamente as maiores concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em plantas condicionadas ao estresse salino, conforme observado nesse trabalho (Tabela 1), uma vez que, essa enzima atua na quebra do ânion superóxido para minimização do estresse oxidativo e, conseqüentemente, resulta na formação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Em relação às plantas de alface isentas do estresse salino, verificou-se resposta linear na atividade da SOD da primeira coleta, em que o aumento das concentrações de NPS resultou no aumento da atividade dessa enzima, com maior valor médio obtido em 200  $\mu\text{mol}$  de NPS ( $19,07 \text{ U} \times 10^{-3} \text{ mg}^{-1}$  de proteína) (Figura 5A). Entretanto, na segunda coleta não foi observado efeito das concentrações de NPS em plantas não estressadas, cujo valor médio foi de  $32,66 \times 10^{-3} \text{ mg}^{-1}$  de proteína (Figura 5B).

Já para a última coleta, a máxima atividade da SOD, em plantas não cultivadas sob estresse salino, foi observada na concentração de 111,67  $\mu\text{mol}$  de NPS ( $42,54 \text{ U} \times 10^{-3} \text{ mg}^{-1}$  de proteína) elevando a expressão da enzima em 35,8% em relação as plantas controle (Figura 5C).

Por atuar diretamente contra a ERO de diversas maneiras, foi visto que a aplicação de NO induz o aumento da atividade da enzima SOD em plantas de tomate (MANAI et al., 2014), mudas de pepino (SHI et al., 2007) e em raízes de girassol (DHARA; SATISH, 2015), sob condições de estresse salino, assim como observado no presente trabalho.

A primeira aplicação das diferentes concentrações de NPS resultou na diminuição da atividade da catalase na análise da primeira coleta para plantas estressadas, cujo comportamento da curva se ajustou à forma quadrática, apresentando menor atividade dessa enzima na dose de 117,5  $\mu\text{mol}$  de NPS ( $1,36 \mu\text{Kat} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína), aumentando a atividade da enzima catalase a partir desta (Figura 6A).

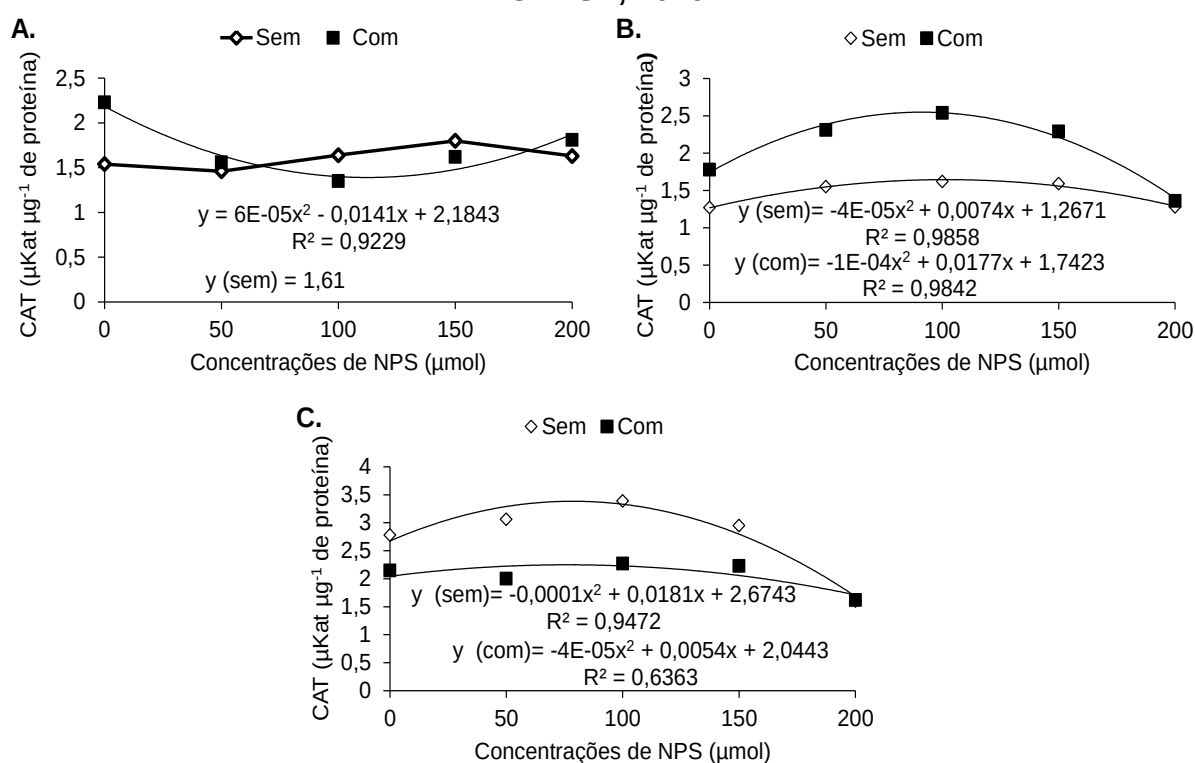
Essa redução pode estar atrelada ao início do desenvolvimento da planta em função da exposição salina, ausência de substrato para enzima ou possivelmente



alguma fitotoxicidade ocasionada pela aplicação de NPS, gerando redução da atividade enzimática.

Na ausência do estresse salino não foi verificado efeito das concentrações de NPS aplicadas sobre a atividade da enzima CAT, correspondendo ao valor médio de  $1,61 \mu\text{Kat } \mu\text{g}^{-1}$  de proteína (Figura 6A).

**Figura 6 – Atividade da enzima catalase (CAT), durante a primeira (A), segunda (B) e terceira (C) aplicação de concentrações de nitroprussiato de sódio (NPS) em plantas de alface, na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



Na segunda coleta, observa-se que houve acréscimo na atividade da enzima CAT em plantas submetidas ao estresse salino de acordo com o aumento das concentrações do produto, onde o melhor ajuste dos resultados foi representado pela equação quadrática, resultando na máxima atividade da enzima na concentração de  $88,5 \mu\text{mol}$  de NPS ( $2,53 \mu\text{Kat } \mu\text{g}^{-1}$  de proteína), o que representa aproximadamente 45,4% a mais da atividade em comparação às plantas estressadas que não receberam o produto (Figura 6B).

Ainda na Figura 6B, verifica-se que na ausência de estresse salino, as plantas de alface mostraram aumento na atividade dessa enzima, assim como em plantas estressadas, com o incremento das concentrações de NPS. A curva foi

ajustada à equação quadrática, exibindo maior atividade da enzima na concentração de 92,5  $\mu\text{mol}$  de NPS (1,61  $\mu\text{Kat } \mu\text{g}^{-1}$  de proteína), com ganho de 27,7% em comparação às plantas controle.

Resultados semelhantes com os obtidos nesse trabalho também foi constatado por Campos et al. (2019), trabalhando com plântulas de alface tratadas com NPS submetidas ao estresse salino de curta duração, onde observaram incremento na atividade da enzima catalase durante os períodos de 12 e 24h de estresse na presença de NO.

Em diversos estudos já foi evidenciado que a presença de óxido nítrico pode influenciar na atividade das enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e inúmeras peroxidases, através da mediação do hormônio vegetal ABA, uma vez que esse hormônio desencadeia diversos mecanismos de defesa em plantas condicionadas aos estresses abióticos (SHI et al., 2014).

Assim como observado na segunda coleta, a atividade da CAT apresentou aumento com o incremento das concentrações tanto na ausência como na presença de estresse salino para a análise da terceira coleta, sendo mais evidenciado em plantas não estressadas (Figura 6C).

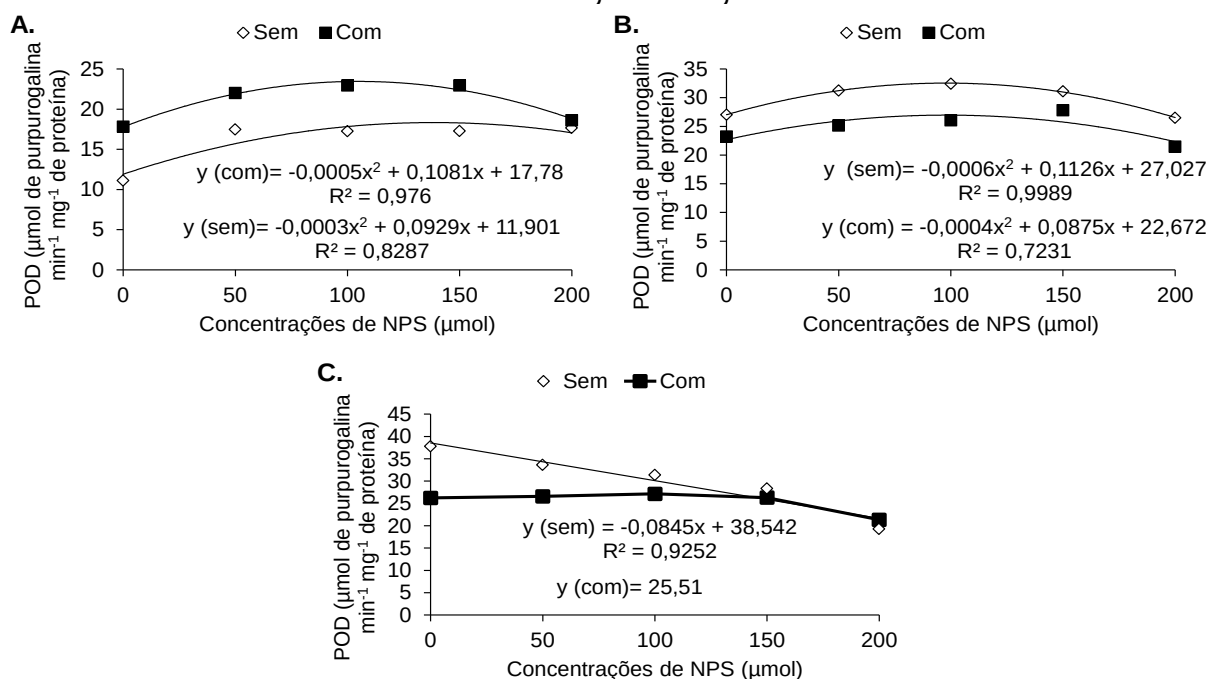
Na ausência do estresse a maior atividade da enzima se deu em 90,5  $\mu\text{mol}$  de NPS (3,49 61  $\mu\text{Kat } \mu\text{g}^{-1}$  de proteína), enquanto que na presença de estresse salino a maior expressão da atividade da CAT nessas plantas foi obtida em 67,5  $\mu\text{mol}$  de NPS (2,23  $\mu\text{Kat } \mu\text{g}^{-1}$  de proteína) com ganho de 9,3% em relação às plantas não tratadas (Figura 6C).

Embora sejam inúmeros os benefícios obtidos pela ação do NO, deve-se salientar que altas concentrações dessa molécula no tecido vegetal podem provocar efeito inverso e ocasionar estresse na planta, interferindo na atividade das enzimas (MURGIA et al., 2004). Dessa maneira, o tempo prolongado de exposição ao estresse salino e, possivelmente, o acúmulo de NO ao longo das aplicações podem ter acarretado alterações na atividade da enzima CAT, para última coleta, em plantas condicionadas ao estresse salino.

Houve resposta significativa das concentrações de NPS sobre a atividade da enzima peroxidase, ocorrendo aumento da mesma à medida que houve incremento das concentrações em ambas as situações de com e sem estresse (Figura 7A e 7B).

A maior atividade da enzima POD nas plantas estressadas foi observada na concentração de 108,1  $\mu\text{mol}$  de NPS (23,62  $\mu\text{mol}$  de purpurogalina  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína), enquanto que na ausência de estresse salino essa máxima atividade ocorreu na concentração de 154,83  $\mu\text{mol}$  de NPS (19,09  $\mu\text{mol}$  de purpurogalina  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína), expressando aumentos na atividade de 32,8 e 60,4% em comparação às plantas não tratadas, respectivamente (Figura 7A).

**Figura 7 – Atividade da enzima peroxidase (POD), durante a primeira (A), segunda (B) e terceira (C) aplicação de concentrações de nitroprussiato de sódio (NPS) em plantas de alface, na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



Para a segunda coleta, na condição de estresse salino, a atividade máxima da enzima se deu na concentração de 109,38  $\mu\text{mol}$  de NPS, com ganho de 21% a mais que o alcançado na menor concentração (0  $\mu\text{mol}$  de NPS). Já nas plantas isentas de estresse salino, a maior expressão da POD foi obtida na concentração de 93,83  $\mu\text{mol}$  de NPS, com 19,5% a mais que nas plantas controle (Figura 7B).

Para a última coleta, as concentrações de NPS estudadas no presente trabalho não apresentaram efeito significativo na atividade da POD de plantas de alface submetidas ao estresse salino, resultando em valor médio de 25,51  $\mu\text{mol}$  de purpurogalina  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína; no entanto, o sistema de defesa antioxidante para a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  continuou ativo pela ação da enzima CAT (Figura 7C).

Na ausência de estresse salino, a POD apresentou decréscimo na sua atividade com o aumento das concentrações de NPS durante a última aplicação do produto, ocorrendo ajuste dos valores médios por meio da equação linear decrescente, onde a maior concentração (200  $\mu\text{mol}$  de NPS) resultou na menor atividade da enzima, com redução de 43,8% em relação às plantas que não receberam o produto (Figura 7C).

Assim como observado para as outras enzimas que compõe o sistema de defesa antioxidante das plantas, o incremento na atividade da peroxidase pode ser influenciada pelos níveis de NO presente nas células vegetais, sobretudo em condições de estresse salino, sendo esse comportamento observado em diversas culturas como no tomateiro (MANAI et al., 2014), mostarda (KHAN et al., 2012); algodoeiro (DONG et al., 2014) e grão-de-bico (AHMAD et al., 2016).

Dessa maneira, nota-se que a suplementação de NO pode contribuir para a atenuação do estresse, elevando a atividade da enzima através da sua sinalização e proteção diante do estresse abiótico.

Contudo, é fundamental compreender a concentração exata de NO exógeno a ser aplicado, levando em conta a concentração preexistente na planta, pois, altas concentrações dessa molécula podem ter efeito contrário e agravar o quadro do estresse quando em grande disponibilidade no meio, resultando na inibição do sistema antioxidante devido à toxidez (GROß; DURNER; GAUPELS, 2013), o que explicaria situações de baixas atividades enzimáticas em plantas estressadas.

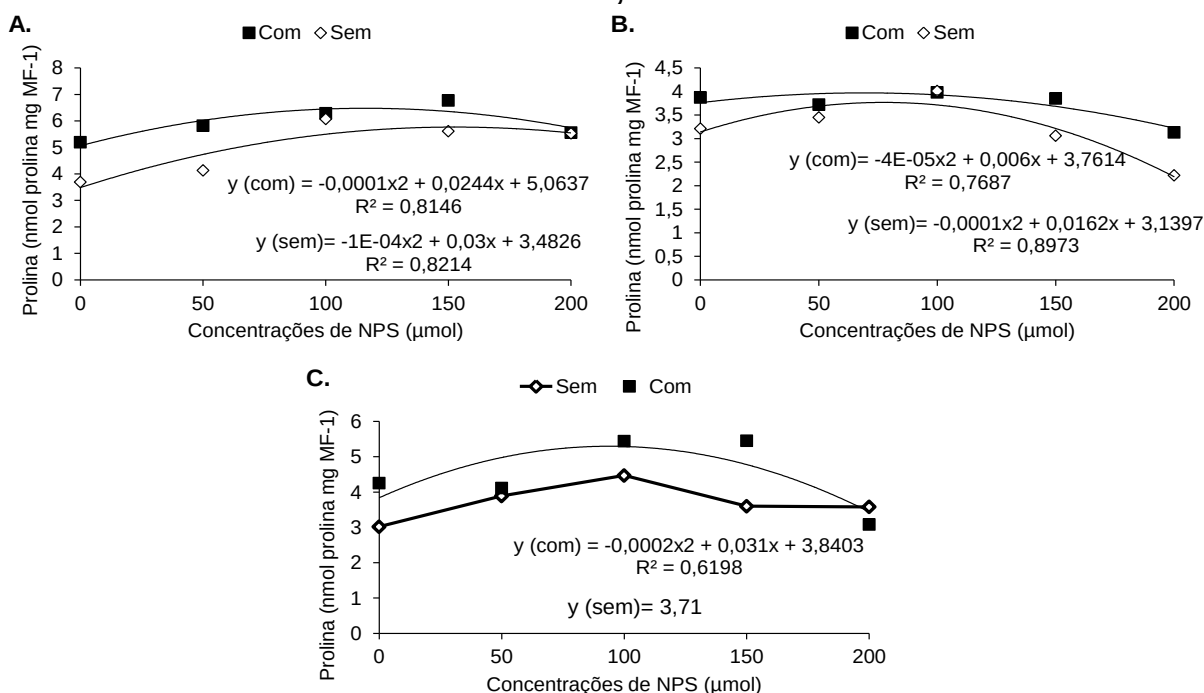
Quanto ao efeito das concentrações de NPS sobre a concentração de prolina obtida na primeira coleta, observa-se que tanto na presença como na ausência do estresse salino as plantas de alface apresentaram resposta quadrática aos resultados encontrados, onde o aumento das concentrações de NPS elevou a concentração de prolina no tecido foliar (Figura 8A).

Nas plantas estressadas, a máxima concentração de prolina foi obtida em 122  $\mu\text{mol}$  de NPS concentrando aproximadamente 29,4% a mais desse aminoácido em relação às plantas tratadas. Já em plantas isentas do estresse, a máxima concentração do aminoácido prolina foi encontrado em 150  $\mu\text{mol}$  de NPS, sendo exatamente a concentração trabalhada nesse estudo, cuja concentração de prolina foi de 5,73 nmol prolina mg MF<sup>-1</sup> (Figura 8A).

Na segunda coleta, a concentração de prolina também aumentou com o incremento das concentrações de NPS. Em relação às plantas estressadas, o ponto

de máximo acúmulo de prolina foi encontrado em 75  $\mu\text{mol}$  de NPS (3,99 nmol prolina  $\text{mg MF}^{-1}$ ). Já na ausência do estresse, as plantas de alface apresentaram maior concentração de prolina na dose de 81  $\mu\text{mol}$  de NPS (3,80 nmol prolina  $\text{mg MF}^{-1}$ ) (Figura 8B).

**Figura 8 – Concentração de prolina, durante a primeira (A), segunda (B) e terceira (C) aplicação de concentrações de nitroprussiato de sódio (NPS) em plantas de alface, na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



Para a terceira coleta analisada, a concentração de prolina não foi afetada pelas concentrações de NPS aplicadas em plantas isentas de estresse salino com valor médio de 3,71 nmol prolina  $\text{mg MF}^{-1}$ ; por outro lado, em plantas estressadas a concentração desse aminoácido foi acrescida de acordo com o fornecimento de óxido nítrico. Logo, observa-se que a máxima concentração de prolina encontrada em plantas estressadas ao ajuste da curva se deu na concentração de 39  $\mu\text{mol}$  de NPS, correspondendo a 4,74 nmol prolina  $\text{mg MF}^{-1}$  (Figura 8C).

Igualmente ao óxido nítrico, o acúmulo de prolina está relacionado a diversas respostas adaptativas das plantas sob diferentes estresses ambientais, como déficit hídrico (PENG et al., 1996), alta salinidade (KHEDR et al., 2003), metais pesados (SRIPORNADULSIL et al., 2002) e congelamento (ZHAO et al., 2004).

A síntese desse aminoácido ocorre pela ativação da enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS), enquanto para sua degradação atua a enzima prolina desidrogenase (PDH) (PLANCHET et al., 2014). De forma geral, a presença de óxido nítrico e prolina podem ocorrer em paralelo ou de forma colaborativa, onde o óxido nítrico atua como sinalizador do estresse e a prolina como um regulador osmótico frente ao estresse salino (SU et al., 2018).

Dessa forma, verifica-se que a aplicação de óxido nítrico em plantas de alface submetidas ao estresse salino eleva a concentração do aminoácido prolina, estabilizando os danos causados pelo estresse ao mitigar os prejuízos da alta salinidade.

#### **4.2 Trocas Gasosas e fluorescência da clorofila a**

De acordo com análise de variância apresentada na Tabela 2, houve interação significativa para as variáveis concentração interna de  $\text{CO}_2$  na folha ( $C_i$ ) e para a relação de eficiência de carboxilação ( $A/C_i$ ) aos 14 DAT ao nível de 5% de probabilidade. Aos 21 DAT, a interação significativa entre os fatores (concentrações de NPS e estresse) foi observada apenas na  $C_i$  e eficiência do uso da água ( $EUA$ ) ao nível de 1% de probabilidade. Para a última análise de trocas gasosas houve efeito significativo da interação entre os fatores estudados para a maioria das variáveis analisadas, ao nível de 1% de probabilidade, exceto para as variáveis  $E$  e  $EUA$  ( $p \leq 0,05$ ).

De acordo com os valores médios obtidos na primeira análise de trocas gasosas, observa-se que independente da concentração de NPS aplicada, a condição de estresse salino reduziu as variáveis taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$ , condutância estomática, transpiração, eficiência do uso da água, cujas reduções foram de 23,37; 27; 11 e 17,33% em comparação às plantas não estressadas, respectivamente (Tabela 2).

Assim como observado na primeira avaliação, a condição de estresse salino também provocou redução as variáveis  $A$ ,  $g_s$ , e  $E$  aos 21 DAT, cujas perdas foram de 10,3; 31,5 e 20,12%, respectivamente. Para a variável  $A/C_i$  não houve diferença estatística em relação ao estresse salino (Tabela 2).

Ainda na Tabela 2, verifica-se que a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> continuou sendo afetada negativamente pelo estresse aos 28 DAT, havendo redução desta variável de 16,36% em comparação as plantas não condicionadas ao estresse.

**Tabela 2 – Resumo da análise de variância da taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); condutância estomática (gs,  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), concentração interna de CO<sub>2</sub> na folha (Ci,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), taxa de transpiração (E,  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), eficiência do uso da água (A/E,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ) e eficiência de carboxilação (A/Ci) de plantas de alface cv. Vera, tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino, durante a primeira aplicação. Botucatu/SP, UNESP, 2019**

| Fontes de Variação            | GL | Primeira avaliação (14 DAT) |                      |                       |                    |                    |                       |
|-------------------------------|----|-----------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
|                               |    | Quadrado médio              |                      |                       |                    |                    |                       |
|                               |    | A                           | gs                   | Ci                    | E                  | EUA                | A/Ci                  |
| Estresse salino (E)           | 1  | 86,33**                     | 0,0465**             | 8748,87*              | 5,03*              | 1,28**             | 0,0039**              |
| Conc. de NPS (C) <sup>1</sup> | 4  | 5,28 <sup>ns</sup>          | 0,0024 <sup>ns</sup> | 2722,15 <sup>ns</sup> | 3,42*              | 0,21 <sup>ns</sup> | 0,0005 <sup>ns</sup>  |
| Interação E x C               | 1  | 2,43 <sup>ns</sup>          | 0,0034 <sup>ns</sup> | 4104,12*              | 1,07 <sup>ns</sup> | 0,14 <sup>ns</sup> | 0,0006*               |
| CV (%)                        |    | 15,48                       | 18,53                | 12,80                 | 15,66              | 16,01              | 35,32                 |
| Estresse salino               |    | Teste de médias             |                      |                       |                    |                    |                       |
| SEM (0,2 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 12,58 a                     | 0,26 a               | 273,88 b              | 6,46 a             | 2,02 a             | 0,051 a               |
| COM (3,5 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 9,64 b                      | 0,19 b               | 303,46 a              | 5,75 b             | 1,67 b             | 0,032 b               |
| Fontes de variação            | GL | Segunda avaliação (21 DAT)  |                      |                       |                    |                    |                       |
|                               |    | Quadrado médio              |                      |                       |                    |                    |                       |
|                               |    | A                           | gs                   | Ci                    | E                  | EUA                | A/Ci                  |
| Estresse salino (E)           | 1  | 9,73**                      | 0,0271**             | 3185,60**             | 4,23**             | 0,82*              | 0,00001 <sup>ns</sup> |
| Conc. de NPS (C) <sup>1</sup> | 4  | 11,64**                     | 0,0024**             | 397,68 <sup>ns</sup>  | 0,92**             | 0,15 <sup>ns</sup> | 0,00017**             |
| Interação E x C               | 4  | 1,60 <sup>ns</sup>          | 0,0005 <sup>ns</sup> | 621,76**              | 0,04 <sup>ns</sup> | 0,55**             | 0,00004 <sup>ns</sup> |
| CV (%)                        |    | 12,37                       | 14,29                | 4,16                  | 15,72              | 11,47              | 13,83                 |
| Estresse salino               |    | Teste de médias             |                      |                       |                    |                    |                       |
| SEM (0,2 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 9,43 a                      | 0,19 a               | 301,24 a              | 3,23 a             | 2,98 b             | 0,03 a                |
| COM (3,5 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 8,45 b                      | 0,13 b               | 283,39 b              | 2,58 b             | 3,27 a             | 0,03 a                |
| Fontes de variação            | GL | Terceira avaliação (28 DAT) |                      |                       |                    |                    |                       |
|                               |    | Quadrado médio              |                      |                       |                    |                    |                       |
|                               |    | A                           | gs                   | Ci                    | E                  | EUA                | A/Ci                  |
| Estresse salino (E)           | 1  | 46,29**                     | 0,0462**             | 6521,46**             | 14,81**            | 0,76**             | 0,00014**             |
| Conc. de NPS (C) <sup>1</sup> | 4  | 36,98**                     | 0,0130**             | 3299,54**             | 6,90**             | 0,95**             | 0,00053**             |
| Interação E x C               | 4  | 1,17 <sup>ns</sup>          | 0,0043**             | 5328,74**             | 0,56*              | 0,55*              | 0,00026**             |
| CV (%)                        |    | 6,71                        | 9,22                 | 3,93                  | 9,97               | 5,72               | 7,70                  |
| Estresse salino               |    | Teste de médias             |                      |                       |                    |                    |                       |
| SEM (0,2 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 13,14 a                     | 0,19 a               | 257,36 a              | 4,82 a             | 2,85 b             | 0,051 a               |
| COM (3,5 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 10,99 b                     | 0,12 b               | 231,82 b              | 3,61 b             | 3,13 a             | 0,048 b               |

<sup>1</sup> – Concentrações de nitroprussiato de sódio;

\*, \*\* e ns – significativos a 5 e 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente (Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p < 0,05)).

O impacto do estresse salino pode afetar drasticamente a assimilação de CO<sub>2</sub> em plantas estressadas, devido ao desequilíbrio osmótico e iônico resultante do estresse. Essa condição adversa resultará no fechamento estomático e toxicidade celular (ROY; NEGRÃO; TESTER, 2014), o que implicará em maior resistência da difusão de CO<sub>2</sub> para o mesófilo foliar e, conseqüentemente, numa menor taxa de metabolismo fotossintético (SOUTO FILHO et al., 2014).

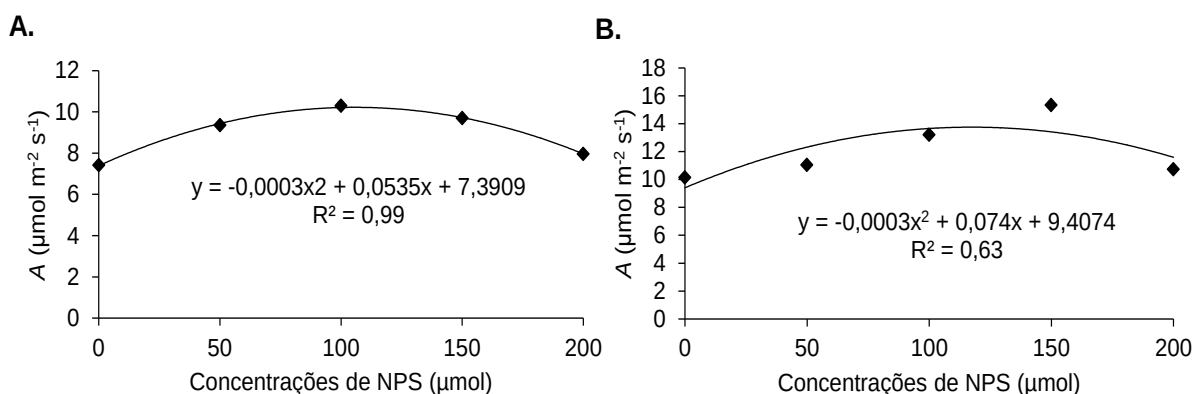
Em meio a isso, quando expostas a altas concentrações de sais, as plantas podem apresentar menor condutância estomática, menor concentração interna de  $\text{CO}_2$  e menor assimilação deste, como estratégia da redução da perda de água excessiva por transpiração em função do déficit hídrico gerado pelo efeito osmótico da salinidade (CAMPOS et al., 2019).

Para que ocorra adaptação dessas plantas sob condições de estresse salino, o fechamento parcial dos estômatos é uma das primeiras respostas da planta ao estresse hídrico, sendo induzido através das concentrações de ácido abscísico presente no meio, podendo atuar em conjunto com NO para regulação das células guardas (FAHAD et al., 2015).

Contudo, não foi verificada influência da aplicação de NPS sobre a eficiência do uso de água na primeira aplicação, independente do estresse, embora as plantas irrigadas com água de maior salinidade ( $3,5 \text{ dS m}^{-1}$ ) submetidas tenham apresentado menor taxa de transpiração em relação às plantas isentas de estresse salino.

A variável A foi afetada positivamente pela aplicação de NPS de forma semelhante para as duas condições de tratamento (sem e com estresse), ocorrendo aumento dessa variável medida que houve aumento das concentrações, apresentando comportamento quadrático, com valor máximo de assimilação de  $\text{CO}_2$  nas concentrações de 89,16 e 123,33  $\mu\text{mol}$  de NPS, aos 21 e 28 DAT, com ganho 32,2 e 48,6% em comparação às plantas controle, respectivamente (Figura 9A e 9B).

**Figura 9 – Taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  (A) aos 21 DAT (A) aos 28 DAT (B) em plantas de alface tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**

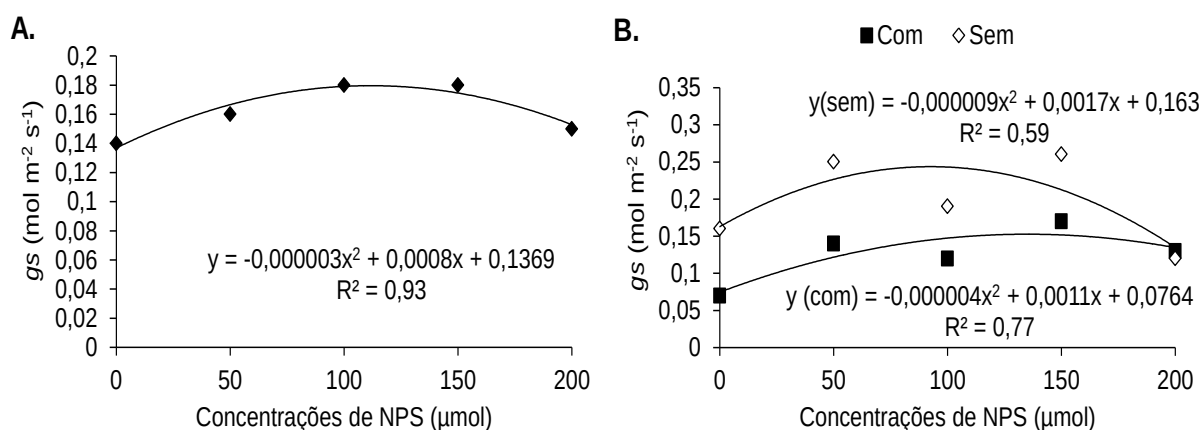




Segundo Fatma e Khan (2014), o NO pode estimular a atividade da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e, assim, incrementar ganhos na taxa fotossintética, conforme observado no presente trabalho.

Em relação à condutância estomática, a aplicação do NPS, independente do estresse, resultou no aumento dessa variável onde o melhor ajuste da curva se deu através da regressão polinomial de segundo grau, com ponto de máxima  $g_s$  em 133,33  $\mu\text{mol}$  de NPS ( $0,19 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), 46,1% a mais que o valor médio obtido em plantas não tratadas com o NPS (Figura 10A).

**Figura 10 – Condutância estomática ( $g_s$ ) aos 21 DAT (A) aos 28 DAT (B) em plantas de alface tratadas com diferentes concentrações de NPS, na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



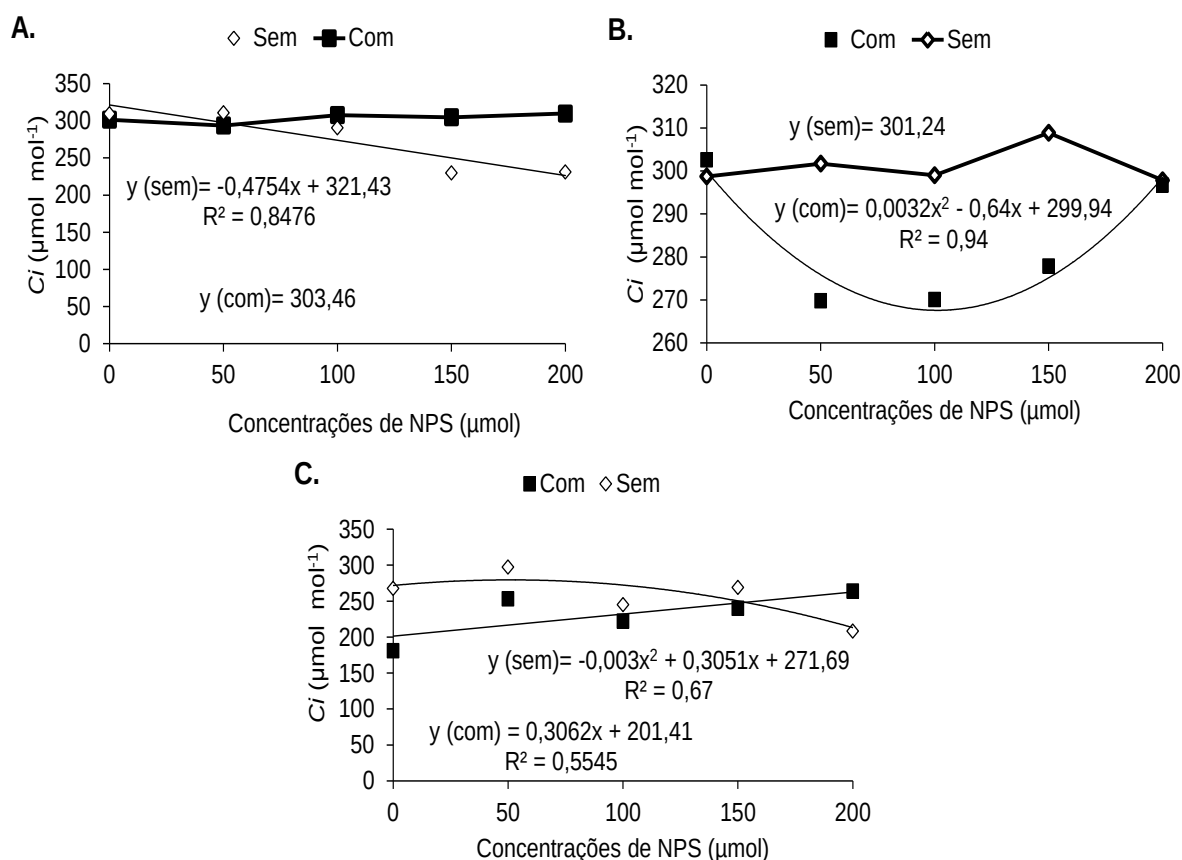
Na Figura 10B, nota-se que a condutância estomática aumentou com o incremento das concentrações de NPS, tanto na ausência quanto na presença do estresse salino. Na ausência de estresse salino, o maior valor foi obtido na concentração de 94,44  $\mu\text{mol}$  ( $0,24 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Para as plantas submetidas ao estresse salino, o pico de  $g_s$  ocorreu na concentração de 137,5  $\mu\text{mol}$  de NPS, aumentando a condutância estomática dessas plantas em 87,5% em comparação às plantas que não receberam NPS.

Tal comportamento ocorreu porque a presença de NO no tecido vegetal, provavelmente, inibe a síntese de ABA ao promover a nitrosilação e inativar a cinase OST1, sendo essa proteína fundamental para regulação dos estômatos, o que permitiria maior fornecimento de  $\text{CO}_2$  no mesofilo foliar para ocorrência da

fotossíntese e dessa forma manter ativo os processos voltados ao crescimento das plantas (WANG et al., 2015).

Para a variável concentração interna de  $\text{CO}_2$  não houve efeito significativo das concentrações de NPS aos 14 DAT, na condição de estresse salino, assim como para as plantas isentas de estresse salino aos 21 DAT (Figura 11A e 11B).

**Figura 11 – Concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) aos 14 (A), 21 (B) e 28 (C) DAT de plantas de alface tratadas com nitoprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



Na ausência do estresse salino, aos 14 DAT, houve redução da concentração interna de dióxido de carbono com o aumento das concentrações de NPS. A maior concentração de NPS (200  $\mu\text{mol}$ ) resultou em valor médio de  $C_i$  de 226,35  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , reduzindo aproximadamente 30% dessa variável em comparação a menor concentração do produto (0  $\mu\text{mol}$  de NPS) (Figura 11A).

Para as plantas submetidas ao estresse salino, a concentração interna de  $\text{CO}_2$  foi afetada negativamente pelo aumento das concentrações de NPS até a

concentração de 100  $\mu\text{mol}$ , provocando redução de 11%, e a partir desta houve aumento de  $\text{CO}_2$ , durante a segunda análise de trocas gasosas (Figura 11B).

Na última análise de trocas gasosas, verificou-se que a  $C_i$  foi afetada positivamente pela aplicação de NPS, ocorrendo maior valor dessa variável de acordo com o aumento das concentrações de NPS. Visto que houve resposta linear crescente nas plantas submetidas ao estresse salino, sendo a maior concentração de NPS aplicada (200  $\mu\text{mol}$ ) responsável pelo valor médio de 262,65  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , equivalendo ao incremento de 30,4% a mais que o alcançado em plantas não tratadas. Já em plantas não estressadas, essa variável apresentou resposta quadrática, onde o aumento das concentrações de NPS proporcionou máxima  $C_i$  na dose de 50,85  $\mu\text{mol}$  de NPS (286,43 65  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) (Figura 11C).

Considerando que a presença de NO, dependendo da concentração, estimula a assimilação fotossintética, a redução na concentração interna de  $\text{CO}_2$ , possivelmente, está vinculada ao fechamento estomático em plantas estressadas; no entanto, as maiores concentrações de NPS induziram o aumento na  $C_i$  otimizando a disponibilidade de dióxido de carbono fixado para a síntese de fotoassimilados.

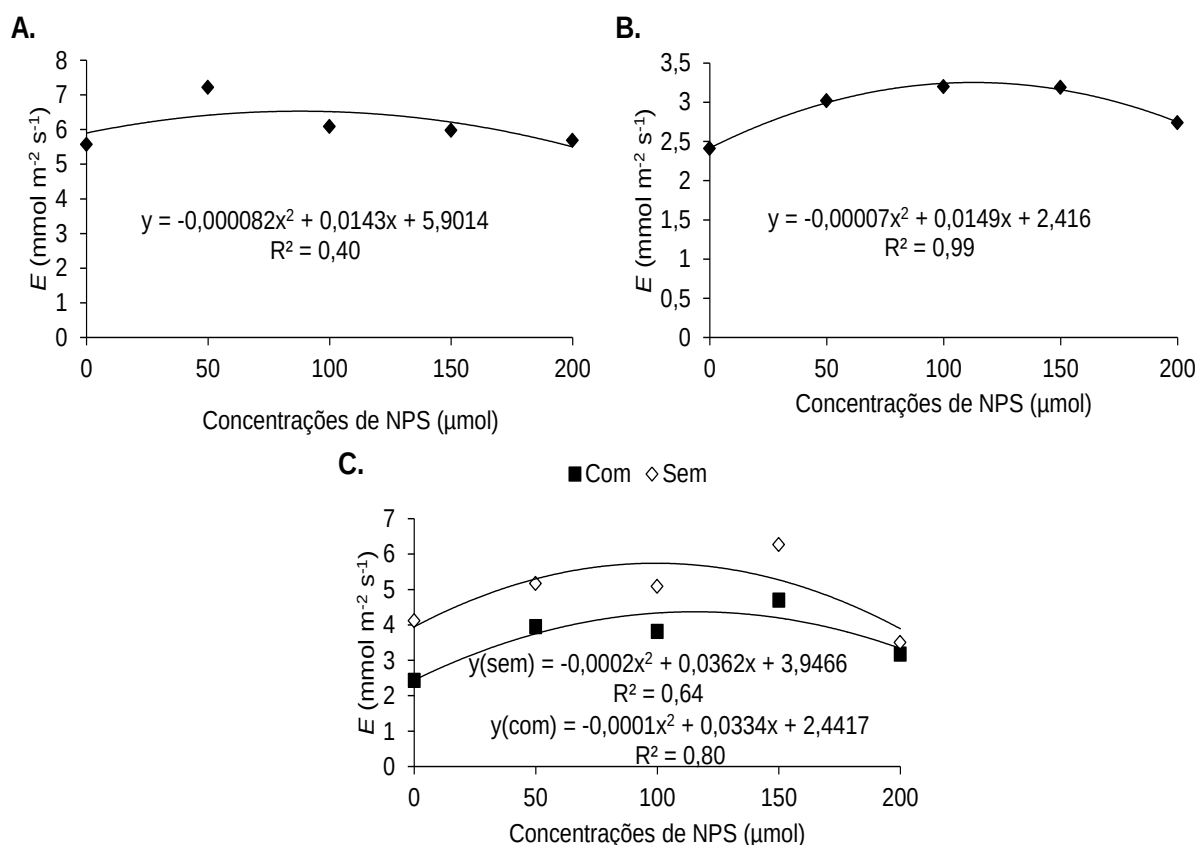
Além disso, a ação do NO como agente sinalizador pode promover o uso eficiente de água nas plantas condicionadas ao estresse através de sinais para o aumento de ABA, culminando na regulação das células guardas a fim de reduzir a perda de água em função do estresse. Entretanto, isso resulta em diminuição de  $\text{CO}_2$  fixado e, conseqüentemente, menor síntese orgânica (FAHAD et al., 2015).

Ao analisar o efeito das concentrações de NPS sobre a taxa de transpiração ( $E$ ), independente do estresse, aos 14 e 21 DAT, houve aumento desta variável seguido do aumento das concentrações de NPS aplicadas. O ajuste dos dados se deu ao comportamento quadrático da curva, onde as maiores taxas de transpiração foram encontradas nas concentrações de 87,19 e 106,43  $\mu\text{mol}$  de NPS, correspondente a 10,5 e 33,2% a mais em comparação às plantas controle, respectivamente (Figura 12A e 12B).

Aos 28 DAT, o aumento das concentrações de NPS promoveu maior taxa de transpiração tanto na ausência quanto na presença de estresse salino. Para as plantas estressadas a maior taxa de transpiração foi de 5,23  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na concentração de 167  $\mu\text{mol}$  de NPS. Na ausência de estresse salino, as plantas

apresentaram maior transpiração na concentração 90,5  $\mu\text{mol}$  de NPS (5,58  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Figura 12C).

**Figura 12 – Taxa de transpiração ( $E$ ) aos 14 (A), 21 (B) e 28 (C) DAT de plantas de alface tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



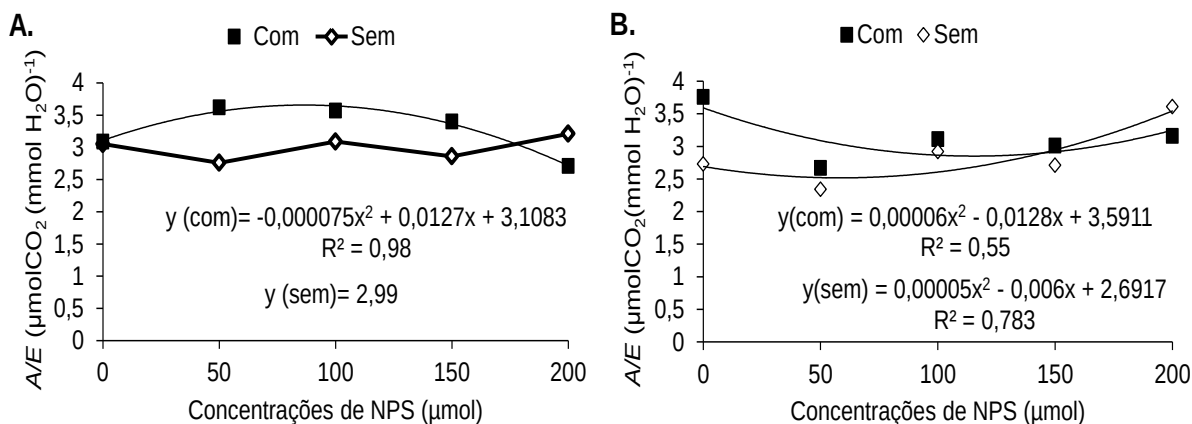
Diante disto, a maior taxa de transpiração observada pelo aumento na disponibilidade de óxido nítrico no meio explica o aumento na condutância estomática, concentração interna de  $\text{CO}_2$  e, conseqüentemente, a maior taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$ , minimizando os dados causados pelo estresse através da continuidade do desenvolvimento da planta.

Esses resultados corroboram os observados por Silveira et al. (2016), em que o NO melhorou a performance fotossintética da planta, o que culminou em uma maior taxa de transpiração pela abertura estomática permitindo a difusão de  $\text{CO}_2$  para o mesófilo foliar e, conseqüentemente maior taxa fotossintética.

Com relação à eficiência do uso da água, não houve efeito das concentrações de NPS sobre essa variável em plantas não submetidas ao estresse salino, cujo valor médio obtido foi de 2,99. Já para as plantas condicionadas ao

estresse salino, o aumento das concentrações de NPS promoveu acréscimo dessa variável, com máxima *A/E* obtida na dose de 84,66  $\mu\text{mol}$  de NPS (3,65) e aumento de 17,7% em relação às plantas controle (Figura 13A).

**Figura 13 – Eficiência no uso da água (*A/E*) aos 21 (A) e 28 (B) DAT de plantas de alface tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



Na Figura 13B, verifica-se que o uso eficiente da água em plantas estressadas pela salinidade, foi reduzido com o aumento das concentrações de NPS, corroborando com os dados observados na taxa de transpiração, que aumentou de acordo com o incremento das concentrações de NPS aplicadas. Na presença do estresse salino, o menor valor alcançado para a *A/E* de 2,91 foi observado na concentração de 106,66  $\mu\text{mol}$  de NPS, com aproximadamente 18,9% a menos de eficiência no uso da água se comparado a menor concentração de NPS aplicada (0  $\mu\text{mol}$ ).

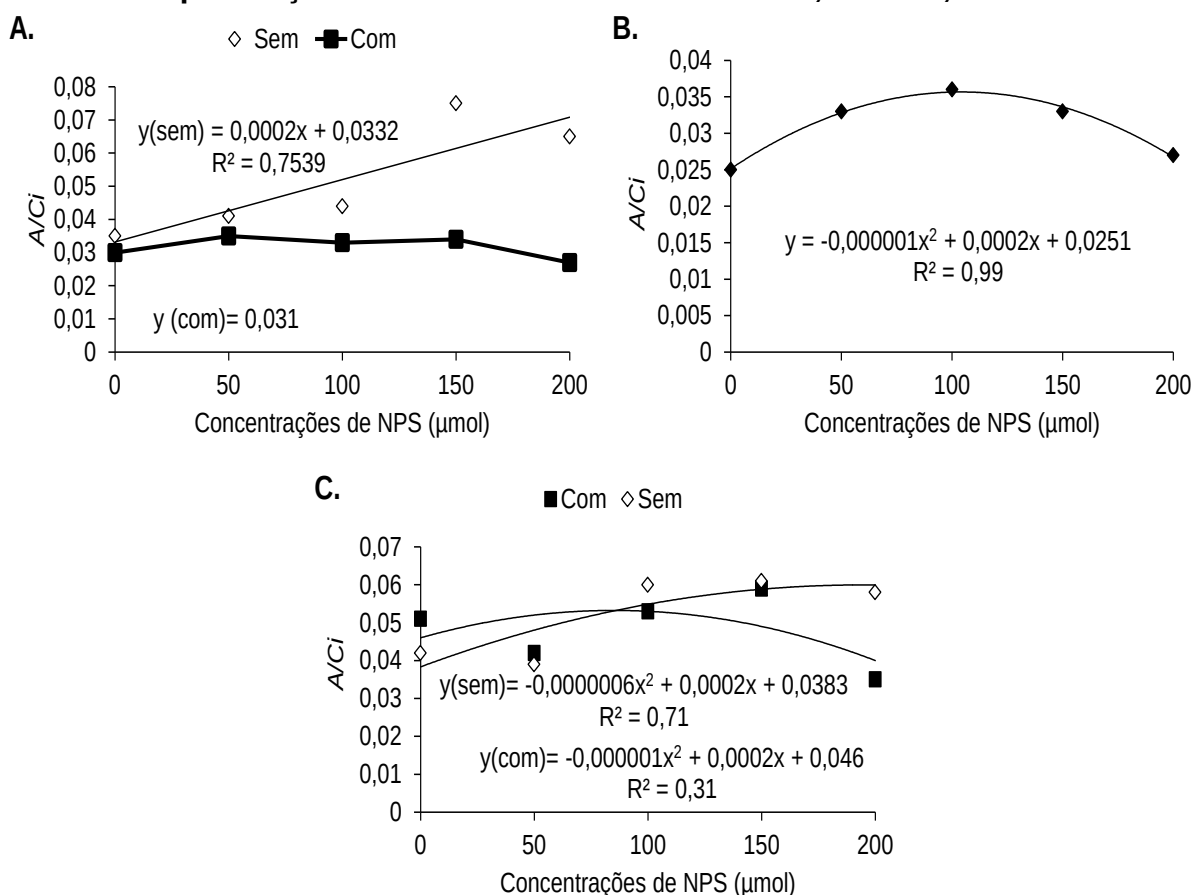
Ainda na Figura 13B, verifica-se que na ausência de estresse salino, o aumento das concentrações de NPS também resultou em resposta quadrática, sendo a menor relação de *A/E* de 2,51 encontrada até a concentração de 60  $\mu\text{mol}$  de NPS, aproximadamente 7% a menos que nas plantas não tratadas com o produto; contudo, o aumento das concentrações de NPS tornou a elevar essa variável.

Essa redução na eficiência do uso da água pelo incremento de óxido nítrico no tecido da planta pode ser vista como melhoria do desempenho fotossintético,

considerando que houve maior abertura estomática, bem como, maior perda de água por transpiração para permitir a difusão de  $\text{CO}_2$  do meio para o mesofilo foliar.

A análise de desdobramentos dos fatores para a variável  $A/C_i$  não apresentou efeito das concentrações de NPS sobre a condição de estresse salino, cuja média obtida foi de 0,031. Já em plantas sem estresse salino, a variável  $A/C_i$ , apresentou resposta linear crescente com o aumento das concentrações de NPS, sendo que a maior concentração de 200  $\mu\text{mol}$  resultou em 0,073 de  $A/C_i$  (Figura 14A).

**Figura 14 – Eficiência de carboxilação ( $A/C_i$ ) aos 14 (A), 21 (B) e 28 (C) DAT de plantas de alface tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



Aos 21 DAT a taxa de carboxilação também foi afetada pelas concentrações de NPS aplicadas, independente do estresse, apresentando máxima eficiência da enzima rubisco na concentração de 100  $\mu\text{mol}$  de NPS (0,03) com ganho de 50% em relação à ausência do produto, evidenciando a eficiência do suprimento de NO exógeno (Figura 14B).

Na terceira coleta, verificou-se resposta quadrática para a relação  $A/C_i$ , tanto para condição com e sem estresse salino, houve resposta quadrática, promovendo aumento dessa variável de acordo com o aumento das concentrações de NPS aplicadas. Na ausência de estresse salino, essa variável apresentou valor máximo de 0,055 de  $A/C_i$  na concentração de 166,66  $\mu\text{mol}$  de NPS, com ganho de aproximadamente 66,6% em relação ao não suprimento de NO. Já para as plantas estressadas, essa variável apresentou ponto de máxima de 0,015 na concentração de 100  $\mu\text{mol}$  de NPS (Figura 14C).

Este resultado assemelham-se aos obtidos por Campos et al. (2019), ao trabalhar em plântulas de alface sob estresse salino de curta duração, observando que os tratamentos acrescidos de NPS modulam o danos causados pelo estresse salino, permitindo maiores ganhos na concentração interna de dióxido de carbono, bem como, maior condutância estomática, taxa transpiratória e maior atividade da Rubisco, a fim de manter o crescimento sob condições de estresse.

O mesmo foi visto em plantas de alface não estressadas, admitindo-se que a aplicação de NO, dependendo da concentração, pode gerar inúmeros ganhos relacionados aos processos fisiológicos no tecido vegetal.

A partir da análise de variância para a fluorescência da clorofila *a* foi possível detectar efeito significativo da interação entre os fatores estresse salino e concentrações de NPS, para as variáveis eficiência quântica potencial do fotossistema II aos 14 DAT ao nível de 5% de probabilidade, coeficiente de extinção fotoquímico aos 14 e 28 DAT ( $p \leq 0,01$ ), bem como para a taxa aparente de transporte de elétrons aos 28 DAT ( $p \leq 0,01$ ). Para a segunda avaliação (21 DAT) não houve efeito de nenhum dos fatores (concentrações de NPS e estresse) adotados (Tabela 3).

Ao analisar os valores médios de fluorescência da clorofila *a* aos 14 DAT, verifica-se que a variável  $NPQ$  foi menor em plantas submetidas ao estresse salino, ocorrendo o inverso para a variável  $qP$ , enquanto a  $ETR$  não sofreu alteração pelo fator estresse salino, não havendo diferença estatística na presença ou ausência do estresse. Aos 21 e 28 DAT também não foi verificado diferença estatística entre os valores médios em relação ao fator estresse salino para todas as variáveis analisadas (Tabela 3).

**Tabela 3 – Resumo da análise de variância da eficiência quântica potencial do PSII ( $F_v/F_m$ ), coeficiente de extinção fotoquímico ( $qP$ ), coeficiente de extinção não-fotoquímico ( $NPQ$ ) e taxa aparente de transporte de elétrons ( $ETR$ ) de plantas de alface cv. Vera tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**

| Fontes de variação            | GL | Primeira Avaliação (14 DAT) |                        |                        |                      |
|-------------------------------|----|-----------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
|                               |    | Quadrados médios            |                        |                        |                      |
|                               |    | PSII                        | $qP$                   | $NPQ$                  | $ETR$                |
| Estresse salino (E)           | 1  | 0,0009 <sup>ns</sup>        | 0,0119**               | 1,40**                 | 169,55 <sup>ns</sup> |
| Conc. de NPS (C) <sup>1</sup> | 4  | 0,0043**                    | 0,0070**               | 0,23*                  | 853,09**             |
| Interação E x C               | 4  | 0,0016*                     | 0,0038**               | 0,12 <sup>ns</sup>     | 242,80 <sup>ns</sup> |
| CV (%)                        |    | 2,57                        | 3,69                   | 15,46                  | 7,53                 |
| Estresse salino               |    | Teste de médias             |                        |                        |                      |
| SEM (0,2 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 0,94 a                      | 0,62 b                 | 1,78 a                 | 147,72 a             |
| COM (3,5 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 0,95 a                      | 0,65 a                 | 1,40 b                 | 151,85 a             |
| Fontes de variação            | GL | Segunda Avaliação (21 DAT)  |                        |                        |                      |
|                               |    | Quadrados médios            |                        |                        |                      |
|                               |    | PSII                        | $qP$                   | $NPQ$                  | $ETR$                |
| Estresse salino (E)           | 1  | 0,000017 <sup>ns</sup>      | 0,0094 <sup>ns</sup>   | 0,0122 <sup>ns</sup>   | 365,75 <sup>ns</sup> |
| Conc. de NPS (C) <sup>1</sup> | 4  | 0,000262 <sup>ns</sup>      | 0,0032 <sup>ns</sup>   | 0,0418 <sup>ns</sup>   | 303,20 <sup>ns</sup> |
| Interação E x C               | 4  | 0,000269 <sup>ns</sup>      | 0,0046 <sup>ns</sup>   | 0,0028 <sup>ns</sup>   | 376,71 <sup>ns</sup> |
| CV (%)                        |    | 1,43                        | 13,79                  | 11,88                  | 15,60                |
| Estresse salino               |    | Teste de médias             |                        |                        |                      |
| SEM (0,2 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 0,95 a                      | 0,48 a                 | 1,49 a                 | 115,81 a             |
| COM (3,5 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 0,95 a                      | 0,51 a                 | 1,46 a                 | 122,73 a             |
| Fontes de variação            | GL | Terceira Avaliação (28 DAT) |                        |                        |                      |
|                               |    | Quadrados médios            |                        |                        |                      |
|                               |    | PSII                        | $qP$                   | $NPQ$                  | $ETR$                |
| Estresse salino (E)           | 1  | 0,000004 <sup>ns</sup>      | 0,002253 <sup>ns</sup> | 0,006836 <sup>ns</sup> | 103,97 <sup>ns</sup> |
| Conc. de NPS (C) <sup>1</sup> | 4  | 0,000043 <sup>ns</sup>      | 0,035690**             | 0,426126**             | 3162,46**            |
| Interação E x C               | 4  | 0,000004 <sup>ns</sup>      | 0,024382**             | 0,004355 <sup>ns</sup> | 989,26**             |
| CV (%)                        |    | 0,47                        | 7,86                   | 7,02                   | 7,23                 |
| Estresse salino               |    | Teste de médias             |                        |                        |                      |
| SEM (0,2 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 0,95 a                      | 0,52 a                 | 1,76 a                 | 122,30 a             |
| COM (3,5 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 0,95 a                      | 0,51 a                 | 1,74 a                 | 119,07 a             |

<sup>1</sup> – Concentrações de nitroprussiato de sódio;

\*, \*\* e ns – significativos a 5 e 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente (Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ )).

Isso demonstra que as plantas submetidas ao estresse salino apresentaram menor dissipação da energia luminosa absorvida em forma de calor em comparação às plantas não estressadas.

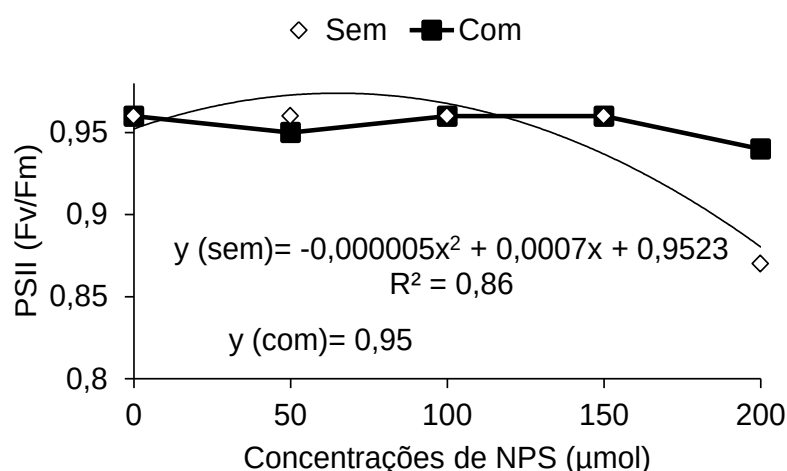
Segundo Roháček e Barták (1999), a dissipação de energia não fotoquímica na forma de calor nos complexos do PSII atua como fotoproteção; dessa forma, na condição de estresse salino, essa fotoproteção pode ter sido comprometida no início do desenvolvimento das plantas.

Com relação ao PSII em plantas estressadas, observa-se que não houve efeito significativo das concentrações de NPS sobre essa variável, apresentando



valor médio de 0,95. Entretanto, em plantas não submetidas ao estresse salino, as concentrações de NPS promoveram aumento dessa variável, apresentando resposta quadrática ao ajuste da curva, com máxima eficiência na concentração de 70  $\mu\text{mol}$  de NPS (Figura 15).

**Figura 15 – Eficiência quântica potencial do PSII ( $F_v/F_m$ ) aos 14 DAT de plantas de alface tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



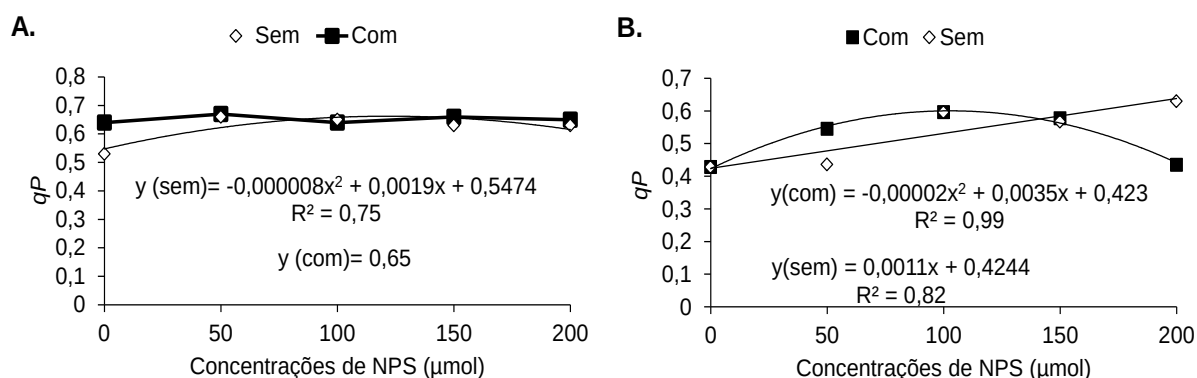
O efeito protetor do óxido nítrico sobre a eficiência máxima do PSII pode refletir em bom funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, gerando ATP e  $\text{NADPH}_2$  e aliado a isso permitir maior eficiência na condutância estomática e, consequentemente, maior assimilação de  $\text{CO}_2$ , podendo promover ganhos fotossintéticos em plantas não condicionadas ao estresse salino (SILVEIRA et al., 2016).

Assim como PSII a variável  $qP$ , em plantas estressadas, não foi afetada pelas concentrações de NPS, apresentando valor médio de 0,65. Já nas plantas não submetidas ao estresse salino o maior valor médio de  $qP$  foi obtido na concentração de 118,75  $\mu\text{mol}$  de NPS, com aumento de 22,2% em comparação a menor concentração de NPS aplicada (0  $\mu\text{mol}$ ) (Figura 16A).

Aos 28 DAT a máxima eficiência de extinção fotoquímica em plantas estressadas foi alcançada na concentração de 87,5  $\mu\text{mol}$  de NPS correspondendo a 35,7% a mais em comparação às plantas controle. Já em plantas isentas do estresse salino, houve resposta linear crescente para variável  $qP$ , onde a maior

concentração (200  $\mu\text{mol}$  de NPS) promoveu o aumento dessa variável a 0,64; sendo este valor 52,3% maior que o obtido na ausência de NPS (Figura 16B).

**Figura 16 – Coeficiente de extinção fotoquímica ( $qP$ ) aos 14 (A) e 28 (B) DAT de plantas de alface tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



Maiores índices de coeficiente de extinção fotoquímico indicam maior eficiência do fotossistema, ou seja, mais energia foi extinta nos processos primários de reações fotoquímicas. Logo, quanto maior o valor de  $qP$ , maior atividade da enzima de carboxilação Rubisco (KRAUSE; WEIS, 1991).

Dessa maneira, pode se observar que aplicação de NO através do doador NPS, promoveu maior eficiência no uso de energia nos fotossistemas em plantas não estressadas, sobretudo, nas plantas condicionadas ao estresse, evidenciando o efeito protetor dessa molécula (NO) sobre os danos deletérios da salinidade.

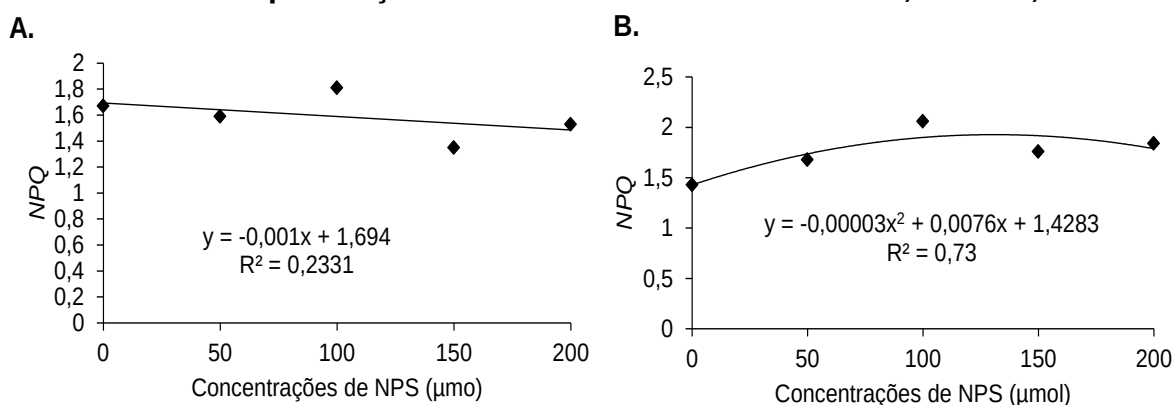
Em relação ao efeito das concentrações de NPS sobre a variável  $NPQ$ , o resultado foi semelhante para condições com e sem estresse, em que houve redução desta à medida que foram aplicadas maiores concentrações de NPS, apresentando resposta linear decrescente, onde a maior concentração (200  $\mu\text{mol}$ ) apresentou 1,49 de  $NPQ$  (Figura 17A).

A redução do  $NPQ$  pode ser correlacionada ao aumento no transporte de elétrons entre os fotossistemas (PSII e PSI) em função do aumento das concentrações de NPS, indicando que a presença de NO possivelmente melhora a produção de  $\text{NADPH}_2$  e ATP utilizados no ciclo de Calvin-Benson.

Assim como observado aos 14 DAT, a variável  $NPQ$  foi afetada pelas concentrações de NPS de forma semelhante pelas duas salinidades na segunda avaliação de fluorescência da clorofila  $a$ ; contudo, o aumento das concentrações

resultou no aumento dessa variável, apresentando resposta quadrática, com valor máximo de coeficiente de extinção não-fotoquímico de 1,91 na concentração de 126,66  $\mu\text{mol}$  de NPS, com aumento de 34,5% em relação às plantas controle (Figura 17B).

**Figura 17 – Coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) aos 14 (A) e 28 (B) DAT de plantas de alface tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



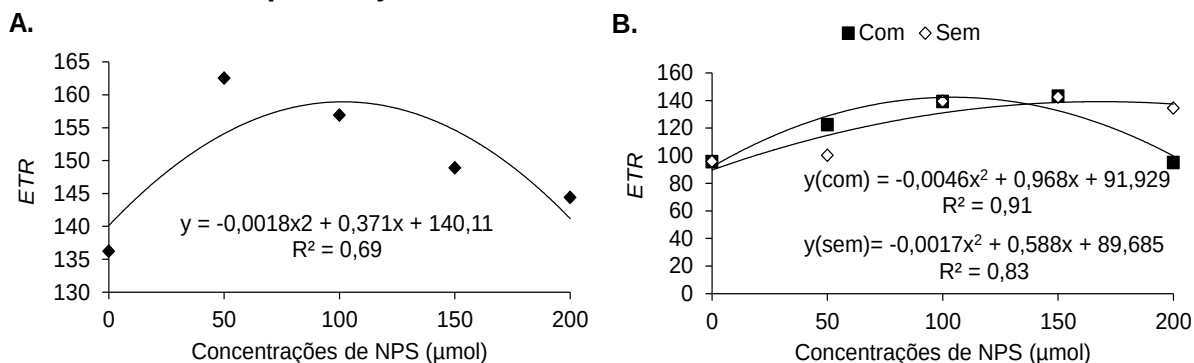
Esse comportamento pode ser explicado conforme observado por Krause e Weis (1991), em que o coeficiente de extinção não-fotoquímico representa a dissipação do excesso de energia luminosa na forma de calor e através desse componente ocorre a fotoproteção dos centros de reações. Logo, o suprimento de NO através do doador NPS impediu que houvesse excesso à capacidade de utilização de energia luminosa, independente da condição de estresse sobre as plantas de alface.

Para variável *ETR*, houve efeito polinomial de segundo grau com o aumento das concentrações de NPS, com máximo valor médio observado na concentração de 103,05  $\mu\text{mol}$  de NPS, independente da condição de estresse, cujo aumento foi de 13,6% no transporte de elétrons em relação às plantas controle (Figura 18A).

Para *ETR* aos 28 DAT, o aumento das concentrações de NPS resultou no aumento dessa variável, tanto na presença como na ausência de estresse salino. Nas plantas submetidas ao estresse salino o valor máximo obtido de *ETR* foi encontrado na concentração de 105,22  $\mu\text{mol}$  de NPS, expressando aumento de 55,4% a mais que a menor concentração (0  $\mu\text{mol}$  de NPS). O mesmo ocorreu na ausência de estresse salino, onde o pico de *ETR* foi observado na concentração de

172,94  $\mu\text{mol}$  de NPS, respondendo por 56,6% no aumento dessa variável se comparado à ausência de NPS (Figura 18B).

**Figura 18 – Taxa aparente do transporte de elétrons (ETR) aos 14 (A) e 28 (B) DAT de plantas de alface tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



A aplicação de NO também promoveu efeito benéfico sobre o transporte aparente de elétrons em plantas estressadas, otimizando o transporte de energia entre os fotossistemas (PSII e PSI) e o direcionamento da energia luminosa para produção de  $\text{NADPH}_2$  e ATP, regulando positivamente o processo fotossintético (FAHAD et al., 2015). Dessa maneira, é possível admitir que o NO suprido pelo doador NPS modula os efeitos prejudiciais da salinidade sobre as plantas.

#### 4.3 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos

A análise estatística não detectou efeito significativo da interação (concentrações de NPS x estresse) para as variáveis clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila *a+b* ( $p > 0,05$ ). Entretanto, houve resposta significativa, tanto para interação entre os fatores quanto para o efeito isolado do estresse salino, ao nível de 1% de probabilidade para a variável teor de carotenoides (Tabela 4).

Ainda na Tabela 4 verifica-se que a condição de estresse não apresentou diferença estatística entre os valores médios obtidos em relação aos teores de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila *a+b*, obtendo-se valores médios de 0,79; 1,35 e 2,15 respectivamente.

Sabe-se que o conteúdo de clorofilas pode ser comprometido em condições salinas, seja pela inibição da síntese destes pigmentos (MELO et al., 2017) ou por

sua degradação, sendo esta atribuída ao aumento da atividade da clorofilase através da degradação dos cloroplastos (JAMIL et al., 2007).

**Tabela 4 – Resumo da análise de variância dos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *a+b* e carotenoides de plantas de alface, cv. Vera, tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**

| Fontes de variação            | GL | Quadrados médios      |                       |                       |                       |
|-------------------------------|----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                               |    | Cl <i>a</i>           | Cl <i>b</i>           | Cl <i>a+b</i>         | Carotenoides          |
| Estresse salino (E)           | 1  | 0,00003 <sup>ns</sup> | 0,00032 <sup>ns</sup> | 0,00015 <sup>ns</sup> | 0,00390 <sup>**</sup> |
| Conc. de NPS (C) <sup>1</sup> | 4  | 0,07817 <sup>ns</sup> | 0,15612 <sup>ns</sup> | 0,43721 <sup>ns</sup> | 0,00096 <sup>ns</sup> |
| Interação E x C               | 4  | 0,04235 <sup>ns</sup> | 0,07828 <sup>ns</sup> | 0,23439 <sup>ns</sup> | 0,00316 <sup>**</sup> |
| CV (%)                        |    | 27,18                 | 25,89                 | 26,18                 | 11,98                 |
| Estresse salino               |    | Teste de médias       |                       |                       |                       |
| SEM (0,2 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 0,79 a                | 1,35 a                | 2,15 a                | 0,17 b                |
| COM (3,5 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 0,79 a                | 1,36 a                | 2,15 a                | 0,19 a                |

<sup>1</sup> – Concentrações de nitroprussiato de sódio;

\*, \*\* e ns – significativos a 5 e 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente (Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ )).

Contudo, no presente trabalho não houve influência do estresse e nem das concentrações estudadas sobre os teores de clorofilas. Resultados semelhantes foram obtidos por Sarmento et al. (2014) que ao avaliarem a qualidade e conservação de alface cultivada com rejeito salino, onde não foi observado efeito do estresse nos teores de clorofilas.

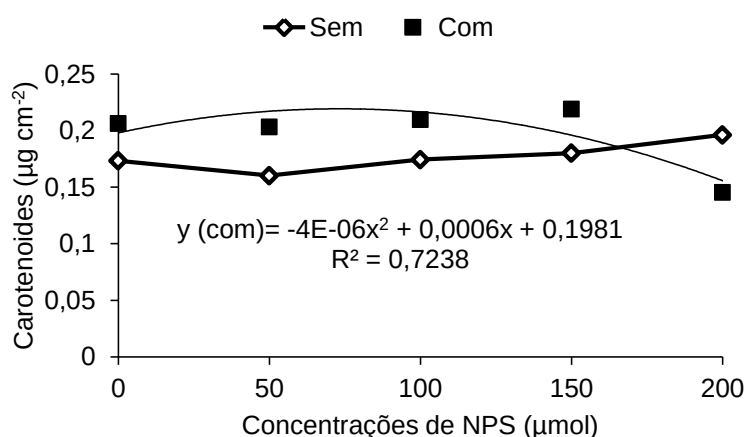
Segundo Ashraf e Harris (2013), o conteúdo de clorofila em plantas condicionadas a estresse salino pode ser variável de acordo com a espécie, podendo apresentar aumento dessa variável em plantas mais tolerantes à salinidade e redução em plantas sensíveis.

Para a variável carotenoides observa-se que na condição de estresse salino as plantas estressadas apresentaram maior concentração no teor desse pigmento em comparação a plantas não estressadas, com ganho de 10% na concentração de carotenoides (Tabela 4).

Por atuarem na proteção do aparato fotossintético, os carotenoides podem ser considerados uma importante linha de defesa contra o estresse (GURURANI; VENKATESH; TRAN, 2015; AHMAD et al., 2016); além disso, podem atuar como compostos antioxidantes, de natureza não-enzimática, agindo diretamente na eliminação de espécies reativas de oxigênio, reduzindo os danos causados pelo estresse oxidativo, que se eleva em condições de estresse (RAHMAN et al., 2016).

Em relação às concentrações de NPS, não foi verificado efeito destas sobre as plantas não estressadas, obtendo-se valor médio de  $0,17 \mu\text{g cm}^2$ . Por outro lado, plantas irrigadas com água salina apresentaram resposta quadrática, obtendo-se maior teor de carotenoides na concentração de  $75 \mu\text{mol}$  ( $0,22 \mu\text{g cm}^2$ ) com aumento de 15,7% em relação à concentração de  $0 \mu\text{mol}$  de NPS (Figura 19).

**Figura 19 – Teor de carotenoides de plantas de alface tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**



Estes resultados se assemelham aos encontrados por Campos et al. (2019), onde também foi constatado aumento no teor de carotenoides em plantas de alface submetidas a estresse salino de curta duração, na presença de NPS, salientando que a aplicação de óxido nítrico fornecida via doador (NPS) pode contribuir para aumento desse pigmento na mitigação dos efeitos deletérios causadas pela salinidade.

#### 4.4 Variáveis biométricas

De acordo com a análise de variância, verificou-se efeito significativo da interação entre os fatores estudados (concentrações de NPS x estresse) para as variáveis número de folhas e massa de matéria fresca total ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente; para as demais variáveis houve efeito significativo apenas para o fator isolado estresse, ao nível de significância de 1% de probabilidade (Tabela 5).

A exposição ao estresse salino afetou negativamente todas as variáveis estudadas, independente da concentração de NPS utilizada, cujas perdas ao comparar os valores médios dos dois níveis salinos (0,2 e 3,5 dS m<sup>-1</sup>) foram de 6,3; 9,6; 29,5; 14,3; 10,7 e 17,2%, para CRA, NF, AF, MMFT, MMST e DC, respectivamente (Tabela 5).

**Tabela 5 – Resumo da análise de variância do conteúdo relativo de água (CRA, %), número de folhas (NF), área foliar (AF, mm<sup>2</sup>), massa de matéria fresca total (MMFT, g planta<sup>-1</sup>), massa de matéria seca total (MMST, g planta<sup>-1</sup>) e diâmetro do caule (DC, mm) de plantas de alface cv. Vera, tratadas nitroprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019**

| Fontes de Variação            | GL | Quadrado médio      |         |                         |            |                    |                     |
|-------------------------------|----|---------------------|---------|-------------------------|------------|--------------------|---------------------|
|                               |    | CRA                 | NF      | AF                      | MMFT       | MMST               | DC                  |
| Estresse salino (E)           | 1  | 244,89**            | 55,22** | 11425114,6**            | 359883,8** | 69,16**            | 146,6**             |
| Conc. de NPS (C) <sup>1</sup> | 4  | 10,88 <sup>ns</sup> | 15,41*  | 395811,06 <sup>ns</sup> | 10418,8**  | 4,86 <sup>ns</sup> | 2,91 <sup>ns</sup>  |
| Interação E x C               | 1  | 10,29 <sup>ns</sup> | 8,66*   | 57283,00 <sup>ns</sup>  | 4224,7**   | 6,00 <sup>ns</sup> | 10,08 <sup>ns</sup> |
| CV (%)                        |    | 4,86                | 7,76    | 15,68                   | 7,29       | 14,08              | 9,58                |
| Estresse salino               |    | Teste de médias     |         |                         |            |                    |                     |
| SEM (0,2 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 78,76 a             | 23,8 a  | 3612,78 a               | 417,74 a   | 21,90 a            | 22,24 a             |
| COM (3,5 dS m <sup>-1</sup> ) |    | 73,81 b             | 21,5 b  | 2543,90 b               | 357,76 b   | 19,27 b            | 18,41 b             |

<sup>1</sup> – Concentrações de nitroprussiato de sódio;

\*, \*\* e <sup>ns</sup> – significativos a 5 e 1% de probabilidade e não significativo, respectivamente (Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p ≤ 0,05).

O conteúdo relativo de água é um dos importantes indicadores da tolerância à desidratação, sendo altamente afetado sob condições de estresse, seja hídrico ou salino; logo essas adversidades podem reduzir a hidratação dos tecidos e afetar processos fisiológicos durante o desenvolvimento da planta (LAKZAYI et al., 2014), conforme observado nos resultados obtidos.

A partir destes resultados observa-se que a AF foi a variável mais afetada pela salinidade, sendo esta condição uma das repostas adaptativa da planta ao meio salino, seja pela diminuição na emissão foliar ou em função do tamanho do limbo foliar (OLIVEIRA et al., 2017), com objetivo de restringir a perda de água através da transpiração (OLIVEIRA et al., 2013a).

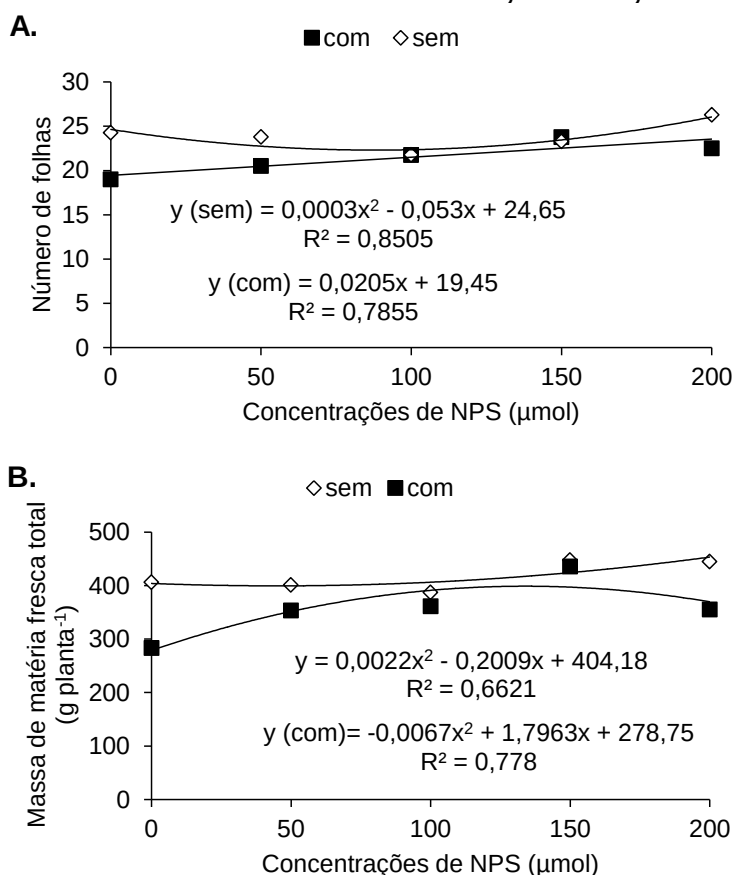
Assim como constatado nesse trabalho, o efeito negativo da salinidade sobre o número de folhas e massa de matéria fresca total também foi observado por Paulus et al. (2012) e Moraes et al. (2014), havendo redução no acúmulo de fitomassa de plantas de alface com aumento unitário da condutividade elétrica da água de irrigação.

Todos esses danos podem estar associados a efeitos osmóticos, tóxicos e nutricionais, em vista do acúmulo de sais na zona radicular, comprometendo os mecanismos fisiológicos e bioquímicos da planta (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Conforme apresentado anteriormente, não houve efeito das concentrações de NPS sobre as variáveis CRA, AF, MMST e DC, obtendo-se valores médios de 76,29; 3.082,56; 20,59 e 20,33 respectivamente.

Para o número de folhas (NF), verificou-se resposta variada de acordo com a condição de estresse utilizada. Na ausência de estresse salino, o NF foi reduzido inicialmente até a concentração de 88,33  $\mu\text{mol}$  de NPS, apresentando aumento nas maiores. Por outro lado, nas plantas submetidas ao estresse salino houve aumento linear no NF com o incremento das concentrações de NPS, de forma que os maiores valores ocorreram na dose 200  $\mu\text{mol}$  (23 folhas por planta) (Figura 20A).

**Figura 20 – Número de folhas (a) e massa de matéria fresca total (b) de plantas de alface tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS) na ausência e presença de estresse salino. Botucatu/SP, UNESP, 2019.**





Ainda são escassos os estudos que relatem o efeito do ON liberado através do NPS sobre o número de folhas, sobretudo, em plantas de alface submetidas ao estresse salino.

Com relação à massa da matéria fresca total (MMFT), verificaram-se respostas quadráticas para as ambas as condições de estresse salino, variando, no entanto, quanto ao comportamento apresentado. Nas plantas cultivadas sem estresse salino, o incremento das concentrações de NPS proporcionou aumento na MMFT, com maior valor ocorrendo na concentração de 200  $\mu\text{mol}$  de NPS (452,00 g planta<sup>-1</sup>) (Figura 20B).

Para as plantas submetidas ao estresse salino, a maior MMFT foi obtida na concentração de 134,05  $\mu\text{mol}$  de NPS (399,14 g planta<sup>-1</sup>), expressando rendimento de 43,2% em comparação às plantas controle (Figura 20B).

É possível observar que a aplicação do doador de óxido nítrico (NPS) em condição de estresse salino pode modular os efeitos deletérios dessa condição, uma vez que a aplicação de óxido nítrico proporcionou maiores ganhos de NF e MMFT em relação às plantas estressadas que não receberam aplicação de NPS (Figura 20A e 20B).

Segundo Campos et al. (2019), a aplicação NO pode conferir, às plantas, tolerância à salinidade, visto que essa molécula induziu o crescimento de plântulas de alface cultivadas em meio salino por curta duração, corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho.

Além disso, acredita-se que o óxido nítrico pode estar envolvido no crescimento e regulação do desenvolvimento de plantas, sobretudo, em condições de estresse, seja ele biótico ou abiótico, evidenciando seu efeito protetor (SANZ et al., 2015).

## 5 CONCLUSÃO

Em relação aos resultados obtidos, nas condições deste experimento, pode-se concluir que a suplementação de óxido nítrico via NPS apresentou efeitos positivos nas plantas de alfaces irrigadas com água salobra, ao nível de  $3,5 \text{ dS m}^{-1}$ . Podendo ser recomendado o uso de NPS, para essa condição de estresse, concentrações entre 100 e 150  $\mu\text{mol}$  de NPS, as quais apresentaram respostas positivas para a atividade das enzimas antioxidantes, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, concentração de prolina, conteúdo de pigmentos fotossintéticos e com isso proporcionaram maior ganho de massa fresca.

## REFERÊNCIAS

- ABCSEM – **Associação Brasileira de Comércio de Sementes e Mudas**. 2018. Disponível em <http://www.abcsem.com.br//> Acessado em 10 de Julho de 2019.
- AHMAD, P.; ABDEL LATEF, A. A.; HASHEM, A.; ABD ALLAH, E. F.; GUCEL, S.; TRAN, L.-S. P. Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 347, 2016.
- AHMAD, P.; AHANGER, M. A.; ALYEMENI, M. N.; WIJAYA, L.; ALAM, P. Exogenous application of nitric oxide modulates osmolyte metabolism, antioxidants, enzymes of ascorbate-glutathione cycle and promotes growth under cadmium stress in tomato, **Protoplasma**, v. 255, n. 1, p. 79-93, 2018.
- ALEXIAVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v.24, p.1337–1344, 2001.
- ALMEIDA, O. A. **Qualidade da água de irrigação**. Cruz das Almas: Embrapa, 2010. 234p.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.
- ALVES, L. S.; SILVA, M. G.; GHEYI, H. R.; PAZ, V. P. S.; SOARES, T. M.; RAFAEL, M. R. S. Uso de águas salobras no cultivo da chicória em condições hidropônicas. **Irriga**, v. 24, n. 4, p. 758-769, 2019.
- ALVES, M. S.; SOARES, T. M.; SILVA, L. T.; FERNANDES, J. P.; OLIVEIRA, M. L. A.; PAZ, V. P. S. Estratégias de uso de água salobra na produção de alface em hidroponia NFT. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n. 5, p.491-498, 2011.
- ANDRIOLO, J. L.; LUZ, G. L.; GIRALDI, C.; GODOI, R. S.; BARROS, G. T. Cultivo hidropônico da alface empregando substratos: uma alternativa a NFT? **Revista Horticultura Brasileira**, v.22, n. 4, p.794-798, 2004.
- ARORA, D.; JAIN, P.; SINGH, N.; KAUR, H.; BHATLA, S. C. Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants. **Free Radical Research**, v.50, p.291-303, 2016.
- ASHRAF, M.; AKRAM, N.A.; ALQURAINY, F.; FOOLAD, M.R. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. **Advances in Agronomy**, v.111, p.249-296, 2011.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: an overview. **Photosynthetica**, v.51, p.163-190, 2013.
- ASHRAF, M.; McNEILLY, T. Salinity tolerance in *Brassica* oilseeds. **Plant Sciences**, v.23, n.2, p.157-174, 2004.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Tradução de H. R. GHEYI, J. F. de MEDEIROS e F. A. V. Damasceno. 2.ed. Campina Grande: UFPB, p.153, 1999. (Estudos FAO. Irrigação e Drenagem, 29).

BAI, X.; YANG, L.; YANG, Y.; AHMAD, P.; YANG, Y.; HU, X. Deciphering the protective role of nitric oxide against salt stress at the physiological and proteomic levels in maize. **Journal of Proteome Research**, v.10, p. 4349-4364, 2011.

BAKER, B. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.89-113, 2008.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, p.453-460, 2014.

BARCELO, A. R.; PEDRENO, A; MUNOZ, R; SABATER, F. Physiological significance of the binding of acidic isoperoxidases to cell walls of lupin. **Physiologia Plantarum**, v.75, p.267-274, 1989.

BARHOUMI, Z.; ATIA, A.; RABHI, M.; DJEBALL, W.; ABDELLY, C.; SMAOUI, A. Nitrogen and NaCl salinity effects on the growth and nutrient acquisition of the grasses *Aeluropus litoralis*, *Catapodium rigidum*, and *Brachypodium distachyum*. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.173, p.149-157, 2010.

BARRS, H.D.; WEATHERLEY, P.E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. **Australian Journal Biological Sciences**, v. 15, p. 413-428, 1962.

BATES, L.S.; WAKLREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline water stress studies. **Plant Soil**. v.39, p. 205-207, 1973.

BEGARA-MORALES, J. C.; SÁNCHEZ-CALVO, B.; CHAKI, M.; VALDERRAMA, R.; MATA-PÉREZ, C.; LÓPEZ-JARAMILLO, J.; PADILLA, M. N.; CARRERAS, A.; CORPAS, F. J.; BARROSO, J. B. Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. **Journal of Experimental Botany**, v.65, p.527-538, 2014.

BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. **Planta**, v.210, p.215-21, 2000.

BETHKE, P.C.; BADGER, M.R.; JONES, R.L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. **Plant Cell**, v.16, p.332-341, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CALLEGARI, O.; SANTOS, H. S.; SCAPIM, C. A. Variações do ambiente e de práticas culturais na formação de mudas e na produtividade da alface (*Lactuca sativa* L. cv. Elisa). **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 5, p. 1117-1122, 2001.

CAMPOS, F. V.; OLIVEIRA, J.; PEREIRA, M. G.; FARNESE, F. Nitric oxide and phytohormone interactions in the response of *Lactuca sativa* to salinity stress. **Planta**, v. 250, n.1, 2019.

CARILLO, P.; RAIMONDI, G.; KYRIACOU, M. C.; PANNICO, A.; EL-NAKHEL, C.; CIRILLO, V.; COLLA, G.; PASCALE, S.; ROUPHAEL, Y. Morpho-physiological and homeostatic adaptive responses triggered by omeprazole enhance lettuce tolerance to salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 249, p. 22-30, 2019.

CARRIJO, O. A.; LIZ, R. S. NOZOMU, M. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.4, p.533-535, 2002.

CARVALHO, M. F.; CORREA, M. M.; CARVALHO, G. C.; ROLIM NETO, F. C.; MARINHO, G. P. A.; ANDRADE, S. B. Enzymatic activity of three sugarcane varieties under salt stress. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.20, n.9, p.806-810, 2016.

CAVALCANTE, D. A.; JÚNIOR, B. R. D. C. L.; LIMA, A. A.; TRIBST, M. C. Sanitização de alface americana com água ozonizada para inativação de *Escherichia coli* O157:H7. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 21, n. 1, p.373-378, 2014.

CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of experimental Botany**, v.55, n.407, p.2365-2384, 2004.

CHEN, D.; WANG, S.; CAO B.; CAO, D.; LENG, G.; LI, H.; YIN, L.; SHAN, L.; DENG, X. Genotypic variation in growth and physiological response to drought stress and re-watering reveals the critical role of recovery in drought adaptation in maize seedlings. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-15, 2016.

COELHO, J. B. M.; BEZERRA NETO, E.; BARROS, M. F. C.; ALBUQUERQUE, E. R. G. M. Crescimento e acúmulo de solutos orgânicos no feijão vigna submetido ao estresse salino. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v.13/14, p.242-256, 2017.

COMETTI, N. N.; MATIAS, G.C.S.; ZONTA, E.; MARY, W.; FERNANDES, M. S. Composto nitrogenado e açúcares solúveis em tecidos de alface orgânica, hidropônica e convencional. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 4, p.748-753, 2004.

CORDEIRO, C. J. X.; LEITE NETO, J. S.; OLIVEIRA, M. K. T.; ALVES, F. A. T.; MIRANDA, F. A. C.; OLIVEIRA, F. A. Cultivo de rúcula em fibra de coco utilizando solução nutritiva salinizada enriquecida com nitrato de potássio. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 13, n.1, p. 3212-3225, 2019.

CORREA ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M.; LAMATTINA, L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. **Planta**, v.218, p.900-905, 2004.

COSTA, K. P.; SILVA, J. C. R. L.; FERNANDES, T. O. M.; FONSECA, F. S. A.; MAIA, J. T. L. S.; MARTINS, E. R. Teor de nitrato em alface produzida em sistema hidropônico vertical com substratos e NFT. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1, p. 24–28, 2018.

COVA, A. M. W.; FREITAS, F. T. O.; VIANA, P. C.; RAFAEL, M. R. S.; NETO, A. D. A.; SOARES, T. M. Content of inorganic solutes in lettuce grown with brackish water in different hydroponic systems. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 150-155, 2017.

CUNHA, A. R.; MARTINS, D. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel, SP. **Irriga**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2009.

DHARA, A.; SATISH, C. B. Nitric oxide triggers a concentration-dependent differential modulation of superoxide dismutase (FeSOD and Cu/ZnSOD) activity in sunflower seedling roots and cotyledons as an early and long distance signaling response to NaCl stress. **Plant Signal Behav.**, v.10, n.10, 2015.

DIAS, N. S.; JALES, A. G. O.; NETO, O. N. S.; GONZAGA, M. I. S.; QUEIROZ, I. S. R.; PORTO, M. A. F. Uso de rejeito da dessalinização na solução nutritiva da alface, cultivada em fibra de coco. **Revista Ceres**, v. 5, n. 5, p. 632-637, 2011.

DIAS, N. S.; LIRA, R. B.; BRITO, R. F.; NETO, O. N. S.; NETO, M. F.; OLIVEIRA, A. M. Produção de melão rendilhado em sistema hidropônico com rejeito da dessalinização de água em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 7, p. 755-761, 2010.

DIAS, N.S. **Manejo da fertirrigação e controle da salinidade em solo cultivado com melão rendilhado sob ambiente protegido**. 2004. 131p. Tese (Doutorado em Irrigação e Drenagem) -Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

DINAKAR, C.; DJILIANIV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, v.182, p.29-41, 2012.

DONG, Y. J.; JINC, S. S.; LIU, S.; XU, L. L.; KONG, J. Effects of exogenous nitric oxide on growth of cotton seedlings under NaCl stress. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.14, p.1-13,v2014.

FAHAD, S.; HUSSAIN, S.; BANO, A.; SAUD, S.; HASSAN, S.; SHAN, D.; TABASSUM, M. A. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, p.4907-4921, 2015.

FAN, H. F.; DU, C. X.; GUO, S. R. Nitric oxide enhances salt tolerance in cucumber seedlings by regulating free polyamine content. **Environmental and Experimental Botany**, v. 86, p. 52-59, 2013.

FAROOQ, M.; BASRA, S.M.A.; WAHID, A.; REHMAN, H. Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.). **Journal Agronomy Crop Science**, v.195, p. 254-261, 2009.

FATMA, M.; KHAN, N. A. Nitric oxide protects photosynthetic capacity inhibition by salinity in indian mustard. **Journal of Functional and Environmental Botany**, v. 4, p. 106-116, 2014.

FERNANDES, J. M. P.; FERNANDES, A. L. M.; DIAS, N. S.; COSME, C. R.; NASCIMENTO, L. V.; QUEIROZ, I. S. R. Salinidade da solução nutritiva na produção de alface americana em sistema hidropônico nft. **Revista Brasileira De Agricultura Irrigada**, v. 12, n.3, p. 2570-2578, 2018.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, L. G. R. **Fisiologia Vegetal: Relações Hídricas**. 1st ed. Fortaleza: Edições UFC, 1992, 138p.

FERRO, J. J. B.; COSTA CRUZ, J. M.; COSTA BARCELOS, I. S. Avaliação parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas no município de Tangará da Serra, Mato Grosso, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 1, 2012.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2008. 418 p.

FLOWERS, T. J.; TROKE, P. F.; YEO, A. R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 28, p. 89-121, 1977.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiology Plant**. v.119, p.355-364, 2003.

FREITAS, V. S.; ALENCAR, N. L. M.; LACERDA, C. F.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Changes in physiological and biochemical indicators associated with salt tolerance in cotton, sorghum and cowpea. **African Journal of Biochemistry Research**. v. 5, n. 8, p. 264-271, 2011.

FURLANI, P. R., SILVEIRA, L. C. P.; BOLONHEZI, D.; FAQUIM, V. **Cultivo hidropônico de plantas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1999. 52p.

GIANNOPOLITIS, C. N; REIS, S. K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1997.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidante machinery in abiotic stress tolerane in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, n.12, p.909-30, 2010.

GILL, S.S.; NASER, A.A.; GILL, R.; YADAV, S.; HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M.; PANCHANAND, S.C.; TUTEJA, N. Superoxide dismutase — mentor of abiotic stress tolerance in crop plants Sarvajeet Singh. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, p.10375-10394, 2015.

GROß, F.; DURNER, J.; GAUPELS, F.; Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. **Frontiers in plant Science**, v.4, 2013, 419p.

GUIMARÃES, R. F. B; MAIA JÚNIOR, S. O.; NASCIMENTO, R.; MELO, D. F.; RAMOS, J. G.; ANDRADE, J. R. Trocas gasosas em cultivares de alface crespa em cultivo hidropônico com água salina. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 13, n. 4, p. 3599-3609, 2019.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; TRAN, L. S. P. Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. **Molecular Plant**, v.8, p.1304-1320, 2015.

HASANUZZAMAN, M.; OKU, H.; NAHAR, K.; BHUYAN, M. H. M. B.; MAHMOUD, J. A.; FUJITA, M. Nitric oxide-induced salt stress tolerance in plants: ROS metabolism, signaling, and molecular interactions. **Plant Biotechnology Reports**, v.12, p.77-92, 2018.

HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, 463–499, 2000.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.125, p.189-198, 1968.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. **Tipos de alface cultivados no Brasil**. Embrapa Hortaliças, Brasília – DF, p. 1-7, 2009. (Comunicado técnico, 75).

HOPKINS, W.G. **Introduction to Plant Physiology**. 2nd edition. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999.

HUANG, X.; STETTMAIER, K.; MICHEL, C.; HUTZLER, P.; MUELLER, M.J., DURNER, J. Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v.3, p.231-245, 2004.

IEA - **Instituto de Economia Agrícola**, 2016. A produção da Agropecuária Paulista: considerações frente à anomalia climática [online]. Available from: <http://www.iea.sp.gov.br/out/>. Acessado em 20 de Maio de 2019.

IEA/CATI ANUÁRIOS– **Instituto de Economia Agrícola**. 2017. Disponível em: <http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/> Acessado em 12 de Julho de 2019.

JAMIL, M.; REHMAN, S. U.; LEE, K. J.; KIM, J. M.; KIM, H.; RHA, E. S. Salinity reduced growth PS2 photochemistry and chlorophyll content in radish. **Scientia Agrícola**. v. 64, n.2, p.111-118, 2007.

JASPERS, P.; KANGASJÄRVI, J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. **Physiology Plant**, v.138, n.4, p.405-13, 2010.

JESUS, C. G. **Estresse salino em rúcula (*Eruca sativa* Mill.) hidropônica: aspectos fisiológicos, bioquímicos e nutricionais**. Recife: UFRPE, 2011. 73p. Dissertação Mestrado.

JESUS, C. G.; SILVA JÚNIOR, F. J.; CAMARA, T. R.; SILVA, E. F. F.; WILLADINO, L. Produção de rúcula sob estresse salino em sistema hidropônico. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 493-497, 2015.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319, 1976.



KHAN, M. N.; SIDDIQUI, M. H.; MOHAMMAD, F.; NAEEM, M. Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. **Nitric oxide**, v.27, n.4, p.210-218, 2012.

KHEDR, A. H.; ABBAS, M. A.; WAHID, A. A.; QUICK, W. P. ABOGADALLAH, G. M. Proline induces the expression. Of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Panocratium maritimum* L. to salt-stress. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.392, p.2553-62, 2003.

KRAUSE, G.H., WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu Rev Plant Physiol*. **Plant Molecular Biology**,42:313-349, 1991.

KUMAR, A.; PRASAD, A.; SEDLÁROVÁ, M.; POSPÍSIL, P. Data on detection of singlet oxygen, hydroxyl radical and organic radical in *Arabidopsis thaliana*. **Data in Brief**, v. 21, p.2246–2252, 2018.

LAKZAYI, M.; SABBAGH, E.; RIGI, K.; KESHTEHGAR, A. Effect of salicylic acid on activities of antioxidant en-zymes, flowering and fruit yield and the role on reduce of drought stress. **International Journal of Farming and Allied Sciences**, v.3, n.9, p.980–987, 2014.

LI, X.; AN, S.; ENEJI, A. E.; TANABE, K. Salinity and defoliation effects on soybean growth. **Journal of Plant Nutrition**, v.29, p.1499-1508, 2006.

LIPTON, S. A; CHOI, Y. B.; PAN, Z. H.; LEI, S. Z.; CHEN, H. S. V.; SUCHER, N. J.; LOSCALZO, J.; SINGEL, D. J.; STAMLER, J. S. A redox-based mechanism for the neuroprotective effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. **Nature**, v.364, p.626-632, 1993.

LUZ, J.M.Q.; GUIMARÃES, S.T.M.R.; KORNDÖRFER, G.H. Produção hidropônica de alface em solução nutritiva com e sem silício. **Horticultura Brasileira**, v.24, n. 3, p.295-300, 2006.

MADHANIA, S.; MADAN, S.; SAWHNEY, V. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. **Biologia Plantarum**, v.50, p.227-231, 2006.

MAIA, J. M.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VOIGT, E. L.; MACÊDO, C. E. C.; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botanica Brasilica**, v.26, n.2, p.342-349, 2012.

MANAI, J.; KALAI, T.; GOUIA, H.; CORPAS, F. J. Exogenous nitric oxide (NO) ameliorates salinity-induced oxidative stress in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. **Journal Soil Science Plant Nutrition**, v.14, p. 433-446, 2014.

MÄSER, P.; GIERTH, M.; SCHROEDER, J.I. Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. **Plant and Soil**, v.247, p. 43-54, 2002.

MEDEIROS, J. F; SILVA, M. C. C.; SARMENTO, D. H. A.; BARROS, A. D. Crescimento do meloeiro cultivado sob diferentes níveis de salinidade, com e sem cobertura do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 11, n. 3, p. 248-255, 2007.

MELO, H. F.; SOUZA, E. R.; DUARTE, H. H. F.; CUNHA, J. C.; SANTOS, H. R. B. Gas exchange and photosynthetic pigments in bell pepper irrigated with saline water. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, p. 38-43, 2017.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant Cell Environment**, v.33, p. 453-467, 2010.

MINITAB Inc. **Statistical Software Data Analysis Software**. Version 17, 2014.

MONTEIRO, J. G.; CRUZ, F. J.; NARDIN, M. B.; SANTOS, D. M. M. Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, n.1, p.18-25, 2014.

MORAES, D. P.; FERNANDES, A. L. M.; DIAS, N. S.; COSME, C. R.; SOUZA NETO, O. N. Rejeito salino e solução nutritiva em alface cultivada em sistema hidropônico. **Magistra**, v.26, p.353-360, 2014.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, v. 167, n. 3, p. 645–663, 2005.

MUNNS, R. Plant Adaptations to Salt and Water Stress: Differences and Commonalities. **Advances in Botanical Research**, New York, v.57, p. 1-32, 2011.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.651-681, 2008.

MURGIA, I.; PINTO, M. C. de; DELLEDONNE, M.; SOAVE, C.; GARA, L. de. Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 777-783, 2004.

NABI, R. B. S.; TAYADE, R.; HUSSAIN, A.; KULKARNI, K. P.; IMRAN, Q. M.; MUN, B.; YUN, B. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. **Environmental and Experimental Botany**. v. 161, p. 120-133, 2019.

NEILL, S.; BARROS, R.; BRILHANTE, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.; HARRISON, J.; MORRIS, P.; RIBEIRO, D.; WILSON, I. Óxido nítrico, fechamento estomático e estresse abiótico. **Journal of Experimental Botany**, vol. 59, n. 2, p.165-176, 2008.

NEILL, S.J., DESIKAN, R., HANCOCK, J.T. Nitric oxide signaling in plants. **New Phytologist**, v.159, p.11-35, 2003.

NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T. Nitric oxide is a novel compound of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. **Plant Physiology**, v.128, p.13-16, 2002.

NETO, E. B.; BARRETO, L. P. **As técnicas de hidroponia**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, v. 8 e 9, p.107-137, 2012.

OLIVEIRA, F. A.; MEDEIROS, J. F.; OLIVEIRA, M. K. T.; SOUZA, A. A. T.; FERREIRA, J. A.; SOUZA, M. S. Interação entre salinidade e bioestimulante na cultura do feijão caupi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, p. 465-471, 2013a.

- OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, M. K. T.; LIMA, L. A.; ALVES, R. C.; RÉGIS, L. R. L.; SANTOS, S. T. Estresse salino e biorregulador vegetal em feijão caupi. **Irriga**, v. 22, n. 2, p. 314-329, 2017.
- OLIVEIRA, F. A.; SOUZA NETA, M. L.; SILVA, R. T.; SOUZA, A. A. T.; OLIVEIRA, M. K. T.; MEDEIROS, J. F. Desempenho de cultivares de rúcula sob soluções nutritivas com diferentes salinidades. **Revista Agro@mbiente**, v. 7, n. 2, p. 170-178, 2013b.
- OLIVEIRA, W. J.; SOUZA, E. R.; SANTOS, H. R. B.; SILVA, E. F. F.; DUARTE, H. H. F.; MELO, D. V. M. Fluorescência da clorofila como indicador de estresse salino em feijão caupi. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 12, n. 3, p. 2592-2063, 2018.
- PAULUS, D.; NETO, D. D.; FRIZZONE, J. A.; SOARES, T. M. Produção e indicadores fisiológicos de alface sob hidroponia com água salina. **Revista de Horticultura Brasileira**, v.28, n.1, 2010.
- PAULUS, D.; PAULUS, E.; NAVA, G. A.; MOURA, C. A. Crescimento, consumo hídrico e composição mineral de alface cultivada em hidroponia com águas salinas. **Revista Ceres**, v. 59, n.1, p. 110-117, 2012.
- PEIXOTO, H. P. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p. 137-143, 1999.
- PENG, Z.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Reciprocal regulation of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. **Molecular and General Genetics**, v.253, n.3, p.334-341, 1996.
- PLANCHET, E.; VERDU, I.; DELAHAIE, J.; CUKIER, C.; GIRARD, C.; PAVEN, M. C. M.; LIMAMI, A. M. Absciscic acid-induced nitric oxide and proline accumulation in independent under water-deficit stress during seedling establishment in *Medicago truncatula*. **Journal of Experimental Botany**, v.65, n.8, p.2161-2170, 2014.
- POTRICH, A. C. G.; PINHEIRO, R. R.; SCHMIDT, D. Alface hidropônica como alternativa de produção de alimentos de forma sustentável. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15; p. 36-48, 2012.
- PRAXEDES, S.C.; LACERDA, C.F. de; DAMATTA, F.M.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Salt tolerance is associated with differences in ion accumulation, biomass allocation and photosynthesis in cowpea cultivars. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.196, p.193-204, 2010.
- RAHMAN, A.; HOSSAIN, MD. S.; MAHMUD, J.-AL.; NAHAR, K.; HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M. Manganese-induced salt stress tolerance in rice seedlings: regulation of ion homeostasis, antioxidant defense and glyoxalase systems. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 22, p. 291–306, 2016.

RAMA DEVI, S.; PRASAD, M. N. V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. **Plant Science**, v. 138, p. 157-165, 1998.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. **Fitopatologia brasileira**, v.28, p.123-130, 2003.

RICHARDS, L.A. **Diagnosis and improvement of saline and alkali soils**. Washington: United States Salinity Laboratory, 1954. 160p. (USDA. Agriculture Handbook, 60).

RODRIGUES, L. R. F. **Cultivo pela técnica de hidroponia**: técnicas de cultivo hidropônico e de controle ambiental no manejo de pragas, doenças e nutrição vegetal em ambiente protegido, Jaboticabal: FUNEP, 2002. 726 p.

ROHÁČEK, K.; BARTÁK, M. Tehcnique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. **Photosynthetica**, v. 37, n. 03, p. 339-363, 1999.

ROSA, M. F.; SANTOS, F. J. S.; MONTENEGRO, A. A. T.; ABREU, F. A. P.; CORREIA, D.; ARAÚJO, F. B. S. **Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola**. Fortaleza, Embrapa-CNPAT. 2002. 6p. (Comunicado Técnico, 54).

ROSSATTO, T.; AMARAL, M. N.; BENITEZ, L. C.; VIGHI, I. L.; BRAGA, E. J. B.; MAGALHAES JÚNIOR, A. M.; MAIA M. A. C; PINTO, L. S. Gene expression and activity of antioxidant enzymes in rice plants, cv. BRS AG, under saline stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, n. 23, v. 4, p. 865-875, 2017.

ROY, S. J.; NEGRÃO, S.; TESTER, M. Salt resistant crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.26, p.115-124, 2014.

SAKATA. **Alface**. Disponível em: <https://www.sakata.com.br/hortalicas/folhosas/alface/crespa/vera>, acessado dia 30 de setembro de 2019.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 187-194, 2012.

SANTOS JÚNIOR, J. A.; GHEY, H. R.; DIAS, N. S.; MEDEIROS, S. S.; FILHO, D. H. G. Substratos e tempo de renovação da água residuária no crescimento do girassol ornamental em sistema semi-hidroponia. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, n.8, p.790–797, 2014.

SANTOS, A. N.; SOARES, T. M.; SILVA, E. F. F.; SILVA, D. J. R.; MONTENEGRO, A. A. A. Cultivo hidropônico de alface com água salobra subterrânea e rejeito da dessalinização em Ibimirim, PE. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.14, n.9, 2010.

SANZ, L.; ALBERTOS, P.; MATEOS, I.; SÁNCHEZ-VICENTE, I.; LECHÓN, T.; FERNÁNDEZ-MARCOS, M.; LORENZO, O. Nitric oxide (NO) and phytohormones

crosstalk during early plant development. **Journal of Experimental Botany**, v.66, n. 10, p.2857-2868, 2015.

SARMENTO, J. D. A.; MORAIS, P. L. D.; ALMEIDA, M. L. B.; SOUSA NETO O. N.; DIAS, N. da S. Qualidade e conservação da alface cultivada com rejeito da dessalinização. **Revista Caatinga**, v. 27, p. 90 – 97, 2014.

SCHREIBER, U. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. **Photosynthesis Research**, v.9, p.261-272, 1986.

SEABRA, A. B.; MAHENDRA, R.; NELSON, D. Emerging Role of Nanocarriers in Delivery of Nitric Oxide for Sustainable Agriculture. *Nanotechnologies in Food and Agriculture*. **Springer International Publishing**, p.183-207, 2015.

SERRAJ, R.; McNALLY, K. L.; SLAMET-LOEDIN, I; KOHLI, A.; HAEFELE, S. M.; ATLIN, G.; KUMAR, A. Drought Resistance Improvement in Rice: An Integrated Genetic and Resource Management Strategy. **Plant Production Science**, v. 14, 2011.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.R. Osmolyte Accumulation: Can It Really Help Increase Crop Yield under Drought Conditions? **Plant, Cell & Environment**, v.25, p.333-341, 2002.

SGARBIERI, V. C. **Alimentação e Nutrição**: fator de saúde e desenvolvimento. 1.ed. Campinas: UNICAMP, 387p, 1987.

SHAFI, A.; CHAUHAN, R.; GILL, T.; SWARNKAR, M. K.; SREENIVASULU, Y.; KUMAR, S.; KUMAR, N.; SHANKAR, R.; AHUJA, P. S.; SINGH, A. K. Expression of SOD and APX genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in Arabidopsis under salt stress. **Plant Molecular Biology**, v.87, p.615-631, 2015.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidante defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v.12, 2012, 26p.

SHEOKAND, S.; KUMARI, A. (2015) **Nitric Oxide and Abiotic Stress-Induced Oxidative Stress**. In: KHAN, M.; MOBIN, M.; MOHAMMAD, F.; CORPAS, F. (eds) *Nitric oxide action in abiotic*, Springer, Heidelberg. p. 43-63.

SHI, H.; YE, T.; ZHU, J.; CHAN, Z. Constitutive production of nitric oxide leads to enhanced drought stress resistance and extensive transcriptional reprogramming in *Arabidopsis*. **Journal Experimental Botany**, v.65, n.15, p.4119-4131, 2014.

SHI, Q.; DING, F.; WANG, X.; WEI, M. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. **Plant Physiology and biochemistry**, v.45, p. 542-550, 2007.

SILVA, B. A.; SILVA, A. R.; PAGIUCA, L. G. Cultivo Protegido: Em busca de mais eficiência produtiva! **Revista Técnica Hortifruti Brasil**, p.10-18, 2014. Disponível em: [http://cepea.esalq.usp.br/hfbrasil/edicoes/132/mat\\_capa.pdf](http://cepea.esalq.usp.br/hfbrasil/edicoes/132/mat_capa.pdf) Acesso 12 de Julho de 2019.

SILVA, E.N. da; RIBEIRO, R.V.; FERREIRA-SILVA, S.L.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. **Journal of Arid Environments**, v.74, p.1130-1137, 2010.

SILVA, J. L. A.; MEDEIROS, J. F.; ALVES, S. S. V.; OLIVEIRA, F. A.; SILVA JUNIOR, M. J.; NASCIMENTO, I. B. Uso de águas salinas como alternativa na irrigação e produção de forragem no semiárido nordestino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, (Suplemento), p. S66-S72, 2014.

SILVEIRA, N. M.; FRUNGILLO, L.; MARCOS, F. C.; PELEGRINO, M. T.; MIRANDA, M. T.; SEABRA, A. B.; SALGADO, I.; MACHADO, E. C.; RIBEIRO, R. V. Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. **Planta**, v.244, p.181-190, 2016.

SOARES, T. M.; SILVA, E. F. F.; DUARTE, S. N.; MELO, R. F.; JORGE, C. A.; BONFIM-SILVA, E. M. Produção de alface utilizando águas salobras em sistema hidropônico. **Irriga**, v.12, p.235-248, 2007.

SONG, L.; DING, W.; ZHAO, M.; SUN, B.; ZHANG, L. Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. **Plant Science**, v.171, p.449-458, 2006.

SOUTO FILHO, L. T.; LAIME, E. M. O.; FERNANDES, P. D.; SUASSUNA, J. F.; SILVA, R. C. Efeito da salinidade nas trocas gasosas de duas cultivares de cana-de-açúcar. **Engenharia Ambiental**, v.11, n.2, p.067-082, 2014.

SRIPORNADULSIL, S.; TRAINA, S.; VERMA, D. P. S.; SAYRE, R. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. **Plant Cell**, v.14, n.11, p.2837-2847, 2002.

SU, J.; ZHANG, Y.; NIE, Y.; CHENG, D.; WANG, R.; HUALI, H.; CHEN, J.; ZHANG, J.; DU, Y.; SHEN, W. Hydrogen-induced osmotic tolerance is associated with nitric oxide-mediated proline accumulation and reestablishment of redox balance in alfalfa seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v.147, p.249-260, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Piracicaba, Artmed, 2017, 888p.

TALUKDAR, D. Arsenic-induced oxidative stress in the common bean legume, *Phaseolus vulgaris* L. seedlings and its amelioration by exogenous nitric oxide. **Physiology molecular biology plants**, v.19, n.1, p.69,79, 2013.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, v. 153, p. 65–72, 2000.

TESTER M.; DAVENPORT R. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transportin higher plants. **Annals of Botany**, v. 91, p.503–527, 2003.

TURKAN, I. Plant responses to drought and salinity stress: developments in post-genomic Era. In: TURKAN, I. (Ed) **Advances in botanical research**. London: Elsevier, v. 57, p.105-150, 2011.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v.35, p.753-759, 2008.

VON CAEMMERER, S.; FARQUHAR, G. D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**, v.153: 376-387, 1981.

VRANOVÁ, E.; ATICHARTPONGKUL, S.; VILLARROEL, R.; MONTAGU, M. V.; INZÉ, D.; CAMP, W. V. **Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress** PNAS, v.99, p. 10870-10875, 2002.

WANG, P.; Du, Y.; HOU, Y. J.; ZHAO, Y.; HSU, C. C.; YUAN, F.; ZHU, J. K. Nitric oxide negatively regulates abscisic acid signaling in guard cells by S-nitrosylation of OST1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.112, p.613-618, 2015.

WELLBURN, A.R. 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**. v.144, p.307-313, 1994.

XUE, Q.W.; WEISS, A.; BAENZIGER, P.S. Predicting leaf appearance in field-grown winter wheat: evaluating linear and non-linear models. **Ecological Modelling**, v.175, p.261-270, 2004.

ZEMRI, K.; AMAR, Y.; BOUTIBA, Z.; ZEMRI, M.; POPOVIC, R. Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the effect of chromium on activity photosystem ii at the alga *scenedesmus obliquus*. **International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences**, v.12, p.304-314, 2012.

ZHANG, H.X.; BLUMWALD, E. Transgenic Salt-Tolerant Tomato Plants Accumulate Salt in Foliage But Not in Fruit. **Nature Biotechnology**, v. 19, p.765-768, 2001.

ZHAO, L.; ZHANG, F.; GUO J.; YANG, Y.; LI, B.; ZHANG, L. Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. **Plant Physiology**, v.134, p.849-57, 2004.