

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
SEMENTES



Tese

**EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE ALFACE ROXA: INDUÇÃO DE
TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO EM ALFACE**

Cristiane Deuner

Pelotas, 2017

Cristiane Deuner

Extrato aquoso de folhas de alface roxa: indução de tolerância ao estresse salino em alface

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Géri Eduardo Meneghello

Co-orientadores: Dr. Francisco Amaral Villela

Dr. Sidnei Deuner

Pelotas, 2017

Cristiane Deuner

Extrato aquoso de folhas de alface roxa: indução de tolerância ao estresse
salino em alface

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 03 de março de 2017

Banca Examinadora:

.....
Engº. Agrº., Dr. Géri Eduardo Meneghello (Orientador)
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Bióloga, Dra. Andréia da Silva Almeida
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof. Dr. Flávio Reina Abib
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof. Dr. Fernanda Reolon
Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof. Dra. Vera Lúcia Bobrowski
Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande Sul

Dedico este trabalho aos meus pais, pelos ensinamentos, educação e caráter
que me deram e ajudaram a construir.

Ao meu marido Vinicius, por estar sempre ao meu lado, me apoiando em
todos os momentos com palavras de afeto e incentivo.

Aos meus amigos e colegas Carolina Borges e César Castellanos, por todo
apoio físico e intelectual empregado para a realização deste trabalho.

Agradecimentos

À Deus, pelo privilégio da vida e bênçãos alcançadas.

À minha família pelo apoio, incentivo e confiança.

Ao Dr. Géri Eduardo Meneghello, Dr. Francisco Amaral Villela e Dr. Sidnei Deuner, pela orientação, suporte e auxílio.

Aos colegas e amigos pela amizade e ajuda prestada sempre que necessário.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Laboratório Didático de Análise de Sementes, pela colaboração e pelo suporte.

À professora Dra. Vera Lúcia Bobrowski por auxiliar na execução de parte deste trabalho.

Aos alunos dos Laboratórios de Relações Hídricas e de Genética pela ajuda e suporte técnico.

A todos que de uma forma ou outra me apoiaram na realização deste Curso.

Obrigada.

Resumo

DEUNER, Cristiane. **Extrato aquoso de folhas de alface roxa: indução de tolerância ao estresse salino em alface.** 2017. 84f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

O estresse salino afeta negativamente a manifestação do potencial fisiológico pela germinação, vigor das sementes e redução no desenvolvimento das plântulas. Além disso, a salinidade pode comprometer a divisão celular, inibindo o índice mitótico e causando anormalidades cromossômicas, bem como aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio. As plantas, por sua vez, podem reagir a esse estresse com ajustes morfológicos, bioquímicos, fisiológicos, celular e molecular, sendo que determinados ajustes podem ser induzidos por uma ampla variedade de metabólitos secundários produzidos para a defesa natural da planta. Substâncias como o β-caroteno, as vitaminas C e E e os compostos fenólicos estão relacionados à capacidade antioxidante de inúmeros vegetais e auxiliam a diminuir os efeitos causados pela salinidade. Nesse âmbito, extratos de plantas têm sido estudados, visto que o mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos vegetais, possui um importante papel na redução da oxidação lipídica em tecidos vegetal e animal, sob condições de estresse. A alface é a hortaliça folhosa mais importante no Brasil e além de vitaminas e sais minerais, possui carotenoides e alto teor de compostos fenólicos. As variedades roxas possuem ainda, grande quantidade de antocianinas, o que lhes confere maior atividade antioxidante. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o efeito do extrato de folhas de alface roxa sobre a qualidade fisiológica, atividade citogenética e antioxidante durante a germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas de alface, submetidas a diferentes concentrações salinas, buscando elucidar possíveis mecanismos de tolerância que poderão servir de base para estudos futuros com outras culturas. Foram realizados experimentos em laboratório e casa de vegetação, onde plântulas de alface, cultivar Regina, foram submetidas, durante os estádios iniciais de desenvolvimento à diferentes concentrações de extrato de folhas de alface roxa combinado ou não a soluções salinas, sendo avaliados parâmetros relacionados à germinação, produção de biomassa, divisão celular e atividade antioxidante. O uso de extrato de folhas de alface roxa proporciona incrementos na germinação das sementes, auxilia o desenvolvimento inicial das plântulas, bem como diminui o estresse oxidativo causado pelo sal, justificado pelo aumento no índice de clorofila e de nitrogênio e pela menor concentração de sódio nas folhas. O extrato de alface roxa não afeta o índice mitótico, diminui o índice de células em prófase e aumenta a incidência das células em telófase de raízes de alface. O estresse salino afeta negativamente o desenvolvimento das plântulas de alface.

Palavras-chave: *Lactuca sativa L.*, salinidade, germinação, citogenética, atividade antioxidante

Abstract

DEUNER, Cristiane. **Aqueous extract of purple lettuce leaf: inducing tolerance to salt stress in lettuce.** 2017. 84f. Thesis (Doctorate in Science and Seed Technology)

- Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Salt stress negatively affects the manifestation of physiological potential for germination, seed vigor and reduced seedling development. Moreover, the salinity can affect cell division by inhibiting the mitotic index and causing chromosomal abnormalities, as well as increase the production of reactive oxygen species. Plants, in turn, can react to this stress with morphological adjustments, biochemical, physiologic, cellular and molecular, and some of these adjustments can be induced by a wide variety of secondary metabolites that is produced for the plant's natural defense. Substances such as β -carotene, vitamins C and E and phenolic compounds are related to the antioxidant capacity of various vegetables and help to reduce the effects caused by salinity. In this scope, plant extracts have been studied, since the mechanism of action of antioxidants present in plant extracts, it has an important role in reducing lipid oxidation in plant and animal tissues, under stress conditions. Lettuce is the hardwoods vegetable more important in Brazil, beyond of vitamins and minerals, has carotenoids and a high content of phenolic compounds. Purple varieties have also a lot of anthocyanins, which gives them greater antioxidant activity. The aim of this study was to characterize the effect of purple lettuce leaf extract on the physiological quality, cytogenetics and antioxidant activity during germination and initial growth of lettuce seedlings, under different salt concentrations, to elucidate possible mechanisms of tolerance which may serve as a basis for future studies with other cultures. Experiments were performed in the laboratory and greenhouse, where lettuce seedlings, cultivar Regina, were submitted during the initial stages of development, a different concentrations of purple lettuce leaf extract combined or not with salt solutions, being evaluated parameters related to germination, biomass production, cell division and antioxidant activity. The use of purple lettuce extract provides increases in seed germination, assists the early development of seedlings, as well as decreases the oxidative stress caused by the salt, justified by the increase in the chlorophyll and nitrogen index and by the lower concentration of sodium in the leaves. The purple lettuce extract does not affect the mitotic index, reduces the cell index in prophase and increases the incidence of cells in telophase of lettuce roots. Salt stress negatively affects the development of lettuce seedlings.

Key-words: *Lactuca sativa* L., salinity, germination, cytogenetics, antioxidant activity

Lista de Figuras

Figura 1. Germinação (G) e primeira contagem de germinação (PCG) de sementes de alface, cv. Regina, cultivadas na presença de extrato aquoso de alface roxa e NaCl. Coluna da esquerda (A, C) - Efeito do extrato; Coluna da direita (B, D) - Efeito do sal.....	25
Figura 2. Comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) de sementes de alface, cv. Regina, cultivadas na presença de extrato aquoso de alface roxa e NaCl. Coluna da esquerda (A, C) - Efeito do extrato; Coluna da direita (B, D) - Efeito do sal.....	26
Figura 3. Massa seca total (MST) de plântulas oriundas de sementes de alface, cv. Regina, cultivadas na presença de extrato aquoso de alface roxa e NaCl. Coluna da esquerda (A) - Efeito do extrato; Coluna da direita (B) - Efeito do sal.....	27
Figura 4. Emergência (E) e índice de velocidade de emergência (IVE) de plântulas de alface, cv. Regina, cultivadas na presença de extrato aquoso de alface roxa e NaCl.....	28
Figura 5. Área foliar (AF) de plântulas de alface, cv. Regina, cultivadas na presença de extrato aquoso de alface roxa e NaCl. Coluna da esquerda (A) - 14 DAS - dias após semeadura; Coluna da direita (B) - 21 DAS - dias após semeadura.....	29
Figura 6. Desenvolvimento das plântulas de alface (24 dias após a semeadura).....	29
Figura 7. Comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca (MFPA) e seca da parte aérea (MSPA) de plântulas de alface, cv. Regina, cultivadas na presença de extrato aquoso de alface roxa e NaCl.....	30
Figura 8. Volume de raiz (A) e Massa seca da raiz (B) de plântulas de alface, cv. Regina, cultivadas na presença de extrato aquoso de alface roxa e NaCl.....	31
Figura 9. Índice mitótico em células de raízes de alface provenientes de sementes submetidas a diferentes concentrações de extrato aquoso de alface roxa e NaCl. Coluna da esquerda (A) - Efeito do extrato; Coluna da direita (B) - Efeito do sal.....	41
Figura 10. Índice de fases da mitose com a porcentagem de células em divisão (P=prófase, M=metáfase, A=anáfase, T=telofase). Coluna da esquerda (A) - Efeito do extrato; Coluna da direita (B) - Efeito do sal.....	42
Figura 11. Fases da mitose: prófase (A), metáfase (B), anáfase (C) e telofase (D).....	42

Figura 12. Índice de aberrações cromossômicas em células de raízes de alface provenientes de sementes submetidas a diferentes concentrações de extrato aquoso de alface roxa e NaCl. Coluna da esquerda (A) - Efeito do extrato; Coluna da direita (B)	Efeito do sal.....	43
Figura 13. Aberrações cromossômicas de raízes de alface germinadas em diferentes concentrações de extrato aquoso de alface roxa e NaCl. A,B: Ponte anafásica; C: cromossomo solto; D: cromossomo em anel; E: prófase desorganizada; F: cromossomos desconectados; G: metáfases desorganizadas.....	44
Figura 14. Índice de clorofila, flavonoides, antocianinas e nitrogênio em folhas de alface provenientes de plântulas cultivadas sob diferentes concentrações de extrato aquoso de alface roxa e de NaCl.....	55
Figura 15. Plântulas de alface, cv. Regina, cultivas sob diferentes concentrações de extrato aquoso de alface roxa e NaCl.....	56
Figura 16. Teor de sódio em folhas de plântulas de alface cultivadas sob diferentes concentrações de extrato aquoso de alface roxa e de NaCl.....	57
Figura 17. Potencial osmótico em plântulas de alface provenientes de plântulas cultivadas sob diferentes concentrações de extrato aquoso de alface roxa e de NaCl.....	57
Figura 18. Peroxidação lipídica na parte aérea (A) e raiz (B) de plântulas de alface provenientes de sementes cultivadas sob diferentes concentrações de extrato aquoso de alface roxa e de NaCl.....	58
Figura 19. Peróxido de hidrogênio na parte aérea (A) e raiz (B, C) de plântulas de alface provenientes de sementes cultivadas sob diferentes concentrações de extrato aquoso de alface roxa e de NaCl.....	59
Figura 20. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na parte aérea (A e B) e raiz (C) de plântulas de alface provenientes de sementes cultivadas sob diferentes concentrações de extrato aquoso de alface roxa e de NaCl.....	60
Figura 21. Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) na parte aérea (A) e raiz (B) de plântulas de alface provenientes de sementes cultivadas sob diferentes concentrações de extrato aquoso de alface roxa e de NaCl.....	61
Figura 22. Atividade da enzima catalase (CAT) na parte aérea (A) e raiz (B) de plântulas de alface provenientes de sementes cultivadas sob diferentes concentrações de extrato aquoso de alface roxa e de NaCl.....	62
Figura 23. Preparação dos extratos.....	81

Figura 24. Avaliação da atividade citogenética.....	81
Figura 25. Germinação de sementes de alface, cv. Regina, em papel umedecido com diferentes concentrações de extrato de alface roxa e NaCl, de forma isolada e na combinação dos dois fatores.....	83
Figura 26. Desenvolvimento de plântulas de alface (24 dias após a semeadura), cv. Regina, cultivadas sob diferentes concentrações de extrato de alface roxa e NaCl, de forma isolada e na combinação dos dois fatores.....	83
Figura 27. Desenvolvimento das plântulas de alface aos 24 dias após a semeadura.....	84

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores de p (<0.05%) das variáveis germinação (G), primeira contagem da germinação (PCG), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR) e massa seca total (MS) do experimento I, capítulo 1.....	95
Tabela 2. Valores de p (<0.05%) das variáveis emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), área foliar 1 (AF1) e área foliar 2 (AF2) do experimento II, capítulo 1.....	95
Tabela 3. Valores de p (<0.05%) das variáveis comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), volume da raiz (VR) e massa seca raiz (MR) do experimento II, capítulo 1.....	95
Tabela 4: Valores de p (<0.05%) das variáveis índice mitótico (IM) e índice de aberrações cromossômicas (IAC).....	95
Tabela 5: Valores de p (<0.05%) das variáveis índice de clorofila (IC), índice de flavonoides (IF), índice de antocianinas (IA) e índice de nitrogênio (IN).....	96
Tabela 6: Valores de p (<0.05%) das variáveis teor de sódio (Na) e potencial osmótico (Ψ_s).....	96
Tabela 7: Valores de p (<0.05%) das variáveis peroxidação lipídica (PL), peróxido de hidrogênio (PH), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) da parte aérea de plântulas de alface.....	96
Tabela 8: Valores de p (<0.05%) das variáveis peroxidação lipídica (PL), peróxido de hidrogênio (PH), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) da raiz de plântulas de alface.....	96

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Ação potencializadora do extrato de folhas de alface roxa na qualidade fisiológica de sementes de alface submetidas a estresse salino	18
2.1 Introdução	18
2.2 Material e métodos	20
2.3 Resultados	24
2.4 Discussão.....	31
2.5 Conclusões	35
3. Efeito do extrato aquoso de folhas de alface roxa na atividade citogenética de raízes de alface sob estresse salino.....	37
3.1 Introdução	37
3.2 Material e métodos	38
3.3 Resultados	40
3.4 Discussão.....	44
3.5 Conclusões	47
4. Respostas bioquímicas em alface submetida a estresse salino e à aplicação de extrato aquoso de folhas de alface roxa.....	49
4.1 Introdução	49
4.2 Material e métodos	51
4.3 Resultados	54
4.4 Discussão.....	62
4.5 Conclusões	65
5. Considerações Finais.....	66
6. Referências.....	67
APÊNDICES	78

Introdução

O crescimento rápido e contínuo da população mundial, que já ultrapassa os sete bilhões de habitantes, em um planeta que parece cada vez menor, tem sérias implicações em quase todos os aspectos da vida, sendo o abastecimento insuficiente de alimentos um dos mais expressivos, seja pela má distribuição dos mesmos ou por fatores ambientais adversos que prejudicam as culturas. Segundo estimativa da FAO (Food and Agriculture Organization), em 2050, a população mundial deverá atingir em torno de 9,3 bilhões de pessoas e frente a esse crescimento populacional, a agricultura tem grandes e novos desafios para que haja uma produção de alimentos que atenda essa demanda populacional, sem contar a produção de biomassa para gerar energia, como é o caso do etanol e do biodiesel.

Segundo Ashraf e Harris (2004), os estresses ambientais limitam a produtividade agrícola ou ocasionam a redução de biomassa vegetal. Sob a perspectiva da fisiologia, o estresse é uma condição causada por um ou mais fatores, que tendem a alterar o equilíbrio de um organismo. Dentre os diversos tipos de estresses que as plantas estão sujeitas, a salinidade dos solos pode causar expressiva queda na produtividade de certas culturas. Considerando a escassez de novas fronteiras agrícolas, cada vez mais será necessário usar áreas com estas características para a produção agrícola.

A salinidade pode ser definida como a situação de excesso de sais solúveis, sódio trocável ou ambos em horizontes ou camada superficiais, afetando o desenvolvimento vegetal (RIBEIRO et al., 2009). Nos solos agricultáveis, o problema da salinidade está relacionado às respostas das plantas quanto a aspectos fisiológicos, afetando o desenvolvimento desde a germinação, provocando redução na produtividade e, em casos mais severos, podendo levar à morte (FARIAS, 2008).

O termo salino aplica-se a solos cuja condutividade elétrica é maior que 4mmhos cm⁻² a 25 °C (ALLISON et al., 1985), sendo possível classificar as plantas quanto à capacidade de sobreviver em ambientes salinos. Enquanto plantas halófitas são capazes de crescer em solos com concentrações de sais de até 20%, as glicófitas, que envolvem a maioria das plantas cultivadas, têm seu crescimento inibido em concentrações da ordem de 0,3% a 0,5%. A tolerância à salinidade é variável entre espécies e, mesmo em uma mesma espécie, entre estádios de desenvolvimento, em cada fase a tolerância à salinidade é controlada por mais de um gene e altamente

influenciada por fatores ambientais (FLOWERS, 2004; FLOWERS e FLOWERS, 2005; MUNNS, 2005); entretanto, os efeitos dependem ainda, dos tipos de sais, intensidade e duração do estresse salino, manejo cultural e da irrigação e condições edafoclimáticas (TESTER e DAVENPORT, 2003; MUNNS, 2005; TAIZ e ZEIGER, 2013).

Estudos realizados com repolho demonstram que o estresse salino afeta negativamente a manifestação do potencial fisiológico pela germinação, vigor das sementes e redução no desenvolvimento das plântulas da parte aérea e da raiz (BERNARDES et al., 2015). Em melão, concentrações elevadas de cloreto de sódio provocaram redução da velocidade de emergência e do crescimento das plântulas (SOARES et al., 2010). Ao avaliarem a produção de alface em hidroponia com água salina, Paulus et al. (2010), também observaram resposta linear e decrescente em duas cultivares de alface, constatando que houve redução da massa fresca.

Além disso, a salinidade pode afetar a divisão celular, inibindo o índice mitótico, e causando anormalidades cromossômicas. O índice mitótico tem se mostrado um parâmetro importante para se avaliar os efeitos que agentes químicos causam no ciclo celular (SMAKA-KINCL et al., 1996; SOBRAL et al., 2013). De acordo com Bagatini et al. (2007) e Fonseca et al. (2000), estudos citogenéticos de espécies vegetais informam a respeito de possíveis alterações cromossômicas decorrentes do próprio metabolismo ou devido à presença de agentes mutagênicos.

As plantas, por sua vez, podem reagir ao estresse salino com ajustes morfológicos, bioquímicos, fisiológicos, celular e molecular (RADIC et al., 2005; TABUR e DEMIR, 2010; PEREZ-CLEMENTE et al., 2013). Segundo Rêgo Júnior et al. (2011), uma ampla variedade de metabólitos secundários é produzida para a defesa natural da planta sob estresses. Durante períodos de crescimento sob condições normais e de estresse moderado, as plantas ativam sistemas antioxidativos de defesa presentes em diversos compartimentos subcelulares que, usualmente, são suficientes para evitar o dano oxidativo (BRAY et al., 2000). Entretanto, quando estressadas severamente, há um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e outros compostos oxidantes, pelo acúmulo de intermediários reativos, prejudicando o sistema de defesa antioxidante e a capacidade para reparar o dano oxidativo (OBA et al., 2009).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que em pequenas concentrações, em comparação ao substrato oxidável, retardam ou previnem

significativamente o início ou a propagação da cadeia de reações de oxidação (BIANCHI e ANTUNES, 1999). As plantas têm sistemas antioxidativos de defesa não enzimáticos e enzimáticos. Os sistemas não enzimáticos são compostos naturais, denominados substâncias bioativas, que incluem os fenólicos, terpenos, carotenoides e o ácido ascórbico que fazem parte da constituição de diversos alimentos (MELO e GUERRA, 2002). Os enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, redutase do monodesidroascorbato, redutase do desidroascorbato e redutase da glutationa (SHALATA et al., 2001).

Estudos têm demonstrado que o β-caroteno, as vitaminas C e E e os compostos fenólicos estão relacionados à capacidade antioxidant de várias espécies vegetais (McDONALD et al., 2001). De acordo com Selene et al. (2009), diversos extratos de plantas têm sido estudados devido ao poder antioxidant, visto que o mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos vegetal e animal (ANGELO e JORGE, 2007), sob condições de estresse.

A alface (*Lactuca sativa* L.), considerada a hortaliça folhosa de maior importância no Brasil, é bastante consumida em todo o mundo e amplamente cultivada em muitos países (CAMILI et al., 2013). Essa hortaliça é a preferida pelos pequenos produtores devido a sua larga adaptação às condições climáticas adversas, à possibilidade de cultivos sucessivos no mesmo ano (MEDEIROS et al., 2007), ao baixo custo de produção, à reduzida suscetibilidade a pragas e doenças, à comercialização segura, bem como pelas suas fontes nutricionais, fatores que lhe conferem grande importância econômica e social (CEASA, 2006). As folhas são geralmente consumidas cruas em saladas, e têm maioritariamente água na sua composição, mas podem ser consideradas uma boa fonte de vitaminas e sais minerais, principalmente vitamina A, além de conter vitaminas B1, B2 e C, cálcio e ferro (FERNANDES et al., 2002). Possui também carotenoides, elevado teor de compostos fenólicos e alta atividade antioxidant (COLLINS, 2004; TIVERON, 2010). As variedades roxas possuem ainda grande quantidade de antocianinas, o que lhes confere maior atividade antioxidant (RICE-EVANS et al., 1997).

De acordo com Ayers e Westcot (1999), a alface é moderadamente sensível à salinidade. Sendo assim, pode ser considerada uma planta-teste para avaliar os potenciais efeitos do extrato vegetal sobre a germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas, sob estresse salino; uma vez que, ao longo da

evolução, as plantas desenvolveram mecanismos que as permitem perceber as condições adversas, ativando cascatas de transdução de sinais, as quais, consequentemente, acionam vias de resposta ao estresse, levando a mudanças fisiológicas e bioquímicas. Desta forma, a ativação destas vias pode mitigar o efeito do estresse, levando ao ajustamento celular e à tolerância da planta. No entanto, o modo como as plantas aclimatizam-se frente à salinidade ainda não está totalmente compreendido em níveis fisiológico, bioquímico e, principalmente, genético. Assim, estudos que identifiquem e que permitam o entendimento dos mecanismos de defesa das plantas contra a alta salinidade são de extrema importância, a fim de garantir a sustentabilidade das culturas nas áreas com esta característica.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o efeito do extrato de folhas de alface roxa sobre a qualidade fisiológica, atividade citogenética e antioxidante durante a germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas de alface, submetidas a diferentes concentrações salinas, buscando elucidar possíveis mecanismos de tolerância que poderão servir de base para estudos futuros com outras culturas.

CAPÍTULO 1

**AÇÃO POTENCIALIZADORA DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE
ALFACE ROXA NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ALFACE
SUBMETIDAS A ESTRESSE SALINO**

2. Ação potencializadora do extrato de folhas de alface roxa na qualidade fisiológica de sementes de alface submetidas a estresse salino

2.1 Introdução

O estresse salino envolve alterações em vários processos fisiológicos e metabólicos, dependendo da intensidade e da duração do estresse, podendo inibir a produção das culturas (ROZEMA e FLOWERS, 2008; JAMES et al., 2011). De acordo com Ribeiro et al. (2009), a salinidade pode ser definida como a situação de excesso de sais solúveis, sódio trocável ou ambos em horizontes ou camadas superficiais do solo, afetando o desenvolvimento vegetal. Os altos teores de sais solúveis, especialmente o cloreto de sódio (NaCl), provocam redução do potencial hídrico do substrato, induzindo menor capacidade de absorção de água pelas sementes, podendo reduzir a percentagem ou até mesmo inibir a germinação, em função dos efeitos osmóticos e tóxicos (SECCO et al., 2010). Além disso, com o estresse salino, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é reforçada nas plantas (APEL e HIRT, 2004), podendo conduzir a danos oxidativos em vários componentes celulares tais como proteínas, lipídios e DNA, interrompendo funções celulares vitais (GUPTA e HUANG, 2014).

Avaliando a germinação de sementes de couve chinesa sob influência do teor de água e estresse salino, Lopes e Macedo (2008), concluíram que a salinidade afeta negativamente a manifestação do potencial fisiológico pela germinação e o vigor das sementes. A diminuição da porcentagem de germinação das sementes pode estar ligada à dificuldade de absorção da água, devido a potenciais hídricos muito negativos, especialmente no início da imbibição, influenciando a absorção de água, podendo inviabilizar a sequência de eventos relacionados ao processo germinativo (MOTERLE et al., 2006). Ainda, conforme observado por Rodrigues et al. (2015), a utilização de níveis

crescentes de sais na água de irrigação influencia o desenvolvimento das cultivares de alface, diminuindo linearmente as massas fresca e seca da parte aérea, o número de folhas e a massa seca da raiz. Segundo Ferreira et al. (2001) e Cavalcante et al. (2010), o estresse salino provoca a redução do desenvolvimento vegetal em função dos desequilíbrios nutricionais, na absorção e transporte de nutrientes, provocados pelo excesso de sais. Farias et al. (2009) afirmam que a salinidade, reduz a atividade dos íons em solução e altera os processos de absorção, transporte, assimilação e distribuição de nutrientes na planta.

Entretanto, as plantas respondem de formas diferentes ao estresse salino, e como defesa, adaptam-se por meio de diferentes mecanismos, com mudanças no padrão morfológico e de desenvolvimento, bem como respostas fisiológicas e bioquímicas (BOHNERT et al., 1995). Um mecanismo que as plantas desenvolveram para crescer sob condições de estresse é a produção de uma ampla variedade de metabólitos secundários (RÊGO JÚNIOR et al., 2011), que auxiliam na detoxificação das EROs.

Vários estudos já foram conduzidos abordando as propriedades antioxidantes de frutas, hortaliças e plantas medicinais (OLIVEIRA et al., 2007; ARBOS et al., 2010; FORMAGIO et al., 2014). Substâncias como o β -caroteno, as vitaminas C e E e os compostos fenólicos estão relacionados à capacidade antioxidante de vários vegetais (McDONALD et al., 2001). Além disso, protetores endógenos, tais como osmoprotetores, hormônios vegetais e os antioxidantes têm sido eficazes na redução dos danos induzidos pelo sal nas plantas (AHMAD et al., 2010; HOSSAIN et al., 2011; IQBAL et al., 2012; IOANNIDIS et al., 2012).

Estudando a aplicação de extrato de raízes de cenoura na indução de tolerância a salinidade em plântulas de feijão caupi, Abbas e Akladious (2013), constataram que a embebição das sementes no extrato de cenoura, proporcionou um aumento no crescimento da planta, no rendimento, bem como na tolerância ao estresse salino. Salientam ainda que os resultados dos efeitos benéficos do extrato de raízes de cenoura contra o estresse abiótico podem, em parte, ter sido provocados pelo seu conteúdo bioativo e componentes

nutricionais, visto que a raiz contém antocianina, aminoácidos, prolina, açúcar, carotenoides, flavonas, proteínas e fibras.

A alface (*Lactuca sativa L.*), considerada a hortaliça folhosa de maior importância no Brasil, é bastante consumida em todo o mundo e amplamente cultivada em muitos países (CAMILI et al., 2013). Assim como a cenoura, possui alto valor nutritivo, contendo carotenoides, vitamina C e alto teor de compostos fenólicos (COLLINS, 2004). As variedades vermelhas ou roxas possuem ainda grande quantidade de antocianinas, o que lhes confere maior atividade antioxidante (RICE-EVANS et al., 1997).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar uma possível ação potencializadora do extrato aquoso de folhas de alface roxa sobre a qualidade fisiológica, durante a germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas de alface, submetidas a estresse salino.

2.2 Material e métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório Didático de Análise de Sementes (Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel), Laboratório de Nutrição de Plantas (Departamento de Botânica, Instituto de Biologia) e em casa de vegetação da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS. O material vegetal utilizado foram sementes de alface, cv. Regina e extrato aquoso de folhas de alface roxa, sendo conduzidos dois experimentos, a saber:

Experimento I: para avaliar a qualidade fisiológica durante a germinação das sementes de alface, cv. Regina em condições controladas de câmara de crescimento (BOD), foram testadas quatro concentrações de extrato aquoso de alface roxa (0, 50, 100 e 150g de folhas de alface L⁻¹ água) combinadas com cinco concentrações (0, 30, 60, 90 e 120mM) de cloreto de sódio (NaCl), constituindo 20 tratamentos, sendo água destilada (combinação do nível zero para os dois fatores) o controle. Para a obtenção dos extratos de alface roxa, utilizaram-se plantas adquiridas em uma fruteira local, no mesmo dia da sua utilização, observando que estivessem em bom estado sanitário. Inicialmente, as

folhas foram lavadas em água destilada, e em seguida realizada a secagem com papel toalha. Após, as folhas foram pesadas, conforme cada tratamento, e trituradas em liquidificador de plástico, com pás metálicas, contendo água destilada, durante dois minutos. Os extratos obtidos foram filtrados em papel filtro, para então serem utilizados na condução dos testes, sendo todo o preparo feito em laboratório, com temperatura constante de 25 °C e sob iluminação de luz branca. A combinação dos fatores foi realizada adicionando-se a quantidade correspondente de NaCl, conforme cada tratamento, aos extratos de alface roxa, antes de proceder a realização dos testes.

A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada através dos seguintes testes: a) *Germinação (G)*: realizada com quatro repetições de 50 sementes por tratamento, em caixas plásticas transparentes, sobre duas folhas de papel mataborrão umedecido com 2,5 vezes o peso do papel seco com os referidos tratamentos, colocadas em germinador regulado à temperatura constante de 20 °C e fotoperíodo de 12h. As contagens foram efetuadas no quarto e sétimo dia, de acordo com as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009), computando-se as porcentagens de plântulas normais para cada repetição. b) *Primeira contagem de germinação (PCG)*: realizada juntamente ao teste de germinação, efetuada no quarto dia após a semeadura. As avaliações foram efetuadas de acordo com as RAS (BRASIL, 2009), computando-se as porcentagens de plântulas normais para cada repetição. c) *Comprimento de parte aérea e radicular (CPA e CR)*: realizado conforme metodologia para o teste de germinação, com quatro subamostras de 15 plântulas para cada tratamento, das quais foi medido o comprimento da parte aérea e da raiz principal, no sétimo dia após a semeadura, com auxílio de uma régua graduada (mm). d) *Massa seca total (MST)*: realizada com as mesmas plântulas utilizadas para a determinação do comprimento, sendo estas colocadas em sacos de papel para secar em estufa à 70 °C ± 2 °C por 72h, quando foi determinada a massa seca em balança analítica, sendo os resultados expressos em mg plântula⁻¹.

Experimento II: para avaliar o crescimento inicial das plântulas de alface em casa de vegetação, foram testadas três concentrações de extrato aquoso de alface roxa (0, 75 e 125g de folhas de alface L⁻¹ água) combinadas com cinco

concentrações de NaCl (0, 30, 60, 90 e 120mM), constituindo 15 tratamentos, sendo água destilada (combinação do nível zero para os dois fatores) o controle. A combinação entre os fatores foi realizada da mesma forma que o experimento I. Para tanto, sementes de alface foram semeadas em bandejas de poliestireno, utilizando-se como substrato areia lavada e autoclavada. Inicialmente, foram semeadas três sementes por célula, sendo realizado um desbaste após a emergência, restando apenas uma plântula por célula. Cada tratamento consistiu em quatro repetições de 18 células, totalizando 72 células ou plântulas por tratamento. As soluções de cada tratamento foram aplicadas logo após a semeadura e posteriormente aos quatro, nove, 15 e 22 dias após a semeadura, em volume de 15mL por célula, em cada aplicação. Também aplicou-se solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND e ARNON, 1938), em volume de 10mL a uma concentração de 50% da recomendada (meia força) aos sete e 11 dias após a semeadura e 6mL a uma concentração de 100% da recomendada (força completa), aos 16 e 20 dias após a semeadura. Sempre que necessário, as plântulas foram irrigadas com água com auxílio de um regador.

Os parâmetros avaliados foram: a) *Índice de velocidade de emergência (IVE)*: sementes foram semeadas de forma manual, a 0.5cm de profundidade, aproximadamente, em células de bandejas de poliestireno contendo como substrato areia lavada e autoclavada. As observações foram realizadas diariamente, computando-se o número de plântulas emergidas por dia, até que esse número permanecesse constante. De posse dos dados, calculou-se o IVE utilizando a seguinte fórmula: $IVE = (E_1 - E_0)/N_1 + (E_2 - E_1)/N_2 + \dots + (E_n - E_{n-1})/N_n$; onde E_0 é o resultado da contagem no primeiro dia, E_1 no segundo dia, ..., E_n no enésimo dia, N_1 é o primeiro dia após semeadura, N_2 o segundo dia, ..., N_n o enésimo dia, segundo Vieira e Carvalho (1994); b) *Emergência de plântulas (E)*: computado com as mesmas plântulas utilizadas para o IVE, com apenas uma contagem aos 12 dias após a semeadura considerando como emergidas, as plântulas que apresentaram os cotilédones totalmente livres e normais. Os resultados foram expressos em porcentagem de emergência das plântulas; c) *Determinação da área foliar (AF)*: realizada pelo método não destrutivo, em dois momentos: aos 14 e 24 dias após a semeadura, utilizando o

produto do comprimento da nervura principal e a largura máxima da folha, multiplicado pelo fator de correção 0,75; proposto por Pereira et al. (2003), para cultura da alface. Os resultados foram expressos em $\text{cm}^2 \text{ plântula}^{-1}$; d) *Comprimento da parte aérea (CPA)*: determinado aos 24 dias após a semeadura, em 10 plântulas por repetição, para cada tratamento, com auxílio de uma régua graduada em milímetros. Os resultados foram expressos em cm plântula^{-1} ; e) *Produção de massa fresca e seca da parte aérea (MFPA e MSPA)*: após a medição do comprimento da parte aérea, as mesmas plântulas foram pesadas em balança analítica para obter a massa fresca e posteriormente acondicionadas em estufa à 70 °C por 72h, sendo então determinada a massa seca em balança analítica. Os resultados foram expressos em g plântula^{-1} ; f) *Volume de raiz (VR)*: determinado colocando-se as raízes em proveta graduada, contendo um volume conhecido de água. O volume do sistema radicular correspondeu ao volume de água deslocado dentro da proveta após sua imersão. Pela diferença, se obteve a resposta direta do volume de raízes, pela equivalência de unidades ($1\text{mL} = 1\text{cm}^3$); g) *Produção de massa seca da raiz (MSR)*: após a medição do volume das raízes, as mesmas foram colocadas em estufa a 70 °C por 72h, sendo então pesadas para obter a biomassa seca. Os resultados foram expressos em g plântula^{-1} .

O delineamento utilizado para as análises da qualidade fisiológica do Experimento I foi inteiramente casualizado, em fatorial 4x5 (concentrações de extrato de folhas de alface x concentrações de NaCl), com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo Teste de F ($p<0,05$). Os efeitos das concentrações foram analisados por regressão polinomial pelo programa estatístico Winstat 2.0 (MACHADO e CONCEIÇÃO, 2003). Para o Experimento II o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em fatorial com 3x5 (concentrações de extrato de folhas de alface x concentrações de NaCl) e quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo Teste de F ($p<0,05$). Realizou-se comparação de médias pelo teste da diferença mínima significativa ($p<0,05$) para o fator concentração de extrato de folhas de alface roxa e regressão polinomial ($p<0,05$) para o fator concentração

de solução de NaCl. Os dados foram analisados pelo programa estatístico Winstat 2.0 (MACHADO e CONCEIÇÃO, 2003).

2.3 Resultados

Experimento I

Os dados do experimento I demonstraram que a germinação responde a interação entre os dois fatores estudados, enquanto que os demais testes mostraram resposta aos fatores isolados. Houve incremento no percentual de germinação com o aumento da concentração de extrato combinado a salinidade nas concentrações de 90 e 120mM de NaCl (Figura 1A). Porém, na ausência e na menor concentração do extrato de alface, o sal levou à redução da germinação (Figura 1B). A primeira contagem de germinação não apresentou interação entre os fatores, entretanto, houve um aumento de sementes germinadas com a aplicação de extrato de alface, apresentando um ponto de máxima em $82,6\text{g L}^{-1}$ (Figura 1C). Já para o fator sal, o ponto de máxima foi atingido com 34,78mM de NaCl, seguido de redução conforme aumentaram os tratamentos salinos (Figura 1D).

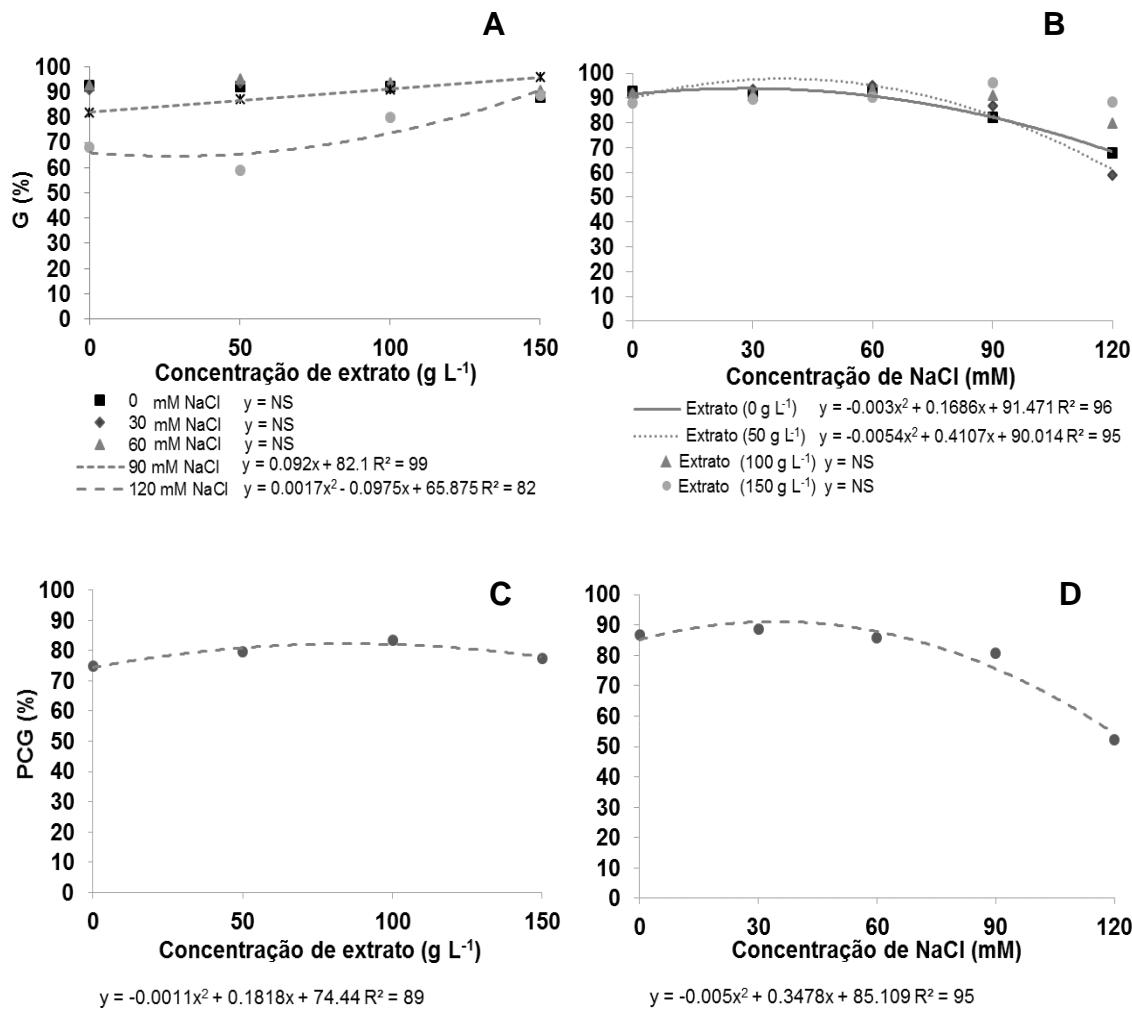


Figura 1. Germinação (G) e primeira contagem de germinação (PCG) de sementes de alface, cv. Regina, cultivadas na presença de extrato aquoso de alface roxa e NaCl. Coluna da esquerda (A, C) - Efeito do extrato; Coluna da direita (B, D) - Efeito do sal.

O comprimento da parte aérea apresentou incremento com a aplicação do extrato de alface, atingindo um ponto de máxima em 109,29g L⁻¹ (Figura 2A), porém, reduziu linearmente com o incremento das concentrações salinas (Figura 2B). Já o comprimento da raiz apresentou redução para ambos os fatores avaliados (Figura 2D).

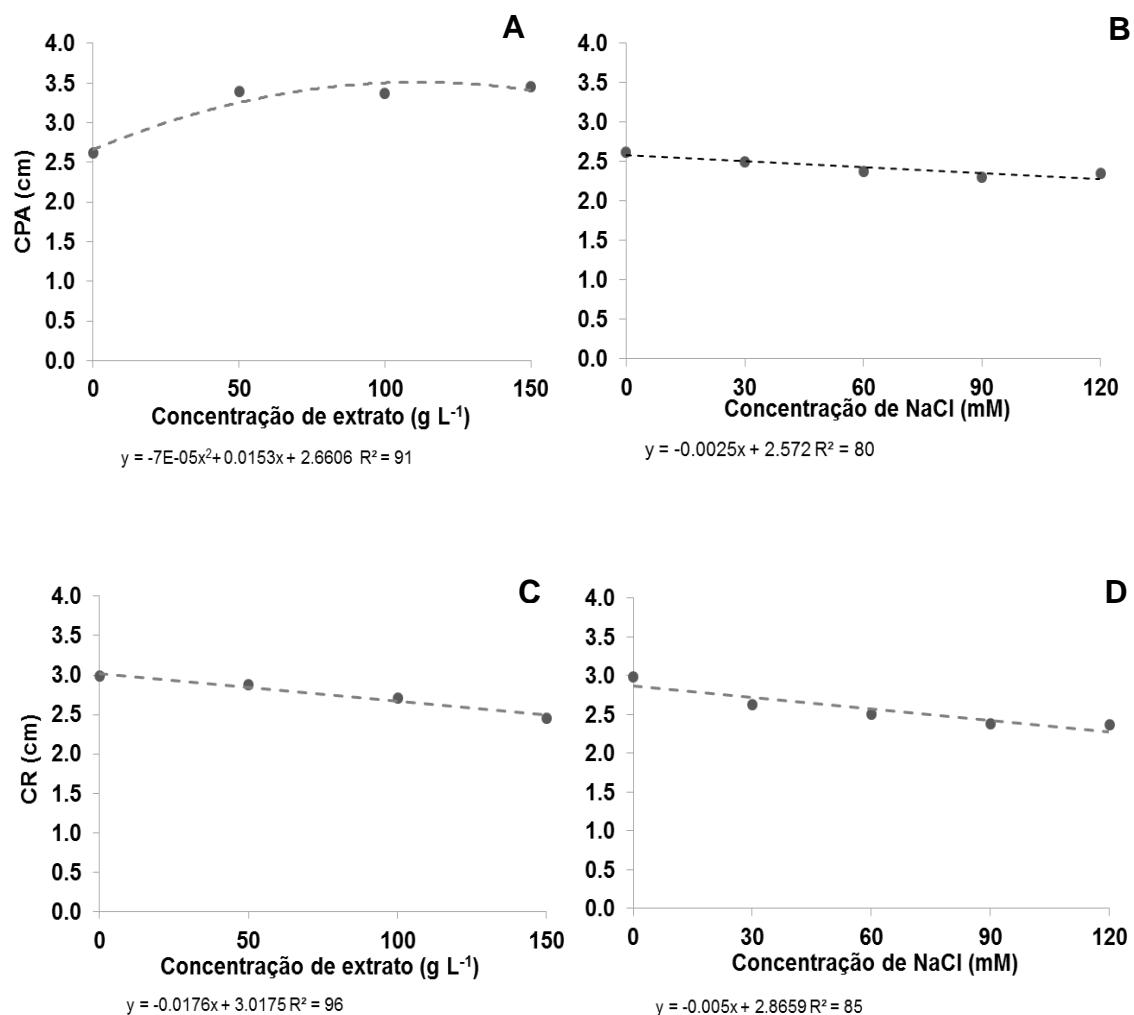


Figura 2. Comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) de sementes de alface, cv. Regina, cultivadas na presença de extrato aquoso de alface roxa e NaCl. Coluna da esquerda (A, C) - Efeito do extrato; Coluna da direita (B, D) - Efeito do sal.

A massa seca total das plântulas diferiu significativamente apenas para o fator extrato de alface, atingindo um ponto de máxima na concentração de 81,5g L⁻¹ (Figura 3).

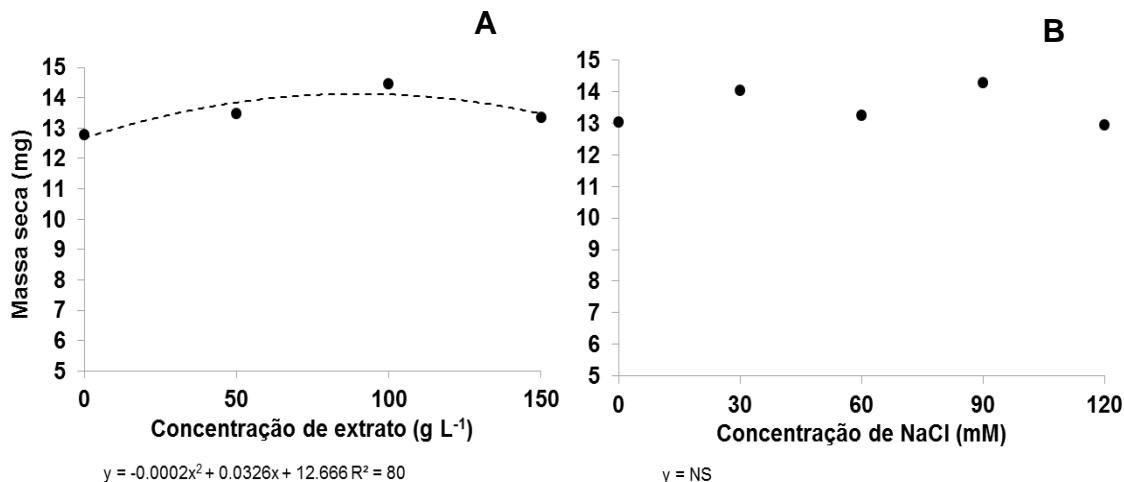


Figura 3. Massa seca total (MST) de plântulas oriundas de sementes de alface, cv. Regina, cultivadas na presença de extrato aquoso de alface roxa e NaCl. Coluna da esquerda (A) - Efeito do extrato; Coluna da direita (B) - Efeito do sal.

Experimento II

Para o cultivo em casa de vegetação houve interação entre os fatores para as variáveis índice de velocidade de germinação, área foliar, comprimento da parte aérea, massa fresca e seca da parte aérea e volume e massa seca de raiz, enquanto que para a emergência não houve influência dos fatores.

O índice de velocidade de emergência foi significativamente superior no tratamento contendo 125g L⁻¹ de extrato de alface, em relação aos demais, tanto na ausência do sal quanto na concentração de 120mM de NaCl. As concentrações de 0 e 75g L⁻¹ de extrato, apresentaram respostas de tendência quadrática decrescente, com pontos de máxima em 29 e 1mM de NaCl, respectivamente (Figura 4B).

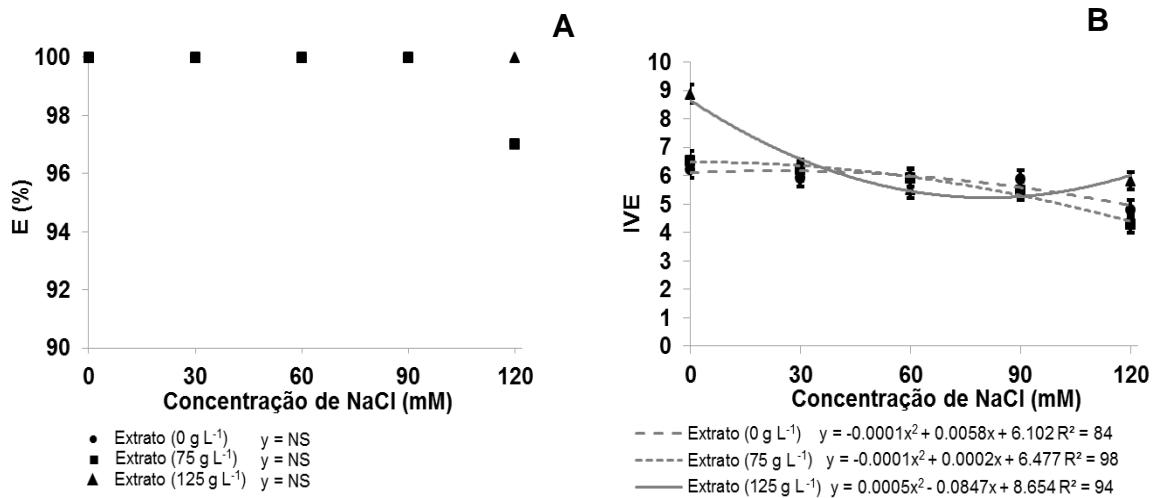


Figura 4. Emergência (E) e índice de velocidade de emergência (IVE) de plântulas de alface, cv. Regina, cultivadas na presença de extrato aquoso de alface roxa e NaCl. As barras correspondem ao valor da DMS (diferença mínima significativa) entre os níveis do fator extrato de alface roxa ($p<0,05$); barras que se sobreponem indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente.

Quanto à área foliar (Figura 5), houve incremento significativo com a aplicação de extrato de alface, tanto aos 14 como 24 dias após a semeadura (DAS), sendo aproximadamente 20cm² superior no tratamento com 125g L⁻¹ de extrato em comparação ao seu controle, aos 24 DAS (Figura 5B). Ainda, comparando as concentrações de extrato de alface dentro de cada concentração salina, a variável resposta também foi positiva, com incrementos significativos, atingindo valores de aproximadamente 9cm² de diferença entre a concentração de 0g para 125g L⁻¹ de extrato, na concentração de 120mM de sal (Figura 5B).

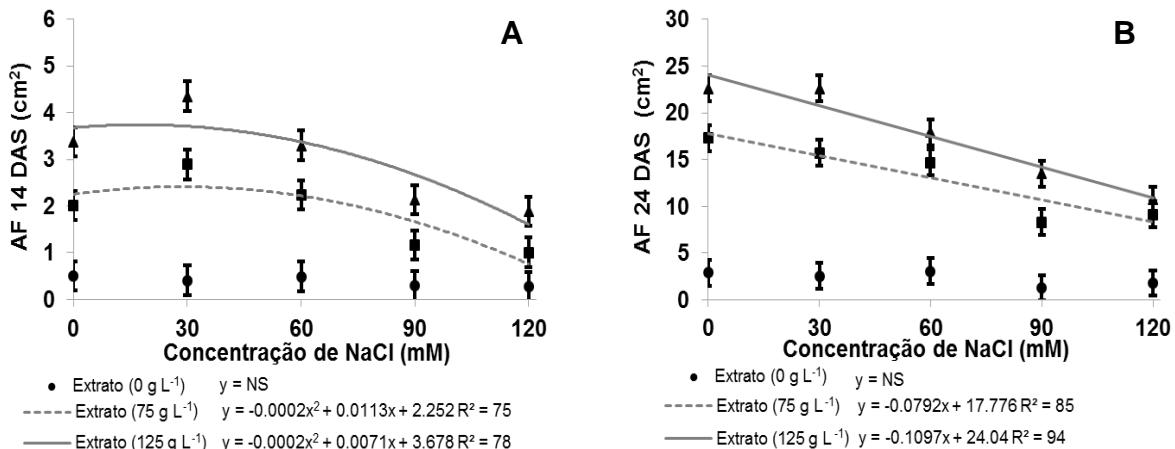


Figura 5. Área foliar (AF) de plântulas de alface, cv. Regina, cultivadas na presença de extrato aquoso de alface roxa e NaCl. Coluna da esquerda (A) - 14 DAS - dias após semeadura; Coluna da direita (B) - 21 DAS - dias após semeadura. As barras correspondem ao valor da DMS (diferença mínima significativa) entre os níveis do fator extrato de alface roxa ($p < 0,05$), barras que se sobreponem indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente.

Estes resultados demonstram o efeito positivo que o extrato de folhas de alface roxa possui sobre o desenvolvimento inicial de plântulas de alface, mesmo sob estresse salino, o que fica evidente na Figura 6, que representa o estádio de desenvolvimento das plântulas aos 24 DAS.



Figura 6. Desenvolvimento das plântulas de alface (24 dias após a semeadura). 1: controle (água); 2: 75g L⁻¹ de extrato; 3: 125g L⁻¹ de extrato; 4: 30mM sal; 5: 60mM sal; 6: 90mM sal; 7: 120mM sal; 8: 75g L⁻¹ de extrato + 30mM sal; 9: 75g L⁻¹ de extrato + 60mM sal; 10: 75g L⁻¹ de extrato + 90mM sal; 11: 75g L⁻¹ de extrato + 120mM sal; 12: 125g L⁻¹ de extrato + 30mM sal; 13: 125g L⁻¹ de extrato + 60mM sal; 14: 125g L⁻¹ de extrato + 90mM sal; 15: 125g L⁻¹ de extrato + 120mM sal.

Os dados referentes ao comprimento e a massa fresca e seca da parte aérea das plântulas (Figura 7), apresentaram a mesma tendência observada na área foliar, com incrementos significativos pela aplicação do extrato de alface, tanto de forma isolada como na aplicação conjunta ao NaCl. Não houve diferença entre as concentrações de sal, na ausência de extrato, nas três variáveis avaliadas.

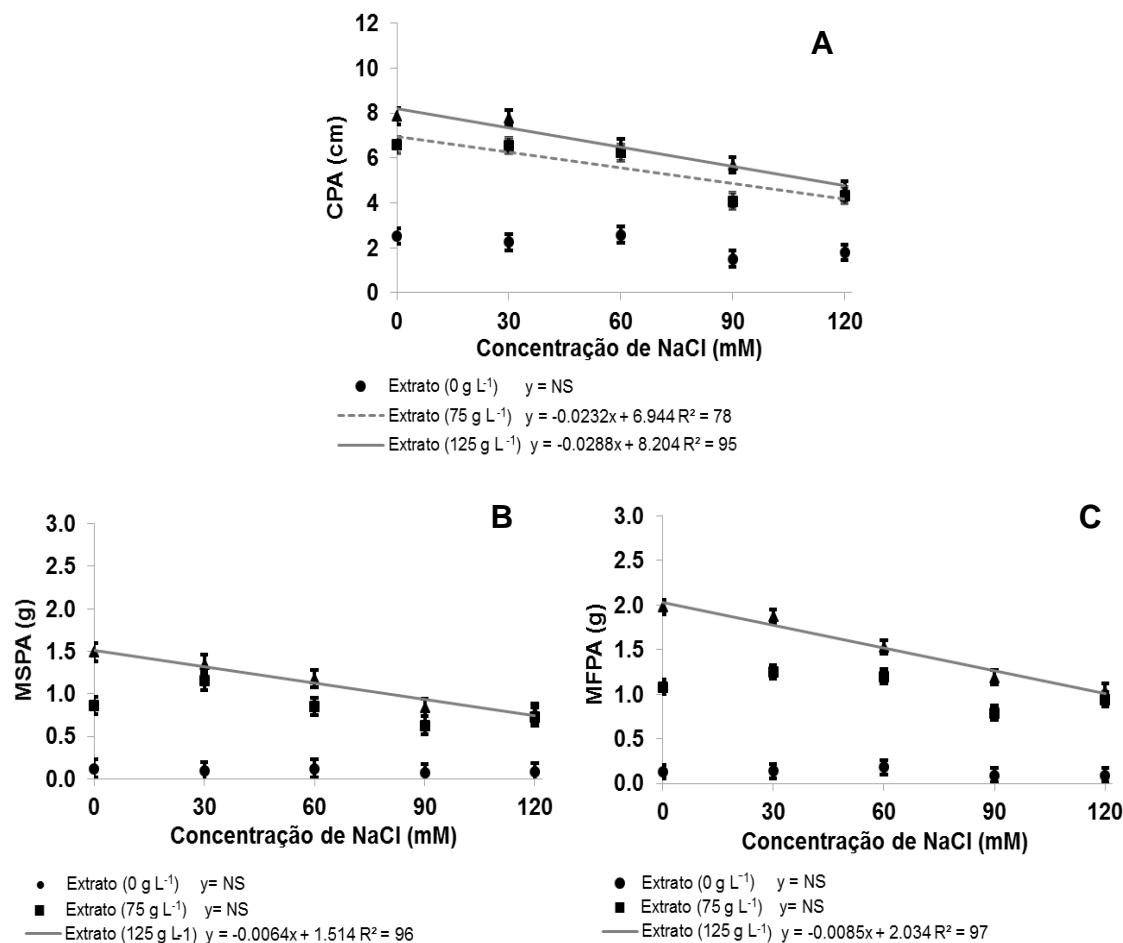


Figura 7. Comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca (MFPA) e seca (MSPA) da parte aérea de plântulas de alface, cv. Regina, cultivadas na presença de extrato aquoso de alface roxa e NaCl. As barras correspondem ao valor da DMS (diferença mínima significativa) entre os níveis do fator extrato de alface roxa ($p<0,05$), barras que se sobreponem indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente.

Analizando o volume e a massa seca de raiz (Figura 8), observou-se diferença significativa entre os tratamentos, sendo que, mesmo com o aumento da concentração salina, pela adição do extrato de alface, estas variáveis apresentaram incremento significativo. Ambas as variáveis apresentaram

tendência cúbica em relação às concentrações de NaCl, com um incremento até a concentração de 30mM de sal (Figura 8).

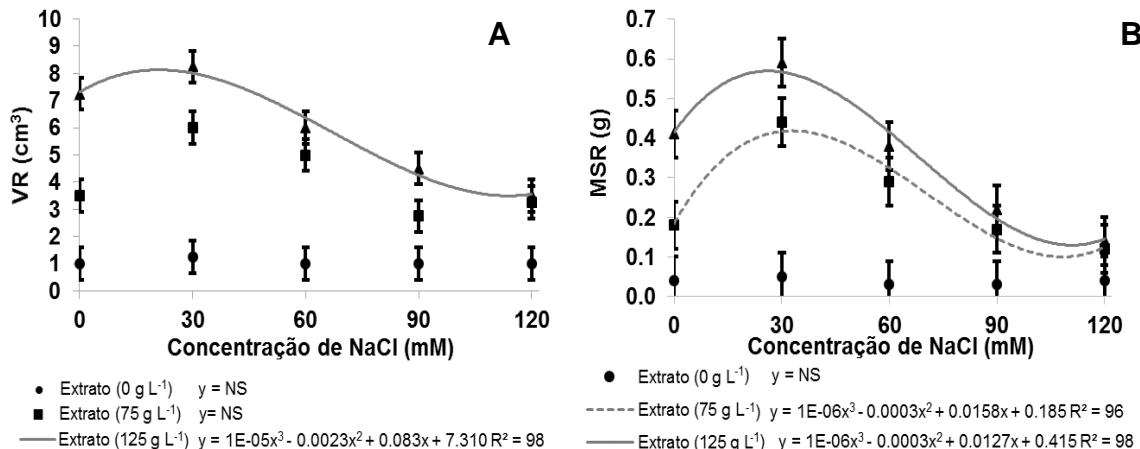


Figura 8. Volume de raiz (A) e massa seca da raiz (B) de plântulas de alface, cv. Regina, cultivadas na presença de extrato aquoso de alface roxa e NaCl. As barras correspondem ao valor da DMS (diferença mínima significativa) entre os níveis do fator extrato de alface roxa ($p<0,05$), barras que se sobrepõem indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente.

2.4 Discussão

A salinidade afeta as plantas de várias maneiras e como resultado, seu crescimento, desenvolvimento e sobrevivência são reduzidos (MUSCOLO et al., 2011; SCHLEIFF e MUSCOLO, 2011). Entretanto, os vegetais possuem dois tipos de metabólitos: primários e secundários; enquanto os metabólitos primários respondem pela sobrevivência do vegetal, os secundários estão intimamente associados a estratégias de defesa (NASS, 2007) em condições adversas. De acordo com Taiz e Zeiger (2013), os metabólitos secundários são distribuídos em terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio. A alface contém alto teor de compostos fenólicos (COLLINS, 2004), além de antocianinas presentes nas variedades vermelhas ou roxas.

No presente estudo pode-se observar o efeito positivo da aplicação do extrato de alface roxa sobre a germinação, primeira contagem da germinação, comprimento da parte aérea e massa seca das plântulas de alface, cultivadas

em condições controladas. Alguns estudos vêm relatando o efeito de extratos aquosos sobre a germinação de sementes. Parimelazhagan e Francis (1999) verificaram que com a aplicação do extrato de folhas de *Clerodendrum viscosum* houve maior percentual de germinação e melhor desenvolvimento das mudas de arroz. Em contrapartida, a percentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação de rabanete sob ação de extrato aquoso de *Piper mikianum* foram reduzidos em todos os tratamentos contendo extrato (BORELLA et al., 2012). Isto indica que o efeito de determinado tipo de extrato depende da sensibilidade da planta testada para os compostos presentes, pois certas substâncias podem inibir a germinação ou o crescimento (ALMEIDA et al., 1998).

Ao contrário do extrato de alface, a salinidade afetou de forma negativa a germinação e o crescimento das plântulas de alface. Resultados semelhantes foram observados em alface (KESHAVARZI, 2012) e girassol (RABBANI et al., 2013), onde o aumento da salinidade no substrato influenciou negativamente a germinação. Entretanto, estudando nove variedades de alface sob estresse salino, Zapata et al. (2003), observaram uma tolerância relativamente alta durante a germinação, uma vez que altos níveis de NaCl (150mM) atrasaram a germinação, mas a maioria das sementes foram capazes de germinar sob tais condições. A salinidade pode atuar, dependendo da cultura, inibindo ou retardando a germinação das sementes, porém, na presença de compostos que atuem de forma a potencializar a germinação e o crescimento inicial das plântulas, o efeito negativo da salinidade pode ser atenuado, como observado no presente estudo pela aplicação do extrato aquoso de folhas de alface roxa.

Todos os parâmetros avaliados no experimento II apresentaram valores superiores com o uso do extrato de folhas de alface roxa, tanto de forma isolada quanto em conjunto com o sal, sendo que com a aplicação de 125g L⁻¹ do extrato aquoso foram obtidos os melhores resultados. Estudando o efeito da embebição de sementes de feijão-caipi em extratos de raízes de cenoura e NaCl, Abbas e Akладиous (2013) observaram efeito significativo da salinidade na redução do comprimento do caule, raízes, número de folhas, massa fresca e seca das plântulas. Já em relação ao extrato de cenoura, os autores verificaram uma ação estimuladora no crescimento de mudas de feijão-caipi com a aplicação do

extrato, sendo a concentração de 25g 100mL⁻¹ a mais eficaz em melhorar os parâmetros de comprimento avaliados, tanto nas plantas controle como nas submetidas à salinidade.

A aplicação de extrato de folhas de alface roxa proporcionou um aumento na área foliar das plântulas de alface, com incrementos de até 20cm², da menor (ausência) para a maior (125g L⁻¹) concentração (Figura 5B). A aplicação conjunta do extrato com o sal, embora tenha reduzido a área foliar em ambos os momentos de avaliação (14 e 24 dias), apresentou valores superiores mesmo na maior concentração de NaCl (120mM), em relação à ausência do extrato (Figura 5), demonstrando a ação potencializadora do extrato, que mesmo com a aplicação de concentrações elevadas de sal, auxilia no desenvolvimento foliar das plântulas de alface. Considerando que a parte comestível da alface é justamente as folhas, incrementos na área foliar são altamente desejados do ponto de vista agronômico.

Avaliando o desempenho de cinco cultivares de alface submetidas a diferentes níveis de salinidade da água de irrigação (0,5; 1,5; 2,5; 3,5 e 4,5dS m⁻¹), Oliveira et al. (2011) observaram que a área foliar foi afetada significativamente ($p < 0,01$) pela salinidade em todas as cultivares. Os valores de área foliar variaram de 2291,76cm² a 1259,01cm², evidenciando que o efeito da salinidade é influenciado pela variação genética entre as cultivares. Segundo Morales et al. (2001), nem todas as partes da planta são igualmente afetadas pela salinidade, bem como a adaptação ao estresse salino varia entre espécies e em um mesmo genótipo pode variar entre estádios fenológicos. O decréscimo da área foliar das plantas em condições salinas pode estar relacionado com um dos mecanismos de adaptação da planta ao estresse salino, diminuindo a superfície transpirante (TESTER e DAVENPORT, 2003).

Além do aspecto agronômico, mencionado anteriormente, a área foliar tem sua importância por ser uma variável de crescimento indicativa da produtividade, visto que o processo fotossintético depende da interceptação da energia luminosa e sua conversão em energia química, sendo este um processo que ocorre diretamente na folha (TAIZ e ZEIGER, 2013). Como a fotossíntese depende da área foliar, o rendimento da cultura será maior quanto mais rápido a

planta atingir o índice de área foliar máximo e quanto mais tempo a área foliar permanecer ativa (OLIVEIRA et al., 2011). Ainda, de acordo com Mittova et al. (2002) e Sultana et al. (2002), as reduções de área foliar e de fotossíntese contribuem, de certo modo, para adaptação da cultura à salinidade; a redução da área foliar sob estresse hídrico pode ser um mecanismo de sobrevivência que permite a conservação de água pela menor área transpiratória das plantas.

A concentração de 125g L⁻¹ de extrato proporcionou aumentos de mais de 6cm³ no volume de raiz e 0.5g na massa seca de raiz, em relação à concentração 0g L⁻¹ (Figura 8). O crescimento de raízes reforçadas pela aplicação do extrato de folhas de alface é importante porque pode reduzir o choque do transplante em hortaliças (CROUCH e VAN STADEN, 1992), bem como aumentar o potencial de nutrição inicial e a absorção de água pela planta (MANCUSO et al., 2006). Pode-se observar também que o volume e a massa seca de raiz apresentaram tendência cúbica com o incremento das concentrações de sal até a concentração de 30mM, seguida de redução até a concentração de 90mM (Figuras 8A e B). De acordo com Munns e Tester (2008), a inibição no crescimento do sistema radicular sob condições salinas pode ser atribuída à redução da fotossíntese, visto que em condições salinas o número e tamanho das folhas de plantas glicófitas são reduzidos. Ao estudarem o efeito do extrato aquoso de *Adonis vernalis* L., Dragoeva et al. (2015) observaram que o extrato diminuiu o comprimento das raízes de *Triticum aestivum*. Avaliando a resposta da alface hidropônica à salinidade produzida por NaCl e CaCl₂, Tas et al. (2005) não observaram efeito significativo da salinidade no comprimento radicular.

Paulus et al. (2010) observaram que o aumento da salinidade da água reduziu a massa fresca e seca de plântulas em duas cultivares de alface, sendo que a redução variou conforme a cultivar. Segundo Pedó et al. (2014), a menor alocação de massa seca pode ser consequência da elevada concentração de NaCl sobre mecanismos de hidrólise e mobilização de reservas para a plântula. Em contrapartida, estudando a resposta da alface crespa em diferentes níveis da salinidade da água de irrigação (0,75 a 7,0dS m⁻¹), Unlukara et al. (2008), notaram aumento na massa seca da planta com o aumento da salinidade. Soares et al. (2007) verificaram que o sistema radicular da alface não foi

prejudicado pela salinidade da água e que em hidroponia, é possível utilizar águas salinas para produção de alface, podendo a tolerância aos sais ser superior àquela obtida em cultivos convencionais baseados em solo.

Embora os estresses abióticos, como a seca, salinidade e temperaturas extremas possam reduzir o rendimento das principais culturas e limitar a produção agrícola mundial (ZIA e KHAN, 2002; ZAHIR e FARRUKH, 2012), os extratos de diferentes materiais vegetais podem promover o crescimento de um determinado tecido, por conterem substâncias promotoras envolvidas no mecanismo de indução do crescimento de plantas (PUCHOOA e RAMBURN, 2004). Os resultados obtidos mostraram que a alface roxa tem uma ação estimuladora na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface, mesmo sob estresse salino. Sendo assim, futuros estudos que visem a elucidar os mecanismos de resposta fisiológicos e bioquímicos induzidos pelo extrato de folhas de alface roxa devem ser explorados, a fim de ratificar possíveis incrementos na produção de diferentes culturas.

2.5 Conclusões

O uso de extrato de folhas de alface roxa proporciona incrementos na germinação, primeira contagem de germinação, no comprimento da parte aérea e na massa seca das plântulas de alface em condições de laboratório.

O extrato de folhas de alface roxa, embora não iniba o efeito do sal, potencializa o desenvolvimento inicial de plântulas de alface, sendo a concentração de 125g L^{-1} a que proporciona os melhores resultados.

CAPÍTULO 2

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE ALFACE ROXA NA
ATIVIDADE CITOGENÉTICA DE RAÍZES DE ALFACE SOB ESTRESSE
SALINO**

3. Efeito do extrato aquoso de folhas de alface roxa na atividade citogenética em raízes de alface sob estresse salino

3.1 Introdução

A presença de altos índices de salinidade nos solos é um fator que pode causar estresse abiótico e consequentemente promover importante redução na produtividade de diferentes culturas, situação observada em diversas partes do mundo (LUCENA et al., 2012; REYES et al., 2012; PEKOL et al., 2016). As elevadas concentrações de sais dissolvidos na solução do solo reduzem o potencial osmótico, consequentemente, causando redução da disponibilidade de água para a planta. Assim, a célula vegetal necessita realizar um ajuste osmótico, porém durante este processo pode ocorrer a produção de radicais livres ou de espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como o íon superóxido, o peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxila e peroxila (WILLADINO e CAMARA, 2010).

As plantas podem reagir ao estresse salino com ajustes morfológicos, bioquímicos, fisiológicos, celular e molecular (RADIC et al., 2005; TABUR e DEMIR, 2010; PEREZ-CLEMENTE et al., 2013). Mais especificamente, em nível celular, a salinidade pode afetar a divisão celular e causar anormalidades cromossômicas como formação de micronúcleos, cromossomos *stickness*, c-mitoses e anáfases multipolares, quebras cromatídicas, perda de cromossomos inteiros ou a formação de micronúcleos (AKYL et al., 2012). A citotoxicidade de substâncias é avaliada pelo surgimento de alterações no processo de divisão celular do organismo teste, tanto pela inibição do índice mitótico como pela incidência de mutações cromossômicas (SOUZA et al., 2005; TEERARAK et al., 2009).

Os efeitos do estresse salino têm sido bastante estudados em diferentes culturas, porém encontra-se um número limitado de informações sobre os efeitos citotóxicos da salinidade. A alface apresenta sensibilidade às condições do ambiente, podendo ocorrer problemas na germinação e emergência (SOLANO et al., 2015). Um dos fatores ambientais que pode influenciar o desenvolvimento dessa hortaliça é a salinidade, sendo ela considerada moderadamente sensível à salinidade em relação

a outras espécies (SHANNON e GRIEVE, 1999). Ao avaliar os efeitos dos níveis de salinidade na germinação de alface, Keshavarzi (2012) constatou que com o aumento da salinidade, a percentagem e taxa de germinação decresceram. Em estudo com sementes de mogango, Harter et al. (2014) observaram que ao serem expostas a estresse salino, as sementes apresentaram dificuldades na germinação e desenvolvimento de plântulas. Além disso, as plântulas submetidas ao estresse salino ativaram seu mecanismo de defesa, visto que as diferentes concentrações de cloreto de sódio testadas não intensificaram a atividade da enzima superóxido dismutase, fator que pode estar relacionado à maior atividade da peroxidase e esterase observada nas maiores concentrações de sal.

Para se defenderem de estresses, como a salinidade, as plantas fazem ajustes em vários níveis e ativam mecanismos antioxidativos de defesa (não enzimáticos e enzimáticos). A alface é rica em vitamina C e compostos fenólicos, sendo que as variedades roxas possuem ainda antocianinas, pigmentos que lhes conferem essa coloração (SANTANA et al., 2009), e propiciam às mesmas maior atividade antioxidante (RICE-EVANS et al., 1997), podendo auxiliar a diminuir a produção de radicais livres ou de espécies reativas de oxigênio, que em altas concentrações prejudicam a planta.

Considerando que o cloreto de sódio em níveis elevados pode ser prejudicial ao desenvolvimento da alface e que a variedade roxa possui em sua composição antocianinas, o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito de diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas de alface roxa sobre o índice mitótico e as aberrações cromossômicas em raízes de alface, sob estresse salino.

3.2 Material e métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório Didático de Análise de Sementes (Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel) e no Laboratório de Genética (Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética do Instituto de Biologia) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS.

Foram testadas quatro concentrações de extrato aquoso de alface roxa (0, 50, 100 e 150g de folhas de alface L⁻¹ água) combinadas com cinco concentrações (0, 30, 60, 90 e 120mM) de cloreto de sódio (NaCl), constituindo 20 tratamentos, sendo água

destilada (combinação do nível zero para os dois fatores) o controle negativo. Para cada tratamento foram utilizadas oito repetições de 50 sementes.

Para obtenção do extrato, utilizaram-se plantas de alface adquiridas em uma fruteira local, no mesmo dia da sua utilização, observando que estivessem em bom estado sanitário. Inicialmente, as folhas foram lavadas em água destilada, e em seguida realizada a secagem com papel toalha. Após, as folhas foram pesadas, conforme cada tratamento, e trituradas em liquidificador contendo água destilada, durante dois minutos. Realizada a trituração, os extratos foram filtrados em papel filtro, sendo todo o preparo feito em laboratório, com temperatura constante de 25 °C e sob iluminação de luz branca. A combinação dos fatores foi realizada adicionando-se a quantidade correspondente de NaCl, conforme cada tratamento, aos extratos de alface roxa, antes de proceder a realização dos testes.

Sementes comerciais de alface sem tratamento químico, cv. Regina, foram colocadas para germinar em caixas plásticas tipo gerbox, contendo papel mata borrão, umedecido em 2,5 vezes o seu peso seco com as soluções, conforme cada tratamento, e então, acondicionadas em câmara de germinação a temperatura controlada de 20 °C, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Para observar se houve efeito protetor do extrato vegetal sobre a divisão celular foram realizadas as análises de índice mitótico (IM), índice de fases da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e presença de aberrações cromossômicas. O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em divisão pelo número total de células observado e multiplicado por 100, da mesma forma para os índices de fases. Também foi avaliada a presença ou ausência de aberrações cromossômicas nas 400 células/lâmina, num total de 1600 células por tratamento e o índice de aberrações cromossômicas foi calculado dividindo-se o número de alterações observadas pelo número de células em divisão multiplicado por 100 para cada tratamento.

Para a realização das análises foi empregada a técnica de esmagamento (GUERRA e SOUZA, 2002). Para tanto, quatro dias após a semeadura, quando ocorreu a protrusão da radícula, 16 raízes por tratamento foram coletadas e fixadas em três partes de etanol: uma parte de ácido acético glacial P.A. (fixador Carnoy 3:1) permanecendo em temperatura ambiente por um período de 24h. Após este período, as mesmas foram armazenadas em freezer para posterior análise microscópica. Para a confecção de lâminas, as radículas passaram pelo seguinte processo: imersão em

água destilada durante cinco minutos, seguido da hidrólise em HCl 5N por um período de 15 minutos, retornando à água destilada por mais cinco minutos. Após, as radículas foram transferidas para lâmina onde em microscópio esteroscópico foi retirada a coifa para a obtenção do meristema apical, adicionada orceína acética 2%, colocada uma lamínula sobre o material esmagado. As lâminas das células de alface foram observadas por varredura em microscópio óptico a uma magnitude de 400x utilizando quatro repetições de 400 células/lâmina, num total de 1600 células por tratamento (FONSECA et al., 2016).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em fatorial 4x5 (concentrações de extrato de folhas de alface x concentrações de NaCl), com quatro repetições. Os resultados do índice mitótico e de aberrações cromossômicas foram analisados por regressão polinomial pelo programa estatístico Winstat 2.0 (MACHADO e CONCEIÇÃO, 2003). O índice de fases da mitose foi apresentado com a porcentagem de células em divisão em cada fase, para ambos os fatores avaliados.

3.3 Resultados

O resultado dos estudos citogenéticos demonstrou que não houve diferenças significativas em relação ao índice mitótico para as diferentes concentrações de extrato de folhas de alface roxa, mantendo valores entre 9 e 12% (Figura 9A). Entretanto, o índice mitótico diminuiu linearmente conforme aumentou a concentração de NaCl, passando de 16% na concentração 0mM, para 6% em 120mM de sal (Figura 9B). Este comportamento evidencia que o aumento deste estresse abiótico afeta diretamente e de forma negativa o processo de divisão celular.

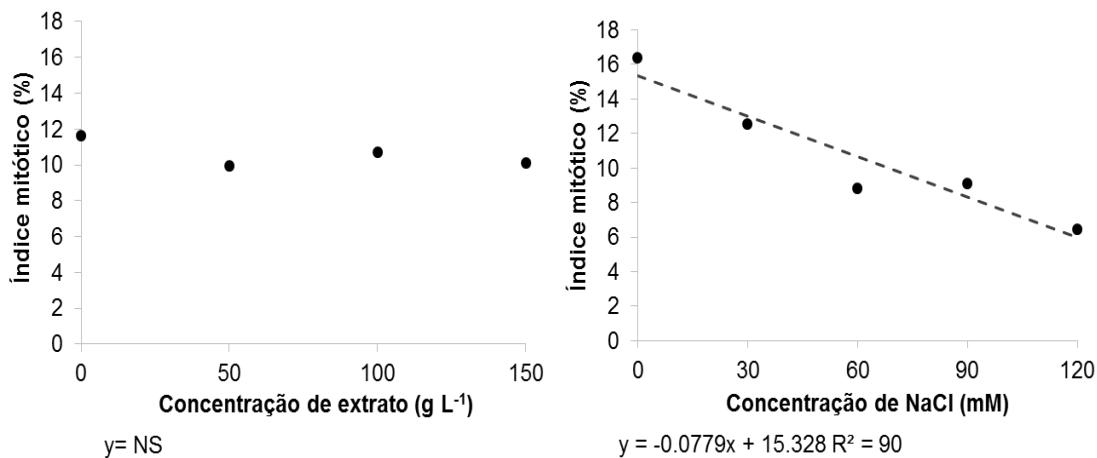


Figura 9: Índice mitótico em células de raízes de alface provenientes de sementes submetidas a diferentes concentrações de extrato aquoso de alface roxa e NaCl. Coluna da esquerda (A) - Efeito do extrato; Coluna da direita (B) - Efeito do sal.

Em relação ao índice de fases da mitose, observou-se que para as concentrações de extrato, a maior porcentagem das células de raízes de alface encontrava-se em prófase e a menor em anáfase (Figura 10A). Também pode-se observar redução no número de células em prófase, passando de 6,6 para 4,3% de 0 para 150g L⁻¹ de extrato, respectivamente, e aumento em telófase, passando de 1,06 para 2,0% de 0 a 150g L⁻¹ de extrato, respectivamente (Figura 10A). O sal apresentou comportamento similar ao extrato, com maior frequência de células em prófase. Entretanto, houve redução em todas as fases, conforme aumentou a concentração de NaCl, passando de 9 para 3% na prófase; 3,1 para 1,1% na metáfase; 1,5 para 0,5% na anáfase e 2,4 para 1,4% na telófase de 0 para 120mM, respectivamente, apontando um menor crescimento nas maiores concentrações de sal (Figura 10B). Imagens de cada uma das fases da mitose observadas nas lâminas de raízes de alface estão apresentadas na Figura 11.

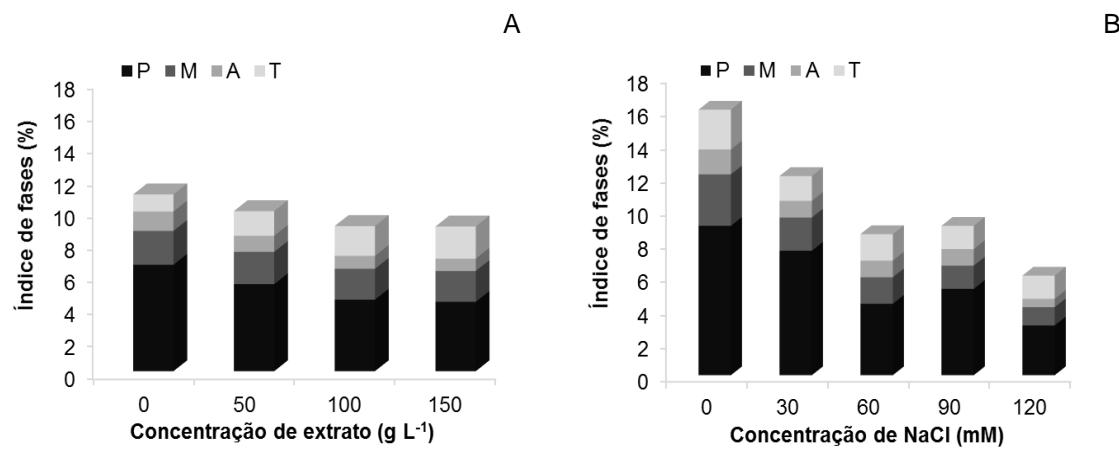


Figura 10: Índice de fases da mitose com a porcentagem de células em divisão (P=prófase, M=metáfase, A=anáfase, T=telófase). Coluna da esquerda (A) - Efeito do extrato; Coluna da direita (B) - Efeito do sal.

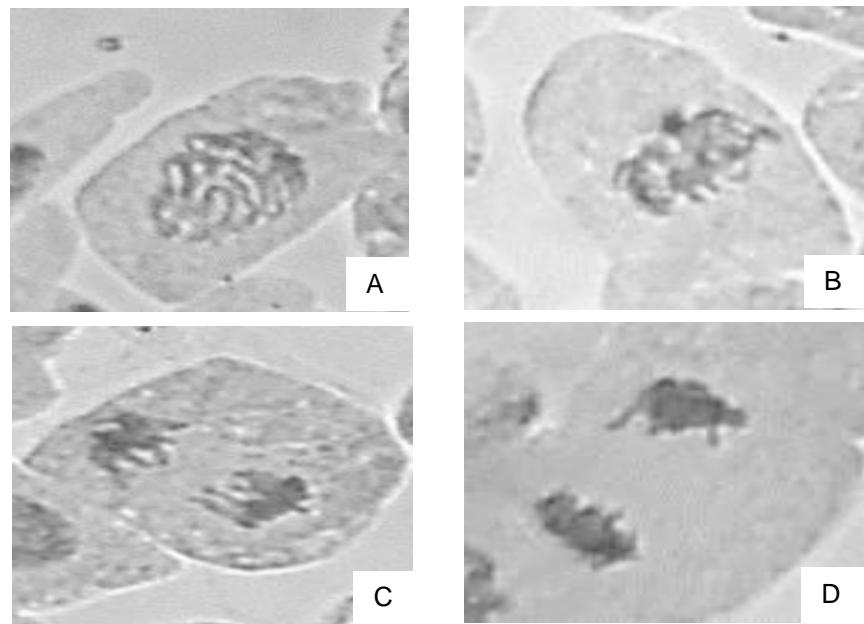


Figura 11: Fases da mitose: prófase (A), metáfase (B), anáfase (C) e telófase (D).

Não houve diferença, para o índice de aberrações cromossômicas, entre as concentrações de extrato de alface roxa, bem como para do NaCl (Figura 12). Imagens de aberrações cromossômicas observadas nas células de raízes de alface estão apresentadas na Figura 13.

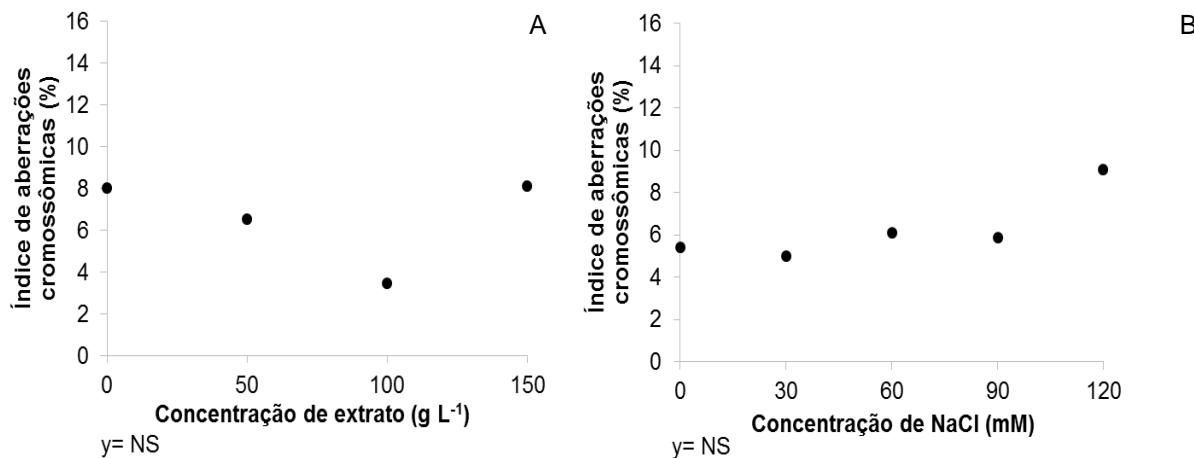


Figura 12: Índice de aberrações cromossômicas em células de raízes de alface provenientes de sementes submetidas a diferentes concentrações de extrato de folhas de alface roxa e NaCl. Coluna da esquerda (A) - Efeito do extrato; Coluna da direita (B) - Efeito do sal.

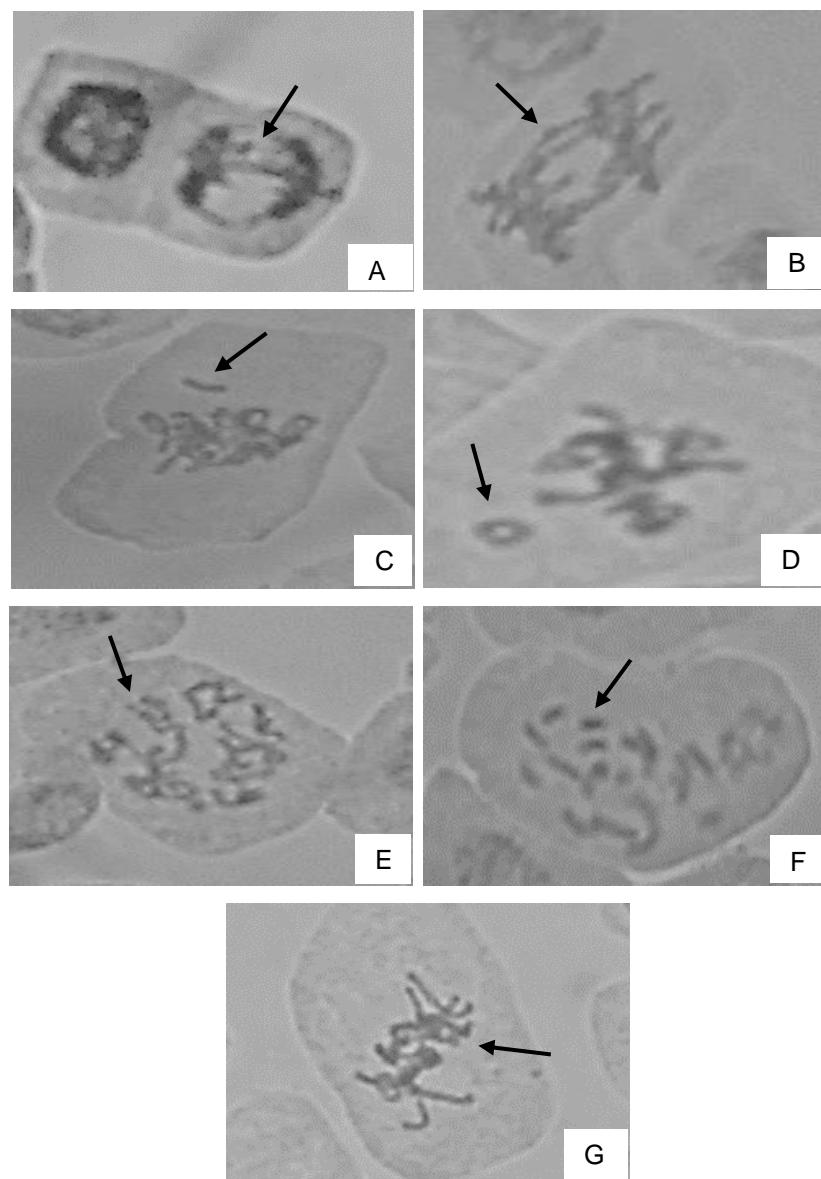


Figura 13: Aberrações cromossômicas de raízes de alface, na germinação em diferentes concentrações de extrato de folhas de alface roxa e NaCl. A,B: Ponte anafásica; C: cromossomo solto; D: cromossomo em anel; E: prófase desorganizada; F: cromossomos desconectados; G: metáfases desorganizadas.

3.4 Discussão

O estresse salino pode desencadear respostas diferentes em plantas, tais como a inibição do crescimento, efeitos inibitórios sobre o índice mitótico (LUTSENKO et al., 2005; RADIC et al., 2005), formação de novos compostos e mudanças na atividade das enzimas antioxidantes (BALOGLU et al., 2012). Nesse estudo, o sal afetou o índice mitótico das raízes de alface (Figura 9B), com redução no número de

células em cada fase, conforme aumentou a concentração de NaCl. Já para as concentrações de extrato, não houve diferença entre o índice mitótico (Figura 9A).

De acordo com Anuradha e Rao (2001), a inibição da divisão celular induzida pelo sal pode estar relacionada com efeitos osmóticos, inibição de DNA, RNA e síntese proteínas. Além disso, o cloreto de sódio pode estar atuando no segundo ponto de controle do ciclo celular (G2), impedindo a formação de complexo Cdk1-ciclina B; o qual forma o Fator Promotor da Mitose, que permite a passagem através desse ponto para o período M (mitose e meiose). Como consequência, as células não transitam normalmente da fase G2 para a mitose; mantendo-as em interfase e, consequentemente, reduzindo o número de células em divisão (ITO, 2000; SHIMOTOHNO et al., 2003).

Trabalhando com sementes de cevada, Tabur e Demir (2009, 2010) sugeriram que sementes mantidas em soluções com diferentes concentrações de NaCl apresentaram uma diminuição significativa do índice mitótico e maior número de anormalidades cromossômicas. Resultados semelhantes com a aplicação de diferentes concentrações de NaCl foram encontrados em sorgo (LUTSENKO et al., 2005), cebola (TEERARAK et al., 2009) e trigo (PEKOL et al., 2016). Em contrapartida, o tratamento com 150mM de NaCl causou aumento significativo do índice mitótico nas pontas das raízes de *Centaurea ragusina*, em comparação com as das amostras do controle 10 dias após a instalação do experimento (RADIC et al., 2005). Avaliando o efeito do estresse hídrico na divisão celular em folhas de trigo, Schuppler et al. (1998) verificaram que as folhas estressadas aumentaram o período da atividade mitótica, entretanto, o número final de células produzidas não diferiu das folhas não estressadas. Mas o tempo que levou para alcançar esse número final, indica que o crescimento da planta diminuiu em relação ao controle.

Estudando os efeitos de diferentes concentrações de sorbato de potássio sobre o ciclo celular e material genético em meristemas de raízes de cebola, Quispe et al. (2010) verificaram aumento da prófase nos tratamentos expostos a sorbato de potássio e diminuição da metáfase, anáfase e telófase, causada pela detenção do processo em prófase. No presente estudo, observou-se redução em todas as fases conforme aumentou a concentração de NaCl (Figura 10B). Já para o extrato, a prófase apresentou redução com o incremento da concentração do extrato de folhas de alface (Figura 10A) e a telófase mostrou um aumento do número de células (Figura 10A),

apontando que o extrato pode ter auxiliado no desenvolvimento das raízes, permitindo que maior número de células atingisse a última fase da mitose.

A diminuição do número de células em cada fase da mitose, observado neste estudo, conforme o incremento da concentração de sal, pode ter sido ocasionada pela inibição do complexo Cdk1 - ciclina B, agindo sobre os centros de microtúbulos de organização, impedindo a montagem do fuso mitótico, fazendo com que mais células permanecessem em interfase, conforme já citado anteriormente. Já o extrato, por não ter apresentado variação no índice mitótico, mas ter sofrido redução no índice de fase da prófase e aumento na telófase conforme incremento da concentração de extrato, pode ter impedido esse efeito inibitório sobre o complexo Cdk1 - ciclina B, e permitido a passagem das células de fase, de forma que maior número de células atingissem a última fase da mitose.

De acordo com Fachinetto et al. (2007), é possível que a alta concentração de alguns compostos químicos tenha um efeito (inibitório ou estimulatório) no ciclo celular. Comparando três concentrações (5 , 15 e 30g L^{-1}) do extrato aquoso de *Mentha pulegium* L. sobre o ciclo celular de *A. cepa*, Tedesco et al. (2012) observaram que o aumento da inibição da divisão celular foi gradativo, conforme a elevação da concentração do extrato. Resultados semelhantes foram encontrados por Fachinetto e Tedesco (2009), com extratos de *Baccharis trimera* e *B. articulata* sobre o ciclo celular de cebola. Entretanto, como já mencionado, no presente estudo o extrato de folhas de alface roxa não inibiu a divisão celular de raízes de alface.

Estudando o papel de alguns reguladores de crescimento sobre a atividade citogenética de cevada sob estresse salino, Tabur e Demir (2010) observaram que a frequência de anormalidades cromossômicas foi nula em células de raízes na germinação em água destilada, porém, aumentou significativamente com o incremento na concentração de sal, chegando a 3,9% na concentração de 0,4M. Ainda de acordo com os autores, as alterações mais comuns foram metáfase desordenada e pontes anafásicas em sementes tratadas com os diferentes reguladores e com concentrações de sal. Em estudo sobre o efeito citotóxico e genotóxico do extrato de *Aristolochia elegans* por meio do sistema teste de *Allium cepa*, Paula et al. (2015) observaram alterações cromossômicas, como anáfase com cromossomo isolado e pontes anafásicas, sugerindo um efeito citotóxico da infusão de *A. elegans* sobre *A. cepa*. Pontes anafásicas e metáfases desorganizadas, entre outras alterações

também foram encontradas nas células da ponta de raízes de alface, em todos os tratamentos testados (Figura 12A).

3.5 Conclusões

O estresse salino reduz o índice mitótico e todos os índices de fases das raízes de alface.

O extrato de folhas de alface roxa não afeta o índice mitótico, mas diminui o índice de células em prófase e aumenta o número de células em telófase de raízes de alface, cv. Regina.

Todos os tratamentos testados ocasionam anormalidades cromossômicas nas células de raízes de alface.

CAPÍTULO 3

RESPOSTAS BIOQUÍMICAS EM ALFACE SUBMETIDA A ESTRESSE SALINO E À APLICAÇÃO DE EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE ALFACE ROXA

4. Respostas bioquímicas em alface submetida a estresse salino e à aplicação de extrato aquoso de folhas de alface roxa

4.1 Introdução

Os antioxidantes são substâncias que presentes em baixas concentrações, comparativamente ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato (BARREIROS et al., 2006; SOUSA et al., 2007), podendo ser induzido por diversos fatores de estresse, como por exemplo, a salinidade, que em determinadas condições pode ocasionar o estresse oxidativo.

As plantas, por sua vez, possuem sistemas antioxidativos de defesa presentes em diversos compartimentos subcelulares que, usualmente, são suficientes para evitar o dano oxidativo durante períodos de crescimento sob condições normais e de estresse moderado (BRAY et al., 2000). Entretanto, se estressadas severamente, há um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e outros compostos oxidantes, pelo acúmulo de intermediários reativos, prejudicando o sistema de defesa antioxidante e a capacidade para reparar o dano oxidativo (OBA et al., 2009). As EROs são necessárias para o desenvolvimento das plantas, mas, em concentrações elevadas podem conduzir a danos oxidativos em vários componentes celulares, tais como proteínas, lipídios e DNA, interrompendo funções celulares vitais das plantas (GUPTA e HUANG, 2014). Além disso, o estresse osmótico ocasionado pelo estresse salino pode provocar desequilíbrio de nutrientes, diminuição da atividade fotossintética e na abertura estomática (MUNNS e TESTER, 2008; RAHNAMA et al., 2010).

Os sistemas antioxidativos podem ser enzimáticos e não enzimáticos. Os enzimáticos incluem, dentre outras, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalisadora da dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), e a catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) que convertem o H_2O_2 em O_2 e H_2O (GILL e TUTEJA, 2010). Os sistemas não enzimáticos são compostos naturais, denominados substâncias bioativas, que incluem os fenólicos (tocoferóis, flavonoides e ácidos fenólicos), os terpenos, carotenoides e o ácido ascórbico os quais participam da constituição de diversos alimentos (MELO e GUERRA, 2002).

Segundo Papas (2002), numerosos grupos de fitoquímicos em vegetais são reconhecidos por sua atividade antioxidante. Os carotenoides possuem como característica estrutural a cadeia polieno, podendo apresentar grupos terminais cílicos, com substituintes contendo oxigênio. O sistema conjugado e rico em elétrons do polieno é responsável pela atividade antioxidante dos carotenoides: tanto na absorção do oxigênio singuleto ($^1\text{O}_2$) quanto de radicais livres, para interromper as reações em cadeia onde eles estão envolvidos (QUIRÓS e COSTA, 2006; MCNULTY et al., 2007; SIKORA et al., 2008). Além da proteção celular contra oxigênio singuleto, os carotenoides inibem a peroxidação de lipídeos em baixas pressões de oxigênio (DAMODARAN et al., 2008). As antocianinas, flavonoides amplamente distribuídos na natureza, são importantes pigmentos de plantas vasculares (CASTANEDA-OVANDO, 2009), sendo responsáveis pelas cores laranja, vermelho, púrpura e azul dos vegetais, dependendo do pH do meio em que se encontram (LOPES et al., 2007), e além de efeitos fisiológicos, possuem atividade antioxidante (KÄHKÖNEN e HEINONEN, 2003).

A alface é uma hortaliça bastante consumida no Brasil e muito nutritiva, pois suas folhas são ricas em folato (vitamina B9), além de conter β -caroteno, vitamina C, potássio e certos fitoquímicos, como os flavonoides e lactucina, compostos que favorecem sua notável capacidade antioxidante (COLLINS, 2004). Ao analisarem alfaces de variedade roxa, verde e escarola, Llorach et al. (2008) constataram que as roxas apresentaram maior atividade antioxidante. Este fato pode ser justificado pela grande quantidade de antocianinas presentes nesta variedade (RICE-EVANS et al., 1997).

De acordo com Selene et al. (2009), diversos extratos de plantas têm sido estudados devido ao seu poder antioxidante, uma vez que auxiliam na redução da oxidação lipídica em tecidos vegetal e animal (ANGELO e JORGE, 2007), sob condições de estresse. Estudando a aplicação de extrato de raízes de cenoura na indução de tolerância a salinidade em plântulas de feijão-caupi, Abbas e Akladious (2013) constataram que o extrato de cenoura como solução de embebição é eficaz na superação do estresse salino nas plântulas, aumentando os níveis das enzimas antioxidantes.

Estudar extratos que auxiliem as plantas a superar o estresse salino é importante, visto que os mecanismos de tolerância à salinidade nos vegetais ainda não estão completamente esclarecidos pelo fato de envolver alterações bioquímicas,

fisiológicas e moleculares (ZHU, 2002; ABREU et al., 2008). Neste sentido, objetivou-se analisar respostas bioquímicas em plântulas de alface submetidas a estresse salino e à aplicação de extrato aquoso de folhas de alface roxa.

4.2 Material e métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e as análises realizadas no Laboratório de Nutrição de Plantas do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, e no Laboratório de Solos, na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS.

Sementes comerciais de alface, cv. Regina, foram semeadas em bandejas de poliestireno de 72 células cada, contendo substrato areia lavada e autoclavada. Após a germinação, foi realizado desbaste mantendo uma plântula por célula, sendo cada tratamento constituído por quatro repetições de 18 plântulas. No momento da semeadura e aos quatro, nove, 15 e 22 dias posteriores, foram aplicados 15mL célula⁻¹ de solução composta de cloreto de sódio (NaCl) nas concentrações de 0, 30, 60, 90 e 120mM e extrato aquoso de alface roxa nas concentrações de 0, 75 e 125g de folhas L⁻¹ de água, sendo cada fator aplicado de forma isolada e combinados. Adicionalmente, foi ministrada solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND e ARNON, 1938), aplicando 10mL a meia força aos sete e 11 dias após a semeadura e 6mL, a força completa, aos 16 e 20 dias após a semeadura. Sempre que necessário, as plântulas foram irrigadas com água com auxílio de um regador.

Para a obtenção do extrato aquoso de alface roxa, folhas foram lavadas em água destilada e secas com papel toalha, sendo então pesadas de acordo com as respectivas concentrações e trituradas em liquidificador na presença de 1 litro de água destilada e o extrato filtrado em papel filtro.

Aos 24 dias após semeadura, usando clorofilômetro (modelo SPAD-502), foram obtidos os índices de clorofila (IC), flavonoides (IF), antocianinas (IA) e o balanço de nitrogênio (IN) de 15 plantas por tratamento, posicionando o leitor do aparelho na região adaxial da folha. Posteriormente a leitura, foi realizada a coleta das plantas, as quais foram submetidas às seguintes análises:

Teor de sódio: quantificado pelo método de absorção atômica, a partir da massa seca da parte aérea das plantas secas em estufa a 70 °C durante 48h, conforme metodologia descrita por Tedesco et al. (1995).

Potencial osmótico (Ψ_s): aproximadamente 300 mg de tecido vegetal (plântula inteira) foram macerados em tubos de polipropileno com capacidade para 2mL com auxílio de bastão de vidro, seguido de centrifugação a 12.000g a temperatura de 4 °C, durante 20 minutos. O sobrenadante recuperado foi analisado em osmômetro de pressão de vapor modelo 5600 VAPRO (Wescor, Logan, Utah, EUA). Os valores obtidos em mmol kg⁻¹ foram convertidos em Ψ_s por meio da equação de Van't Hoff onde, $\Psi_s = -C \times 2,58 \times 10^{-3}$, sendo C o valor de osmolalidade obtido em 10 µL de suco celular em cada medida.

Peroxidação de lipídios: determinada pela medição da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Duzentos miligramas de tecido foliar e radicular foram macerados em nitrogênio líquido acrescido de 20% de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) e homogeneizado em ácido tricloacético (TCA) 0,1% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos. A seguir, 250µL do sobrenadante foram adicionados a 1mL da solução contendo 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (p/v) de TCA. O meio de reação foi incubado a 95 °C por 30 minutos mantendo os tubos fechados, paralisando a reação por resfriamento rápido em banho de gelo e água. A absorbância das TBARS formadas foi determinada em espectrofotômetro a 535nm e 600nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada, com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela equação: [MDA] = (A₅₃₅ – A₆₀₀)/(ξ.b), onde ξ é o coeficiente de extinção (1,56 x 10⁻⁵ cm⁻¹) e b é o comprimento ótico (b = 1). A peroxidação foi expressa em nmol de MDA g⁻¹ de massa fresca.

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂): determinado conforme metodologia descrita por Velikova et al. (2000). Tecidos foliares foram macerados em uma solução a 0.1% (w/v) de ácido tricloacético (TCA) e o homogeneizado centrifugado a 12.000g por 15min. A seguir, 0.5mL do sobrenadante foram adicionados a 0.5mL de tampão fosfato de potássio 10mM (pH 7.0) e 1mL de iodeto de potássio 1M. O sobrenadante foi coletado e as leituras em espectrofotômetro realizadas a 390nm. O conteúdo de H₂O₂ foi calculado pela comparação das leituras com uma curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de H₂O₂.

Análise da atividade de enzimas antioxidantes: duzentos miligramas de tecido foliar e radicular, separadamente, foram macerados em nitrogênio líquido acrescido de 20% de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) e homogeneizados em 1,5mL do seguinte

tampão de extração: fosfato de potássio 100mM, pH 7,8, EDTA 0,1mM e ácido ascórbico 10mM. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000g por 10min a 4 °C e o sobrenadante coletado para posterior análise das enzimas descritas a seguir:

a) *Superóxido dismutase (SOD)*: avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977) em um meio de reação composto por fosfato de potássio 100mM, pH 7,8, metionina 14mM, EDTA 0,1µM, NBT 75µM e riboflavina 2µM. Os tubos com o meio de reação e a amostra foram iluminados por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra também foi iluminado. O branco permaneceu no escuro. As leituras foram realizadas a 560nm e o cálculo da enzima feito pela equação:

$$\% \text{ de inibição} = (A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima}).$$

Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

b) *Ascorbato peroxidase (APX)*: determinada segundo Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290nm. O meio de reação composto de tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,0, ácido ascórbico 0,5mM e H₂O₂ 0,1mM foi incubado a 28 °C. O decréscimo na absorbância foi monitorado por um período de dois minutos a partir do início da reação.

c) *Catalase (CAT)*: determinada conforme descrito por Azevedo et al. (1998). Sua atividade foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240nm durante dois minutos em um meio de reação incubado a 28 °C contendo tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5mM.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x5 (concentração do extrato de folhas de alface roxa x concentração da solução de NaCl) com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo Teste de F ($p<0,05$). Havendo significância estatística da interação entre fatores estudados, procedeu-se os desdobramentos correspondentes. Em caso contrário, observou-se a significância dos fatores em separado. Realizou-se comparação de médias pelo teste da diferença mínima significativa ($p<0,05$) para o fator concentração de extrato de folhas de alface roxa e regressão polinomial ($p<0,05$) para o fator concentração de solução de NaCl. Os dados foram analisados no software R Core Team (2014).

4.3 Resultados

Conforme os resultados obtidos na análise de variância, observou-se que houve interação significativa entre os fatores extrato de alface e solução de NaCl para os índices de clorofila (IC), flavonoides (IF), antocianinas (IA) e nitrogênio (IN) (Figura 14).

Na ausência do extrato, o fator concentração da solução de NaCl não influenciou o IC, no entanto, com a aplicação de 75 e 125g L⁻¹, o NaCl incrementou o IC em uma taxa de 0,017 e 0,0193 unidades mM⁻¹ de NaCl, respectivamente. Analisando a DMS, pode-se observar que as aplicações de 75 e 125g L⁻¹ de extrato foram superiores ao controle em 120mM de sal, sendo a concentração de 125g L⁻¹ superior também em 30 e 90mM, em relação ao controle (Figura 14A).

A solução de NaCl não influenciou o índice de flavonoides quando da aplicação do extrato, porém, na ausência deste, houve aumento do índice em uma taxa de 0,0008 unidades mM⁻¹ de NaCl. Igualmente, observou-se que o controle (0g L⁻¹) foi superior às outras duas concentrações de extrato, independentemente da concentração de sal, excetuando a concentração de 60mM em que não diferiram estatisticamente (Figura 14B).

Já o índice de antocianinas diminuiu em uma taxa de 0,0002IA mM⁻¹ de NaCl aplicado na ausência e na maior concentração de extrato. Além disso, pode-se destacar que houve diferença estatística entre os extratos 0 e 125g L⁻¹ em todas as concentrações de sal testadas (Figura 14C).

A aplicação de extrato de alface roxa na concentração de 125g L⁻¹ aumentou o índice de nitrogênio com o incremento da concentração salina em taxa de 0,0313 unidades mM⁻¹ de NaCl (Figura 14D), não havendo diferenças nas demais concentrações de extrato. Igualmente, se observa que o extrato na concentração de 125g L⁻¹ foi superior às demais nas concentrações de 30, 90 e 120mM de NaCl. Na Figura 15 são apresentadas plântulas de alface, aos 24 dias após a semeadura, antes da realização da leitura do índice de clorofila.

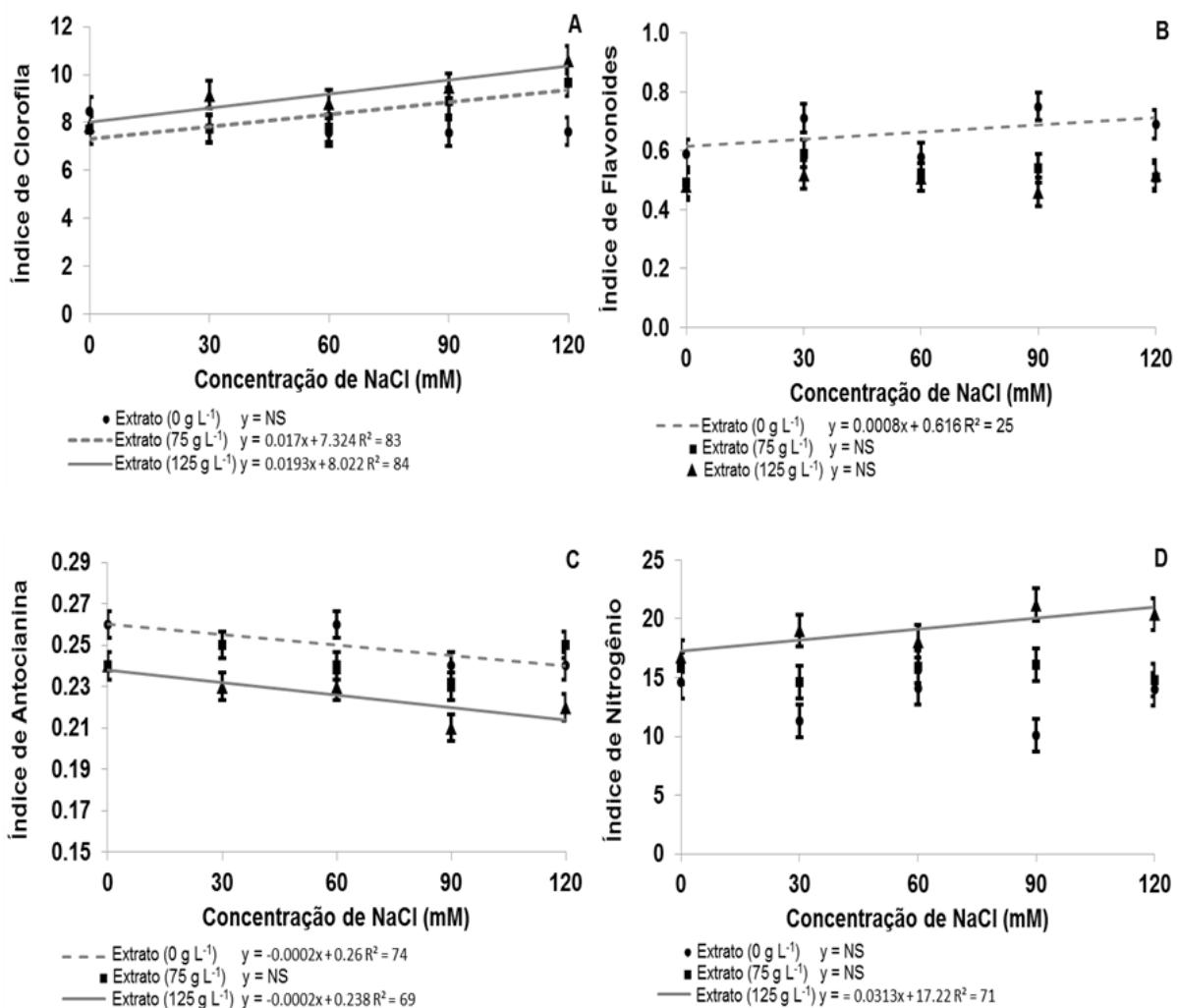


Figura 14. Índice de clorofila, flavonoides, antocianinas e nitrogênio em folhas de alface provenientes de plantas cultivadas sob diferentes concentrações de extrato de folhas de alface roxa e de NaCl. As barras correspondem ao valor da DMS (diferença mínima significativa) entre os níveis do fator concentração de extrato de alface roxa ($p<0,05$), barras que se sobreponem indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente.

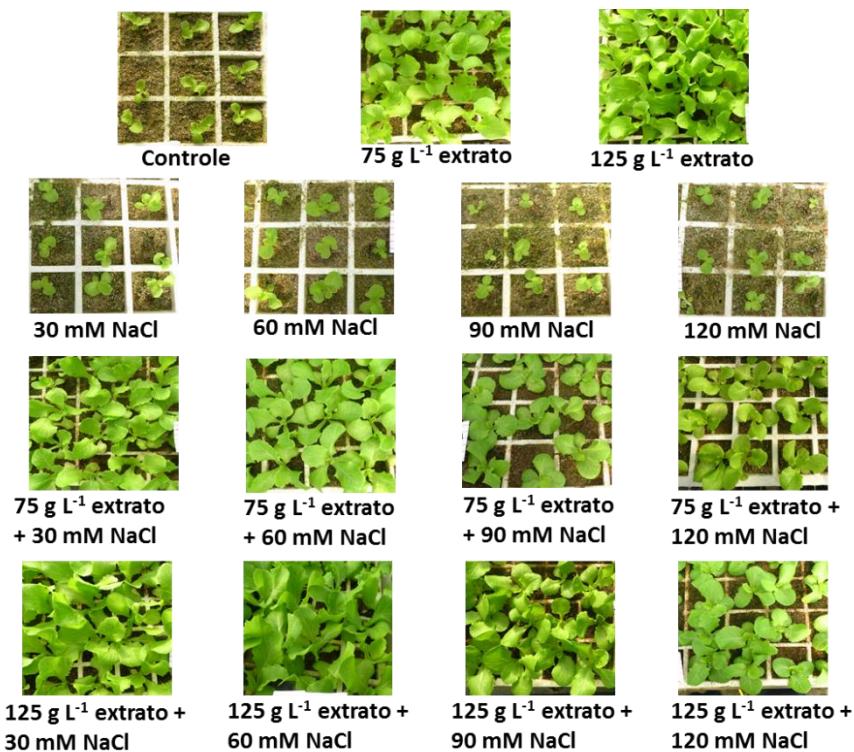


Figura 15. Plantas de alface, cv. Regina, cultivadas sob diferentes concentrações de extrato de folhas de alface roxa e de NaCl.

O teor de sódio nas folhas mostrou resposta à interação dos fatores, conforme o resultado da ANOVA. Conforme aumento da concentração de NaCl, houve a elevação do teor de sódio nas folhas nas três concentrações de extratos de alface testados, ajustando-se a modelos matemáticos de ordem quadrática, sendo que o controle foi superior aos outros dois em 0, 90 e 120mM de NaCl, conforme a DMS (Figura 16). Analisando as curvas ajustadas se observa que o controle (0g L^{-1}) provocou um teor máximo de sódio nas folhas de $9,27\text{g kg}^{-1}$, valor atingido na concentração 117,5mM de NaCl. Nos extratos 75 e 125g L^{-1} os teores máximos de sódio nas folhas foram de $7,3$ e $8,32\text{g kg}^{-1}$, os quais foram atingidos nas concentrações de 81,06 e 96,5mM de NaCl, respectivamente. Esses resultados indicam que a aplicação de extrato de folhas de alface roxa em concentração de 75g L^{-1} diminui o teor de sódio nas folhas.

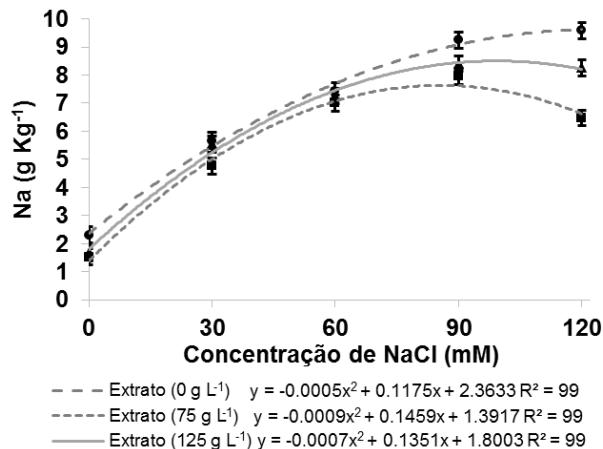


Figura 16. Teor de sódio em folhas de plantas de alface cultivadas sob diferentes concentrações de extrato de folhas de alface roxa e de NaCl. As barras correspondem ao valor da DMS (diferença mínima significativa) entre os níveis do fator concentração de extrato de alface roxa ($p<0,05$), barras que se sobreponem indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente.

Os dados obtidos para o potencial osmótico também mostraram interação significativa entre os fatores. Ao aplicar a concentração do extrato de alface de 75 g L^{-1} , o potencial osmótico das plântulas se ajustou a um modelo linear negativo, diminuindo em taxa de $0,002\text{ MPa mM}^{-1}$ de NaCl. Esse comportamento também foi observado com o extrato controle, onde o Ψ_s diminuiu em taxa de $0,0009\text{ MPa mM}^{-1}$ de NaCl (Figura 17).

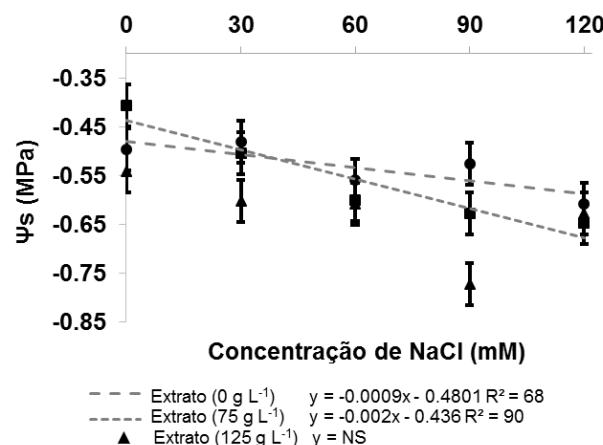


Figura 17. Potencial osmótico em plantas de alface cultivadas sob diferentes concentrações de extrato de folhas de alface roxa e de NaCl. As barras correspondem ao valor da DMS (diferença mínima significativa) entre os níveis do fator concentração de extrato de alface roxa ($p<0,05$), barras que se sobreponem indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente.

A peroxidação lipídica, tanto da parte aérea quanto da raiz das plântulas de alface, não foi influenciada pelos fatores estudados, segundo os resultados da análise de variância. O comportamento dessa variável pode ser observado na Figura 18.

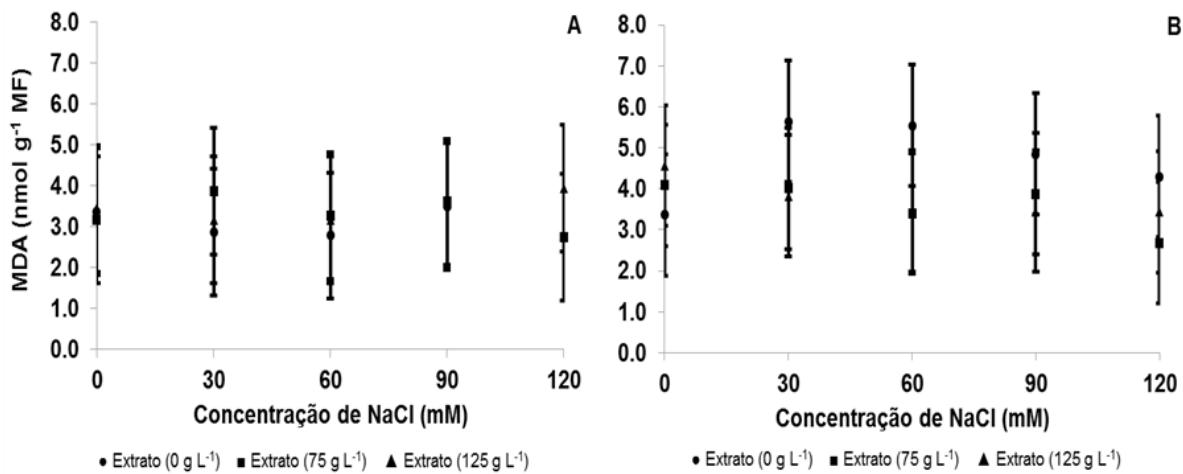


Figura 18. Peroxidação lipídica na parte aérea (A) e raiz (B) de plantas de alface cultivadas sob diferentes concentrações de extrato de folhas de alface roxa e de NaCl. As barras correspondem ao valor da DMS (diferença mínima significativa) entre os níveis do fator concentração de extrato de alface roxa ($p<0,05$), barras que se sobreponem indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente.

A concentração de peróxido de hidrogênio na parte aérea das plântulas de alface mostrou resposta à interação dos fatores, enquanto que na raiz mostrou resposta apenas aos dois fatores isoladamente (Figura 19). Na parte aérea, observou-se que com a aplicação de 125g L⁻¹ de extrato, o comportamento da variável se ajustou a um modelo quadrático negativo atingindo um ponto máximo de 4,56mmol de H₂O₂ g⁻¹ MF na concentração de 48,5mM de NaCl. Essa resposta também foi observada na ausência do extrato (0g L⁻¹), chegando a um ponto máximo de 7,92mmol de H₂O₂ g⁻¹ MF na concentração de 65,8mM de NaCl (Figura 19A). Igualmente se observou que o extrato controle foi estatisticamente superior aos demais nas concentrações 30, 60 e 90mM de NaCl (Figura 19A).

Já na raiz, a concentração de peróxido de hidrogênio aumentou conforme elevou a concentração de NaCl em taxa de 0,0047mmol de H₂O₂ g⁻¹ MF por mM de NaCl ministrado (Figura 19B). Além disso, a concentração de H₂O₂ foi maior ao não se aplicar extrato de alface e menor na aplicação de 75g L⁻¹ (Figura 19C).

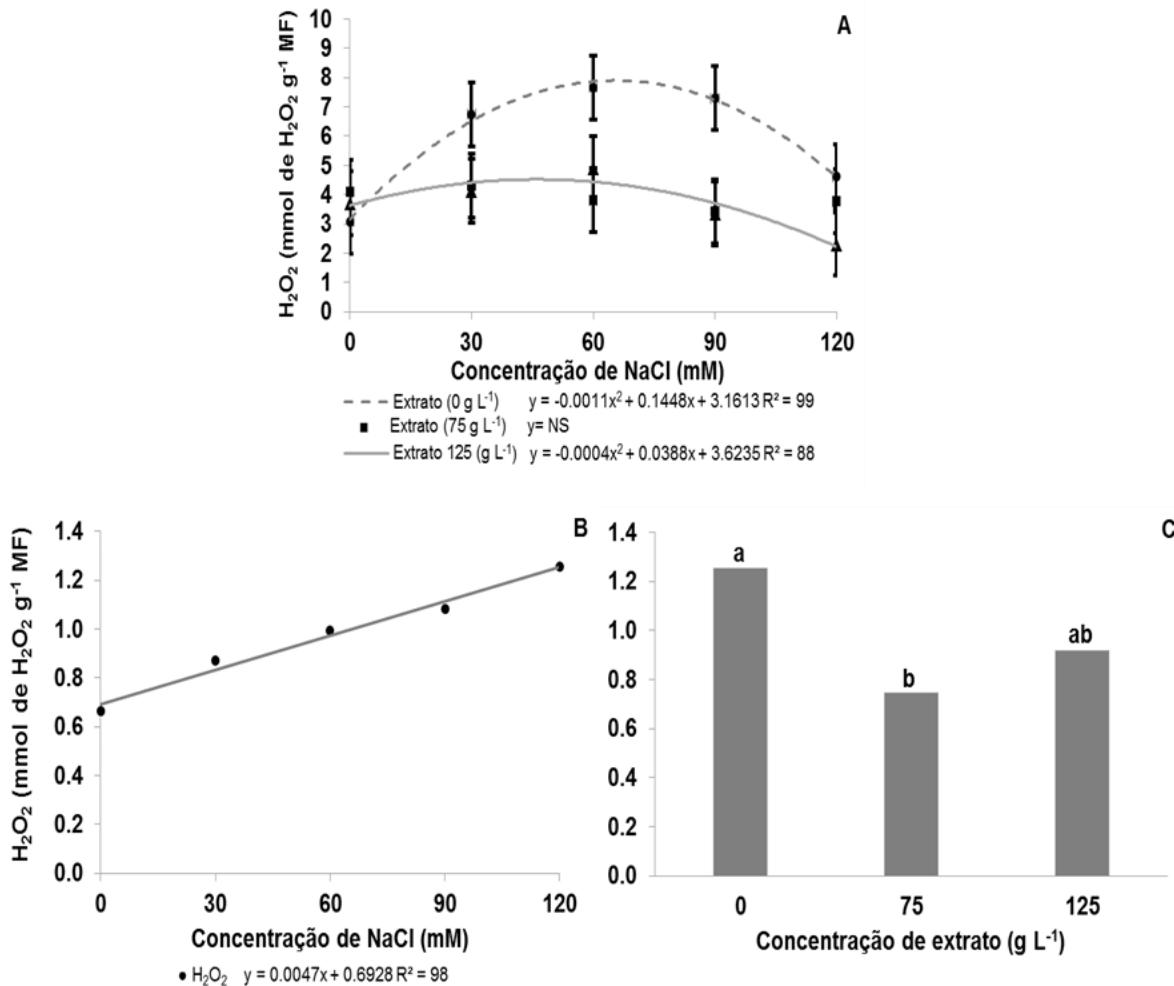


Figura 19. Peróxido de hidrogênio na parte aérea (A) e raiz (B, C) de plantas de alface cultivadas sob diferentes concentrações de extrato de folhas de alface roxa e de NaCl. As barras correspondem ao valor da DMS (diferença mínima significativa) entre os níveis do fator concentração de extrato de alface roxa ($p<0,05$), barras que se sobreponem indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente.

O comportamento da enzima superóxido dismutase (SOD) na parte aérea das plântulas de alface foi influenciado pelos fatores concentração de extrato de alface e de NaCl, porém não pela interação entre eles, o qual ocorreu na raiz das plântulas. A atividade da SOD na parte aérea diminuiu com o incremento da concentração de sal em taxa de $0,1526\text{U mg}^{-1}$ de proteína por mM de NaCl (Figura 20A). Além disso, a enzima apresentou menor atividade com a aplicação do extrato de alface, em relação ao controle (sem aplicação) (Figura 20B).

Na raiz, observou-se que sem a aplicação do extrato, as concentrações de NaCl provocaram uma resposta do tipo quadrática, atingindo um pico máximo de $291,33\text{U mg}^{-1}$ de proteína na concentração de $62,2\text{mM}$ de NaCl. Com a aplicação de 75g L^{-1} , o comportamento da SOD ajustou-se a um modelo quadrático positivo,

registrando-se uma concentração mínima da enzima de $104,5\text{U mg}^{-1}$ de proteína na concentração de $41,5\text{mM}$ de NaCl. Já a concentração de 125g L^{-1} não teve efeito sobre o comportamento da SOD (Figura 20C). De acordo com a DMS, a atividade da enzima foi inferior com as aplicações de 75 e 125g L^{-1} de extrato, em relação ao controle, nas concentrações de 30 , 60 e 90mM de NaCl (Figura 20C).

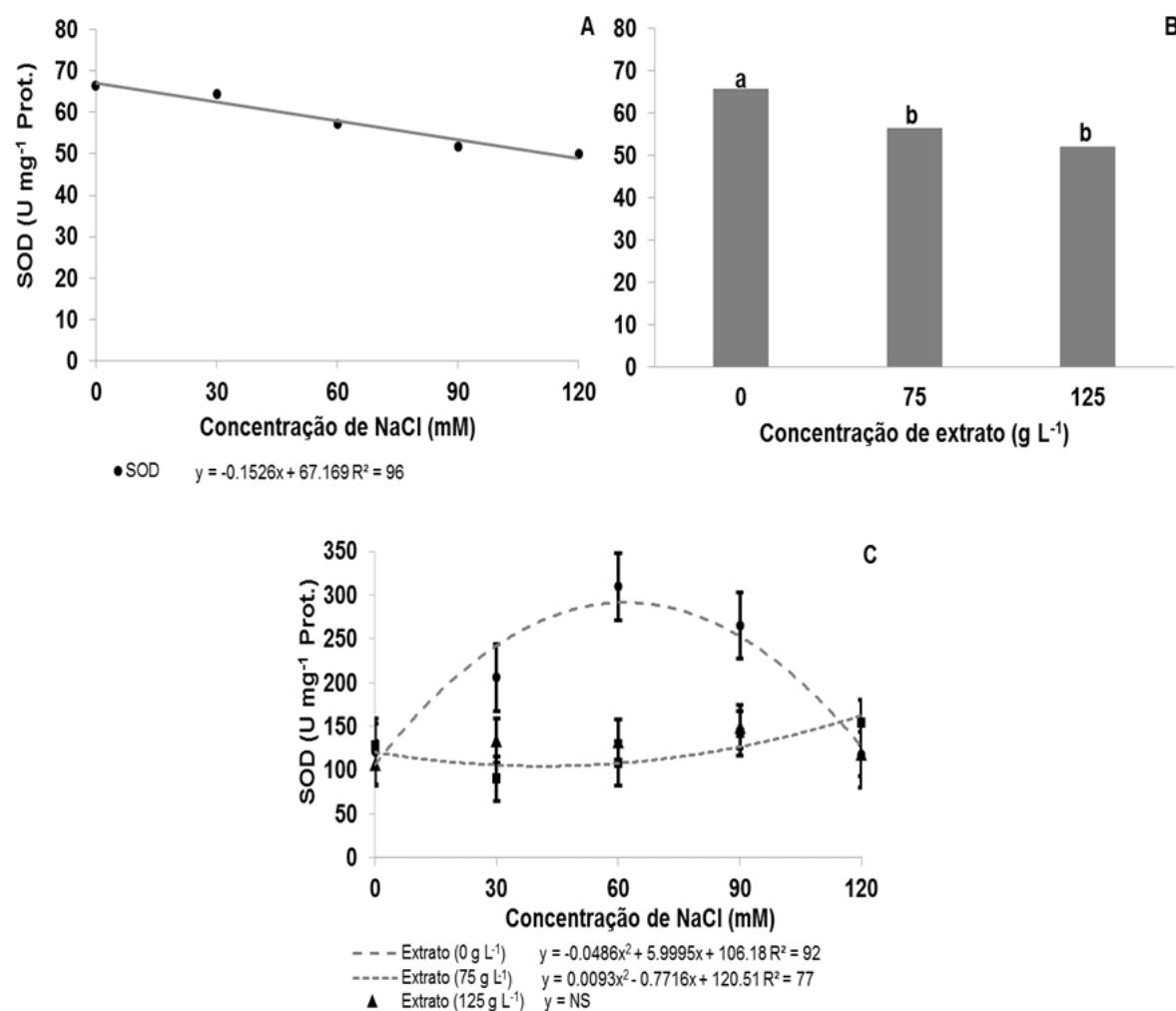


Figura 20. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na parte aérea (A e B) e raiz (C) de plantas de alface cultivadas sob diferentes concentrações de extrato de folhas de alface roxa e de NaCl. As barras correspondem ao valor da DMS (diferença mínima significativa) entre os níveis do fator concentração de extrato de alface roxa ($p<0,05$), barras que se sobreponem indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente.

O comportamento da enzima ascorbato peroxidase (APX) não foi influenciado pelos fatores estudados na mensuração na parte aérea das plântulas (Figura 21A). Já na raiz, mostrou resposta à interação entre os fatores. Ao aplicar o extrato controle, a atividade da enzima se ajustou a um modelo quadrático negativo, atingindo um ponto

máximo de 89,7mmol ASA min⁻¹ mg⁻¹ de proteína na concentração de 66,5mM de NaCl. Na aplicação do extrato de 75g L⁻¹, a atividade da APX se ajustou a um modelo linear positivo, aumentando em taxa de 0,2089mmol ASA min⁻¹ mg⁻¹ de proteína por cada mM de NaCl acrescentado. Já para o extrato de 125g L⁻¹, a atividade da enzima também se ajustou a um modelo quadrático negativo, atingindo uma atividade máxima de 66,1mmol ASA min⁻¹ mg⁻¹ de proteína na concentração de 68,6mM de NaCl (Figura 21B). Igualmente, observou-se que a atividade da APX foi menor com a aplicação de 75 e 125g L⁻¹ de extrato na concentração de 60mM de sal, em relação ao controle (0g L⁻¹). Resposta também observada na concentração de 90mM, em que a aplicação de 125g L⁻¹ de extrato resultou em menor atividade da enzima em relação ao controle (Figura 21B).

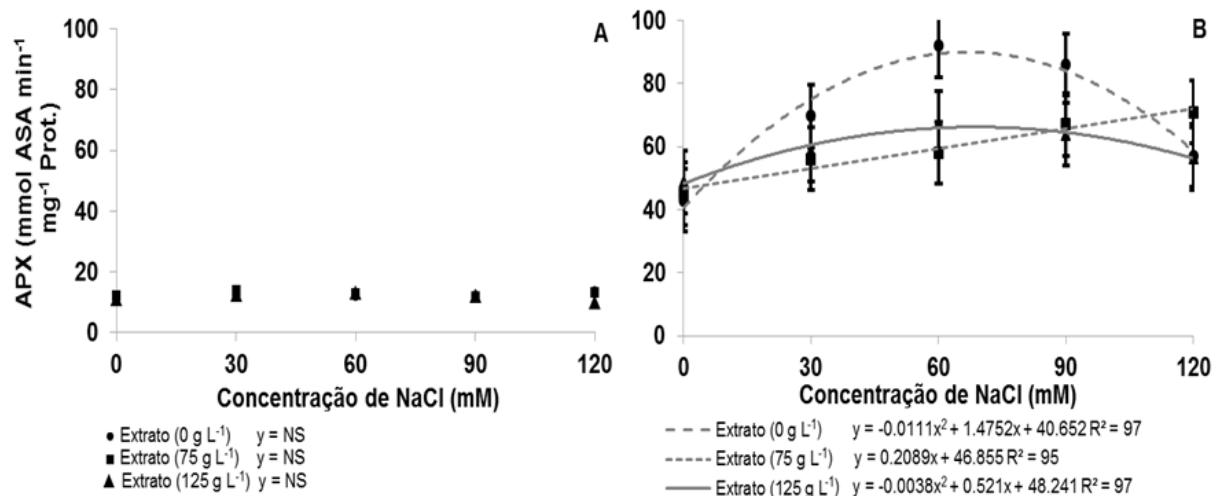


Figura 21. Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) na parte aérea (A) e raiz (B) de plantas de alface cultivadas sob diferentes concentrações de extrato de folhas de alface roxa e de NaCl. As barras correspondem ao valor da DMS (diferença mínima significativa) entre os níveis do fator concentração de extrato de alface roxa ($p<0,05$), barras que se sobreponem indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente.

Na Figura 22 é apresentada a atividade da catalase (CAT). Observa-se que na parte aérea das plântulas, a enzima mostrou resposta somente à aplicação de NaCl, aumentando sua atividade em taxa de 0,0858 μ mol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína por cada mM de NaCl acrescentado (Figura 22A).

A atividade da CAT na raiz apresentou resposta à interação dos fatores estudados. Ao aplicar a concentração de 0g L⁻¹ extrato, a atividade da CAT se ajustou a um modelo quadrático negativo, atingindo um pico máximo de atividade de 22,2 μ mol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína na concentração de 101,3mM de NaCl. Entretanto, a

atividade da enzima não se ajustou a nenhum modelo matemático testado nas demais concentrações (Figura 22B). Analisando os resultados da DMS, observou-se que a partir da dose 60mM de NaCl, a atividade da enzima foi superior no extrato controle (0 g L^{-1}) em relação aos demais testados (Figura 22B).

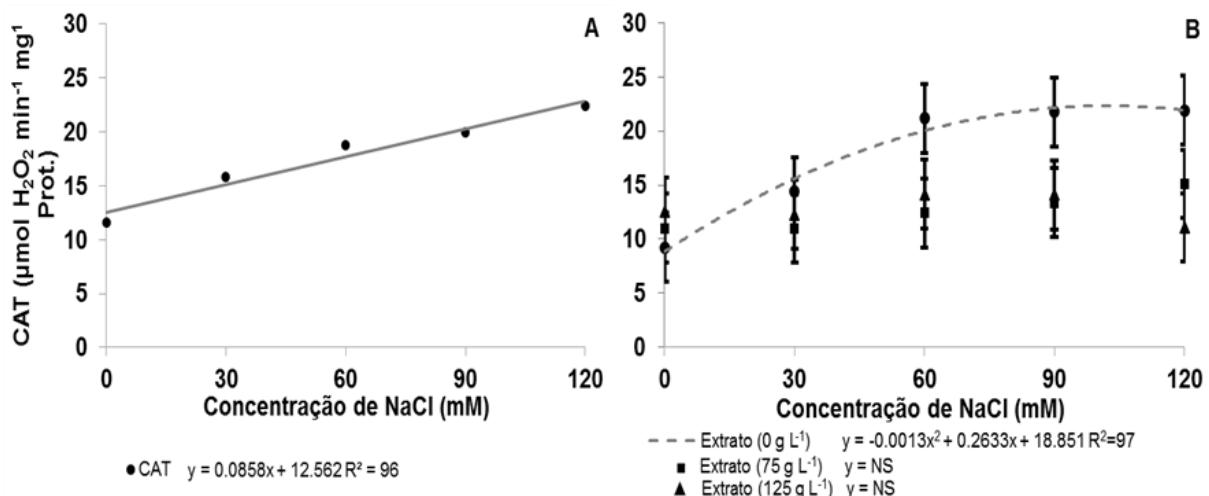


Figura 22. Atividade da enzima catalase (CAT) na parte aérea (A) e raiz (B) de plantas de alface cultivadas sob diferentes concentrações de extrato de folhas de alface roxa e de NaCl. As barras correspondem ao valor da DMS (diferença mínima significativa) entre os níveis do fator concentração de extrato de alface roxa ($p<0,05$), barras que se sobreponem indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente.

4.4 Discussão

As plântulas de alface não apresentaram diferenças no índice de clorofila com o aumento da concentração do sal na ausência do extrato de folhas de alface roxa, entretanto, com a aplicação dos extratos houve elevação no índice de clorofila, conforme se incrementou a concentração de cloreto de sódio (Figura 14A). Rodrigues (2002) relatou que a alface é uma espécie tolerante à salinidade, enquanto que Munns (1993) descreveu que a salinidade aumenta o índice de clorofila em plantas tolerantes. Tais resultados corroboram com os encontrados nesse experimento e com os encontrados por Paulus et al. (2010) em alface e por Silva et al. (2012) em rúcula. Baseado nas informações da literatura e nos resultados obtidos, pode-se inferir que os extratos de alface roxa auxiliam em algum processo adaptativo ou protetivo da planta à salinidade, permitindo que, mesmo em altas concentrações de sal, as clorofilas não se degradem.

A síntese de antocianinas está diretamente relacionada à incidência de luz, equilíbrio nutricional, mudanças de temperatura durante o crescimento e amadurecimento, e ao próprio sistema de cultivo, tendo-se estabelecido que práticas agronômicas que aumentam o crescimento vegetativo resultam em decréscimo da síntese de antocianinas (SEVERO et al., 2010). Conforme observado na Figura 14C, houve redução no conteúdo de antocianinas conforme aumentou a concentração do sal, sendo que com a aplicação de 125g L⁻¹ de extrato de folhas de alface roxa, o índice foi inferior ao tratamento sem aplicação de extrato em todos os níveis de salinidade. Conforme observado durante a condução do experimento, o extrato de alface auxiliou no desenvolvimento das plântulas (Figura 15), permitindo maior crescimento vegetativo, corroborando com o exposto por Severo et al. (2010).

O índice de nitrogênio nas plântulas aumentou com a aplicação de 125g L⁻¹ de extrato de alface roxa (Figura 14D). De acordo com Esteves e Suzuki (2008), a tolerância à salinidade em plantas está relacionada com a concentração de compostos nitrogenados. Segundo estes autores o acúmulo de amidas, proteínas, aminoácidos e poliaminas em plantas submetidas ao estresse salino auxiliam na desintoxicação das células, na proteção de macromoléculas, na manutenção do pH celular, na minimização dos efeitos das EROs e na regulação do ajustamento osmótico. Isso demonstra que a aplicação do extrato de folhas de alface roxa em concentração de 125g L⁻¹ foi favorável para diminuir o estresse ocasionado pelos sais.

Segundo Willadino e Camara (2010), o ajustamento osmótico é um processo usado por plantas em condição de estresse salino, no qual ocorre um aumento do teor de solutos orgânicos e inorgânicos na planta com o objetivo de diminuir o potencial hídrico a um nível menor do que o solo, permitindo assim a absorção de água e favorecendo a manutenção do turgor. Este processo de ajustamento osmótico é visualizado na Figura 17, onde o potencial osmótico das plantas diminui conforme se aumenta a concentração de sal, provavelmente produto do aumento da concentração de Na, clorofitas e compostos nitrogenados (Figuras 14A, 14D e 16). É importante destacar aqui, que o ajustamento osmótico foi promovido de forma mais eficiente pela aplicação do extrato de 75g L⁻¹ de alface roxa, onde se observou uma taxa de diminuição do potencial osmótico de 0,002MPa mM⁻¹ de NaCl, contra uma taxa de diminuição de 0,0009Mpa mM⁻¹ de NaCl observada na situação sem aplicação de extrato.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram de maneira consistente o efeito positivo causado pelos extratos aquosos de folhas de alface roxa usados no experimento, quanto à absorção de sal pelas plântulas, sendo que as concentrações do extrato de 75 e 125g L⁻¹ diminuíram significativamente o teor de sódio nas folhas em comparação com a concentração nula (Figura 16). Paulus et al. (2012) verificaram aumento no teor de sódio em folhas de alface com o incremento nos níveis de salinidade na água, resultados concordantes com os encontrados neste experimento. Por outro lado, Taiz e Zeiger (2004) relataram que a absorção de sais pelas plantas depende em parte da capacidade das raízes em impedir que íons potencialmente prejudiciais alcancem as partes aéreas, assim podemos considerar que os extratos de alface usados podem ter auxiliado a diminuir a absorção de sódio pelas raízes e/ou a translocação do elemento para a parte aérea das plântulas.

Pode-se observar também, em relação à parte aérea, que a aplicação do extrato auxiliou diminuindo ou evitando o estresse oxidativo, pois houve redução na concentração de peróxido de hidrogênio com a aplicação de 125g L⁻¹ de extrato, mesmo com o incremento da concentração salina (Figura 18A). Já o sal, ao ser aplicado isoladamente, acarretou aumento no H₂O₂, conforme aumento da concentração, juntamente com um aumento na atividade da CAT (Figura 22), a qual é uma enzima efetiva em concentrações altas de peróxido de hidrogênio e é considerada imprescindível na desintoxicação de ERO's em condições de estresse severo (BARBOSA et al., 2014). Além disso, conforme observado na Figura 14B, houve também aumento no índice de flavonoides com o incremento das concentrações de NaCl e ausência do extrato de alface, o que permite inferir que esses compostos aumentaram seu índice para auxiliar na defesa da planta ao estresse provocado pelo sal, juntamente com a atividade da enzima catalase, já que os flavonoides possuem como função principal proteger as plantas contra agentes oxidantes (Lopes et al., 2010). Entretanto, quando procedeu-se a aplicação do extrato, ocorreu o contrário, sendo a atividade das enzimas menor e não havendo diferença no conteúdo de flavonoides conforme aumentou a concentração de sal (Figura 14B), demonstrando que estes compostos atuaram em conjunto com as enzimas antioxidantes em defesa da planta.

Já na raiz, pode-se observar uma maior atividade das enzimas, principalmente na ausência do extrato, já que não há síntese dos pigmentos protetores, como flavonoides, encontrados na parte aérea das plantas. Entretanto, assim como nas

folhas, a concentração de peróxido de hidrogênio e a atividade das enzimas antioxidantes das plântulas de alface em que foi aplicado o extrato de alface roxa, foi menor, em relação a sua ausência. Esta ocorrência pode estar associada a intervenção do extrato na absorção e à translocação de sódio na planta, à atuação conjunta dos flavonoides e enzimas antioxidantes, evitando assim, o estresse oxidativo.

4.5 Conclusões

O extrato de folhas de alface roxa é eficiente para reduzir o estresse oxidativo em plantas de alface, em ambiente salino, justificado pelo aumento no índice de clorofila e de nitrogênio e pela menor concentração de sódio nas folhas.

A aplicação do extrato de folhas de alface roxa ocasiona menor estresse à planta de alface, reduzindo a concentração de peróxido de hidrogênio e atividade das enzimas antioxidantes tanto na parte aérea como na raiz das plântulas de alface, em relação à aplicação de sal.

5- Considerações Finais

Analisando o desenvolvimento inicial de plântulas de alface submetidas a diferentes concentrações de extrato de folhas de alface roxa combinado ou não a soluções salinas, compostas por cloreto de sódio, observa-se que o uso de extrato de folhas de alface roxa proporciona incrementos na germinação e auxilia o desenvolvimento inicial de plântulas de alface, reduzindo o estresse causado pelo sal.

Em relação à atividade citogenética das raízes de alface, pode-se concluir que o extrato de alface roxa não afeta o índice mitótico, mas diminui o índice de células em prófase e aumenta o número de células em telófase de raízes de alface. Já o sal, reduz o índice mitótico, bem como todos os índices de fases das raízes de alface.

Sobre os aspectos bioquímicos das plântulas de alface, verificou-se que o extrato de folhas de alface roxa é eficiente para reduzir o estresse oxidativo em plantas de alface, em ambiente salino, justificado pelo aumento no índice de clorofila e de nitrogênio e pela menor concentração de sódio nas folhas. A aplicação do extrato de folhas de alface roxa ocasiona menor estresse à planta de alface, reduzindo a concentração de peróxido de hidrogênio e atividade das enzimas antioxidantes tanto na parte aérea como na raiz das plântulas de alface, em relação à aplicação de sal.

De forma prática, o uso do extrato aquoso de folhas de alface roxa pode auxiliar produtores de diferentes culturas, como por exemplo, hortaliças cultivadas em hidroponia, visando potencializar o desenvolvimento das plantas, mesmo quando da ausência de ambiente salino, justificado pelos resultados positivos encontrados em diferentes parâmetros de crescimento avaliados no presente trabalho. É importante ressaltar que a cultivar de alface Regina, utilizada no presente trabalho, serviu apenas como organismo teste, não sendo o intuito do trabalho avaliar a tolerância da espécie à salinidade. Entretanto, estudos mais aprofundados que englobem a composição química e mineral do extrato de folhas de alface roxa, bem como relacionados a respostas bioquímicas de outras espécies submetidas à aplicação do mesmo, devem ser realizados para esclarecer a viabilidade do uso do referido extrato e ratificar possíveis incrementos na produção de diferentes culturas, na ausência ou sob condições de estresse salino.

Referências

- ABBAS, S.M.; AKLADIOUS, S.A. Application of carrot root extract induced salinity tolerance in cowpea (*Vigna sinensis* L.) seedlings. **Pakistan Journal of Botany**, Pakistan, v.45, n.3, p.795-806, 2013.
- ABREU, C.E.B.; PRISCO, J.T.; NOGUEIRA, A.R.C.; BEZERRA, M.A.; LACERDA C.F.; GOMES-FILHO, E. Physiological and biochemical changes occurring in dwarf-cashew seedlings subjected to salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Rio de Janeiro, v. 20, n.2, p.105-118, 2008.
- AHMAD. P.; JALEEL, C.A.; SALEM, M.A.; NABI, G.; SHARMA, S. Roles of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v.30, n.3, p.161–175, 2010.
- AKYIL, D.; OKTAY, S.; LIMAN, R.; EREN, Y.; KONUK, M. Genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *Achillea teretifolia*. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v.36, p.441–448, 2012.
- ALISSON, S.E.; BROWN, J.W.; HAYWARD, H.E.; RICHARDS, L.A.; BERSNSTEIN, L.; FIREMAN, M.; PEARSON, G.A.; WILCOX, L.V.; BOWER, C.A.; HAAATCHER, J.T.; REEVE, R.C. **Suelos Salinos y Sodicos**. L.A. Richards, Editor, 1985. 172p.
- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, xii ,1998. 464p.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.66, n.1, p.1-9, 2007.
- ANURADHA, S.; RAO, S.S.R. Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.33, n.2, p.151–153, 2001.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.55, p. 373–399, 2004.
- ARBOS, K.A.; FREITAS, R.J.S. de; STERTZ, S.C.; DORNAS, M.F. Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 501-506, 2010.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, New York, v.166, n.1, p.3-16, 2004.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Malden, v.104, p.280-292, 1998.

AYERS, R.S.; WESTCOT, D.W. **A qualidade de água na agricultura.** 2.ed. Campina Grande: UFPB, 1999, 153p. FAO. (Estudos Irrigação e Drenagem, 29 revisado).

BALOĞLU, M.C.; KAVAS, M.; AYDIN, G.; ÖKTEM, H.A.; YÜCEL, A.M. Antioxidative and physiological responses of two sunflower (*Helianthus annuus*) cultivars under PEG-mediated drought stress. **Turkish Journal of Botany**, Ankara, v.36, p.707–714, 2012.

BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M.A.; WILLADINO, L.; ULISSSES, C.; CAMARA, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.14, n.3, p.453-460. 2014.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa dos organismos. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.12, p.123-30, 1999.

BOHNERT, H.J.; NELSON, D.E.; JENSEN, R.G. Adaptations to environmental stresses. **Plant Cell**, Waterbury, v. 7, p.1099-1111, 1995.

BORELLA, J.; MARTINAZZO, E.G.; AUMONDE, T.Z.; AMARANTE, L.; MORAES, D.M.; VILLELA, F.A. Respostas na germinação e no crescimento inicial de rabanete sob ação de extrato aquoso de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. **Acta Botânica Brasilica**, Minas Gerais, v.26, n.2, p. 404-409, 2012.

BRASIL. **Regras para análise de sementes.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS. 2009. 399p.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B., GRUISEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, Rockville: ASPP, p.1158-1203, 2000.

CAMILI, E.C.; AZEVEDO, C.C.B.V. de; BOCUTI, E.D.; SILVÉRIO, J. de M.; BARROS, K. da C.; SILVA, A.R.B. da; SEABRA JÚNIOR, S. Cultivo consorciado de alface sob diferentes arranjos espaciais e manejo do dossel de tábua. **Revista Agrarian**, Dourados, v.6, n.20, p.110-120, 2013.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. de L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M.E.; RODRÍGUEZ, J.A.; GALÁN-VIDAL, C.A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 113, p. 859 – 871, 2009.

CAVALCANTE, L.F.; CORDEIRO, J.C.; NASCIMENTO, J.A.M.; CAVALCANTE, I.H.L.; DIAS, T.J. Fontes e níveis da salinidade da água na formação de mudas de mamoeiro cv. Sunrise solo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, 31, 1281-1290, 2010.

CEASA - Central de Abastecimento de Campinas. **Padronização: alface.**
http://ceasacampinas.com.br/padronização_alface.htm.

COLLINS A.. Lettuce. In: **AC diet food and nutrition**. 2004. Disponível em <http://www.annecollins.com/dietnutrition/lettuce>.

CROUCH, I.J.; VAN STADEN, J. Effect of seaweed concentrate on the establishment and yield of greenhouse tomato plants. **Journal of Applied Phycology**, Boulder, v. 4, p.291– 296, 1992.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. R. **Fennema's food chemistry**. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. 1144 p.

Dragoeva, A.P.; Koleva, V.P.; Nanova, Z.D.; Georgiev, B.P. Allelopathic Effects of Adonis vernalis L.: Root Growth Inhibition and Cytogenetic Alterations. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, Bulgaria, v. 4, p.48-55, 2015.

ESTEVES, B.S.; SUZUKI, M.S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v.12, n.4, p. 662-679. 2008.

FACHINETTO, J.M.; BAGATINI, M.D.; DURIGON, J.; SILVA, A.C.F. da; TEDESCO, S.B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureoides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.17, n.1, p.49-54, 2007.

FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.11, n.4, p.360-367, 2009.

FARIAS, S.G.G.; SANTOS, D.R.; FREIRE, A.L.O.; SILVA, R.B. Estresse salino no crescimento inicial e nutrição mineral de gliricídia (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunt ex Steud) em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p.1499-1505, 2009.

FERNANDES, A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.G.; FONSECA, M.C.M. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.2, p. 195-200, 2002.

FERREIRA, R.G.; TÁVORA, F.J.A.T.; HERNANDEZ, F.F.F. Distribuição da matéria seca e composição química das raízes, caule e folhas de goiabeira submetida a estresse salino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, p.79-88, 2001.

FLOWERS, T.J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.307-319, 2004.

FLOWERS, T.J.; FLOWERS, S. A. Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? **Agricultural Water Management**, v.78, p.15-24, 2005.

FONSECA, V.B.; TAVARES, V.R. da S.; GONÇALVES, V. de M.; FREITAG, R.A.; BOBROWSKI, V.L. Allelopathic potential of leaves and flowers extracts of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Científica**, Jaboticabal, v.44, n.1, p.35-39, 2016.

FORMAGIO, A.S.N; MASETTO, T.E.; VIEIRA, M. do C.; ZÁRATE, N.A.H.; DE MATOS, A.I.N.; VOLOBUFF, C.R.F. Potencial alelopático e antioxidante de extratos vegetais. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, p. 629-638, 2014.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Reino Unido, v.59, p.309-314, 1977.

GIL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como Observar Cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: Funpec, 2002. 131p

GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization. **International Journal of Genomics**, v. 2014, n. 1, p. 1–18, 2014.

HARTER, L.S.H.; HARTER, F.S.; DEUNER, C.; MENEGHELLO, G.E.; VILLELA, F.A. Salinidade e desempenho fisiológico de sementes e plântulas de mogongo. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v.32, n.1, 2014.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**, Berkeley, Circular. n.347, 1938.

HOSSAIN, M.A.; MUNEMASA, S.; URAJI, M.; NAKAMURA, Y.; MORI, I.C.; MURATA, Y. Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Reino Unido, v.156, p.430–438, 2011.

IOANNIDIS, N.E.; CRUZ, J.A.; KOTZABASIS, K.; KRAME, D.M. Evidence that putrescine modulates the higher plant photosynthetic proton circuit. **Plos One**, São Francisco, v.7, n.1, e29864, 2012.

IQBAL, N.; MASOOD, A.; KHAN, N.A. Phytohormones in salinity tolerance: ethylene and gibberellins cross talk. In: KHAN, N.A.; NAZAR, R.; IQBAL, N.; ANJUM, N.A. (eds) **Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants**. Springer, Berlin, 2012. p.77–98.

ITO, M.; Factors controlling cyclin B expresion. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v.43, p. 677- 690, 2000.

JAMES, R.A.; BLAKE, C.; BYRT., MUNNS, R. Major genes for Na⁺ exclusion, Nax1 and Nax2 (wheat HKT1;4 and HKT1;5), decrease Na⁺ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.62, n.8, p.2939–2947, 2011.

KÄHKÖNEN, M. P.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 51, n. 3, p. 628-633, 2003.

KESHAVARZI, M.H.B. Studying the effects of different levels of salinity which caused by NaCl on early growth and germination of *Lactuca sativa* L. seedling. **Journal of stress physiology & biochemistry**, v. 8, n. 1, p. 203-208, 2012.

LLORACH, R.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GIL, M.I.; FERRERES, F. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 108, n. 3, p. 1028-1038, 2008.

LOPES, T.J.; XAVIER, M.F.; QUADRI, M.G.N.; QUADRI, M.B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 3, p. 291-297, 2007.

LUCENA, C.C. de; SIQUEIRA, D.L. de; MARTINEZ, H.E.P.; CECON, P.R. Efeito do estresse salino na absorção de nutrientes em mangueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n.1, p.297-308, 2012.

LUTSENKO, E.K.; MARUSHKO, E.A.; KONONENKO, N.V.; LEONOVA, T.G. Effects of fusicoccin on the early stages of sorghum growth at high NaCl concentrations. **Russian Journal of Plant Physiology**, Rússia, v.52, p.332–337, 2005.

MACHADO, A. de A.; CONCEIÇÃO, A.R. **WinStat: sistema de análise estatística para Windows**. Versão 2.0. Pelotas: UFPel/NIA, 2003.

MANCUSO, S.; AZZARELLO, E.; MUGNAI, S.; BRIAND, X. Marine bioactive substances (IPA extract) improve ion fluxes and water stress tolerance in potted *Vitis vinifera* plants. **Advances in Horticultural Science**, v.20, p.156 – 161, 2006.

McDONALD, S.; PRENZLER, P.D.; ANTOLOVICH, M.; ROBARDS, K. Phenolics content and antioxidant activity of olive extracts. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 73, p. 73-84, 2001.

MCNULTY, H.P.; BYUN, J.; LOCKWOOD, S.F.; JACOB, R.F.; MASON, P. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, n. 1, p. 167-174, 2007.

MEDEIROS, D.C.; LIMA, B.A.B.; BARBOSA, M.R.; ANJOS, R.S.B.; BORGES, R.D.; CAVALCANTE NETO, J.G.; MARQUES, L.F. Produção de mudas de alface com biofertilizantes e substratos. **Horticultura Brasileira**, Mossoró, v. 25, n. 3, 2007.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim SBCTA**, Campinas, v.36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MITTOVA, V.; TAL, M.; VOLOKITA, M.; GUY, M. Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species but not in the cultivated species. **Physiologia Plantarum**, v.115, p.393-400, 2002.

MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; COSTA, S.M.O.; AGUIAR, L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v.19, n.1B, p.315-320, 2009.

MORALES, M.A.; OLMO, E.; TORRECILLAS, A.; ALARCON, J.J. Differences in water relations, leaf ion accumulation and excretion rates between cultivated and wild species of *Limonium* sp. grown in conditions of saline stress. **Flora**, Jena, v.196, n.5, p.345-352, 2001.

MUNNS, R. Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypothesis. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.16, n.1, p.15-24, 1993.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: Bring them together. **New Phytologist**, v.143, p.645-663, 2005.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annuario Journal Plant Biology**, Austrália, v. 1, n. 59, p. 651-681, 2008.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; PANUCCIO, M.R.; SANTONOCETO, C.; ORSINI, F.; De PASCALE, S. Plant responses in saline and semiarid environments: an overview. **The European Journal of Plant Science and Biotechnology**, v.5, p.1-11, 2011.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.22, n.5, p.867-880, 1981.

NASS, L.L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos Vegetais e Biotecnologia. 2007. 858p.

OBA, E.T.; MARIANO, W.S.; SANTOS, L.R.B. **Estresse em peixes cultivados:** agravantes e atenuantes para o manejo rentável. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. EMBRAPA AMAPÁ-MACAPÁ, 2009. p.226-247.

OLIVEIRA, M. dos S.; DORS, G.C.; SOUZA-SOARES, L.A. de; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.18, n.3, p. 267-275, 2007.

OLIVEIRA, F. de A. de; CARRILHO, M.J.S. de O.; MEDEIROS, J.F. de; MARACAJÁ, P.B.; OLIVEIRA, M.K.T. de. Desempenho de cultivares de alface submetidas a diferentes níveis de salinidade da água de irrigação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.15, n.8, p.771–777, 2011.

PAPAS, A.M. Beyond α-tocopherol: The role of the other tocopherols and tocotrienols. In: **Phytochemicals in Nutrition and Health**. MESKIN, M.S.; BIDLACK, W.R.; DAVIES, A.J.; OMAYE, S.T. Eds. CRC Press: New York, NY, USA, 2002; pp. 61–78.

PARIMELAZHAGAN, T.; FRANCIS, K. Antifungal activity of Clerodendrum viscosum against *Curvularia lunata* in rice seeds. **Journal of Mycology and Plant Pathology**, v.29, p.139- 141, 1999.

PAULA, R.P. de; BUENO, S.S. de S.; SCHMITT, K.F.M.; TIAGO, A.V.; ROSSI, A.A.B. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de citotoxicidade e genotoxicidade em *Aristolochia elegans* Mast. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.11 n.21; p.1749-1756, 2015.

PAULUS, D.; DOURADO NETO, D.; FRIZZONE, J. A.; SOARES, T. M. Produção e indicadores fisiológicos de alface sob hidroponia com água salina. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.28, n.1, p.29-35, 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**, Viçosa, v. 59, n.1, p. 110-117, 2012.

PEDÓ, T.; AISENBERG, G.R.; AUMONDE, T.Z.; VILLELA, F.A. Desempenho fisiológico de sementes e plântulas de genótipos de Cucurbitaceae e Solanaceae em ambiente salino. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.8, n.2, p.1-7, 2014.

PEKOL, S.; BALOĞLU, M.C.; ÇELİK ALTUNOĞLU, Y. Evaluation of genotoxic and cytologic effects of environmental stress in wheat species with different ploidy levels. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v.40, p.1-9, 2016.

PEREIRA, O.C.N.; BERTONHA, A.; FREITAS, P.S.L.; GONÇALVES, A.C.A. REZENDE, R; SILVA, F.F. Produção de alface em função de água e de nitrogênio. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 381-386, 2003.

PEREZ-CLEMENTE, R.M.; VIVES, V.; ZANDALINAS, S.I.; LOPEZ-CLIMENT, M.F.; MUÑOZ, V.; GOMEZ-CADENAS, A. Biotechnological approaches to study plant responses to stress. **BioMed Research International**, ID 654120, 2013. 10p.

PUCHOOA, D.; RAMBURN, R. A Study on the use of carrot juice in the tissue culture of *Daucus carota*. **African Journal of Biotechnology**, v.3, n.4, p.248-252, 2004.

QUIRÓS, A. R.; COSTA, H. S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 97-111, 2006.

QUISPE, J.; SALDAÑA, J; VERDE, T.; VALDERRAMA, S. Efectos del Sorbato de Potasio a diferentes concentraciones y tiempo de exposición sobre el ciclo celular y el material genético en meristemos radiculares de *Allium cepa* L. (cebolla). **Revista del Encuentro Científico Internacional**, v.7, n.1, p. 71-78, 2010.

RABBANI, A.R.C.; NUNES, F.B.S.; CARVALHO, S.V.A.; FERREIRA, R.A.; MANN, R.S. Condicionamento osmótico em sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.). **Revista Científica Udo Agrícola**, v.3, p.50-55, 2013.

RADI'C, S.; PROLIC', M.; PAVLICA, M.; PEVALEK-KOZLINA, B. Cytogenetic effects of osmotic stress on the root meristem cells of *Centaurea ragusina* L. **Environmental and Experimental Botany**, v. 54, p.213–218, 2005.

RAHNAMA, A.; JAMES, R.A.; POUSTINI, K.; MUNNS, R. Stomatal conductance as a screen for osmotic stress tolerance in durum wheat growing in saline soil. **Functional Plant Biology**, v.37, no. 3, pp. 255–263, 2010.

RÊGO JÚNIOR, N.O.; FERNANDEZ, L.G.; CASTRO, R.D. de; SILVA, L.C.; GUALBERTO, S.A.; PEREIRA, M.L.A.; SILVA, M.V. da. Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. **Brazilian Journal Food Technololy**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 50-57, 2011.

REYES, Y.; MARTINEZ, L.; ROSABAL, L.; MAZORRA, L.M.; PIETERS, A.; NÚÑEZ, M. Effect of 24-epibrassinolide on growth, proline and malondialdehyde levels in rice seedlings (*Oryza sativa L.*) under salt stress. **Cultivos Tropicales**, San José de Las Lajas, v.33, n.1, p.19-27, 2012.

RIBEIRO, M.R.; BARROS, M.F.C.; FREIRE, M.B.G.S. Química dos solos salinos e sódicos. In: MELO, V. F.; ALLEONI, L. R. F. (ed.). Química e mineralogia do solo. Parte II – Aplicações. Viçosa: **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. p. 449-484, 2009.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, London, v. 2, n. 4, p.152-159, 1997.

RODRIGUES, L.R.F. **Técnicas de cultivo hidropônico e de controle ambiental no manejo de pragas, doenças e nutrição vegetal em ambiente protegido**. Jaboticabal: FUNEP. 2002.762 p.

RODRIGUES, R.R.; BERTOSSI, A.P.A.; GARCIA, G. de O.; ALMEIDA, J.R. de; SILVA, E.A. da. Salinidade no desenvolvimento de cultivares de alface. **Agrarian Academy**, v.2, p.70-81, 2015.

ROZEMA, J.; FLOWERS, T. Ecology: crops for a salinized world. **Science**, v.322, n. 5907, p.1478–1480, 2008.

SANTANA, C.V. da S.; ALMEIDA, A.C. de; TURCO, S.H.N. Produção de alface roxa em ambientes sombreados na região do submédio São Francisco – BA. **Revista Verde**, Mossoró, v.4, n.3, p. 01-06, 2009.

SCHLEIFF, U.; MUSCOLO, A. Fresh look at plant salt tolerance as affected by dynamics at the soil/root-interface using Leek and Rape as model crops. **The European Journal of Plant Science and Biotechnology**, v.5, p.27-32, 2011.

SCHUPPLER, U.; HE P-H., JOHN, P.C.L.; MUNNS, R. Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle quinase activity in whet leaves. **Plant Physiology**, Reino Unido, n.117, p.667-678, 1998.

SECCO, L.B.; QUEIROZ, S.O.; DANTAS, B.F.; SOUZA, Y.A.; SILVA, P.P. Germinação de sementes de melão (*Cucumis melo L.*) em condições de estresse salino. **Revista Verde**, Mossoró, v.4, n.4, p.129–135, 2010.

SELENE, M.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; COSTA, S.M.O.; AGUIAR, L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.19, n.1B, p.315-320, 2009.

SEVERO, J.; TIECHER, A.; CHAVES, F.C.; SILVA, J.A.; ROMBALDI, C.V. Gene transcript accumulation associated with physiological and chemical changes during stages of strawberry cv. Camarosa. **Food Chemistry**, Reino Unido, v.126, p.995-1000, 2010.

SHANNON, M.C.; GRIEVE, CM. Tolerance of vegetable crops to salinity. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.78, p. 5-38, 1999.

SHIMOTOHNO, A.; MATSUBAYASHI, S.; YAMAGUCHI, M.; UCHIMYA, H.; UMEDA. Differential phosphorylation activities of CDK – activating Kinases in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 534, p.69-74, 2003.

SIKORA, E.; CIESLIK, E.; LESZCZYNSKA, T.; FILIPIAKFLORKIWUACZ, A.; PISULEWSKI, P. M. The antioxidant activity of 134 selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**, London, v. 107, p. 50-55, 2008.

SILVA, R.T. da; OLIVEIRA, F. de A. de; SOUZA NETA, M.L. de; SOUZA, A.A.T.; OLIVEIRA, M.K.T. de; MEDEIROS, R. de C.A.; PAIVA, E.P. de. Índice de clorofila na cultura da rúcula submetida diferentes salinidades na solução nutritiva. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, Campina Grande, v.8, n.3, p90-94, 2012.

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 salinas em sistema hidropônico. **Irriga**, Botucatu, v.12, n.3, p.235-248, 2007.

SOLANO, J.D.; SOARES, J.A.G.; BORGES, N.M.; ARAÚJO, D.S. DE; KARSBURG, I.V. Avaliação do efeito mutagênico da solução aquosa de *Hymenea coubaril* L. com uso dos biotestes *Allium cepa* e *Lactuca sativa*. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.11 n.21; p. 314-323, 2015.

SOUZA CMM, SILVA HR, VIEIRA GM, AYRES MCC, COSTA CS, ARAÚJO DS. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA, S.A.M., STEIN, V.C., CATTELAN, L.V., BOBROWSKI, V.L., ROCHA, B.H.G. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação de efeitos citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revistas de Biologia e Ciências da Terra**, São Cristóvão, v.5, n.1, 2005.

SULTANA, N.; KEDA, T.; KASHEM, M. A. Effect of seawater on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. **Photosynthetica**, Czech Republic, v.40, p.115-119, 2002.

TABUR, S.; DEMIR, K. Cytogenetic response of 24-epibrassinolide on the root meristem cells of barley seeds under salinity. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, n.58, p. 119–123, 2009.

TABUR, S.; DEMIR, K. Role of some growth regulators on cytogenetic activity of barley under salt stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.60, p.99–104, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TAS, G.; PAPADANDONAKIS, N.; SAWAS, D. Responses of lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *longifolia*) grown in a closed hydroponic system to NaCl^- or CaCl_2^- salinity. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Quedlinburg, v.79, p.136-140, 2005.

TEDESCO, M.; KUHN, A. W.; AGUIAR, A. R.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S.B. Potencial antiproliferativo de extratos aquosos de *Mentha pulegium* L. pelo teste de *Allium cepa* L. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.8, n.15; p. 1913, 2012.

TEERARAK, M.; BHINIJA, K.; THITAVASANTA, S.; LAOSINWATTANA, C. The impact of sodium chloride on root growth, cell division, and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in root tip cells of *Allium cepa* L. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.121, n.2, p.228-232, 2009.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. **Annals of Botany**, Oxford, v.91, p.503-527, 2003.

TIVERON, A.P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

UNLUKARA, A.; CEMEK, B.; KARAMAN, S.; ERSAHIN, S. Response of lettuce (*Lactuca sativa* var. *crispa*) to salinity of irrigation water. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, New Zealand, v.36, p.265-273, 2008.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor de sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164 p.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. **Plant Science**, Limerick, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

WILLADINO, L.; CAMARA, T.R. Tolerância das plantas à salinidade: Aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.6, n.11; 2010.

ZAHIR, M.; FARRUKH, H. Effect of NaCl salinity on the germination and seedling growth of seven wheat genotypes. **Pakistan Journal of Botany**, Pakistan, v.44, n.6, p.1845-1850, 2012.

ZAPATA, J.P.; SERRANO, M.; PRETEL, M.T.; AMOROS, A.M. Changes in ethylene evolution and polyamines profiles of seedlings of nine cultivars of lettuce in response to salt stress during germination. **Plant Science**, New York, v.164, p.557–563, 2003.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.53, p.247-273, 2002.

ZIA, S.; KHAN, M.A. Comparative effect of NaCl and seawater on seed germination of *Limonium stocksii*. **Pakistan Journal of Botany**, Pakistan, v.34, p. 345-350, 2002.

APÊNDICES

Tabela 1: Valores de p (<0.05%) das variáveis germinação (G), primeira contagem da germinação (PCG), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR) e massa seca total (MS) do experimento I, capítulo 1.

	G	PCG	CPA	CR	MS
Alface	0.050	0.030	7.21E-05	0.018	0.025
Sal	6.50E-10	0	8.47E-06	2.11E-15	0.062
Alface*Sal	0.001	0.240	0.955	0.857	0.121

Tabela 2: Valores de p (<0.05%) das variáveis emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), área foliar 1 (AF1) e área foliar 2 (AF2) do experimento II, capítulo 1.

	E	IVE	AF1	AF2
Alface	0.1470	3.71E-07	0	0
Sal	0.0511	0	0	0
Alface*Sal	0.0731	3.78E-10	7.94E-06	7.21E-08

Tabela 3: Valores de p (<0.05%) das variáveis comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), volume da raiz (VR) e massa seca raiz (MR) do experimento II, capítulo 1.

	CPA	MFPA	MSPA	VR	MSR
Alface	0	0	0	0	0
Sal	0	0	3.23E-10	0	1.83E-10
Alface*Sal	2.94E-07	0	1.34E-05	1.92E-07	5.21E-06

Tabela 4: Valores de p (<0.05%) das variáveis índice mitótico (IM) e índice de aberrações cromossômicas (IAC).

	IM	IAC
Alface	0.6012	0.1038
Sal	9.60E-08	0.2272
Alface*Sal	0.6148	0.7830

Tabela 5: Valores de p (<0.05%) das variáveis índice de clorofila (IC), índice de flavonoides (IF), índice de antocianinas (IA) e índice de nitrogênio (IN).

	IC	IF	IA	IN
Alface	2.84E-07	0	0	0
Sal	7.17E-05	0.0010	7.17E-05	0.2806
Alface*Sal	2.86E-04	0.0197	9.06E-03	1.01E-04

Tabela 6: Valores de p (<0.05%) das variáveis teor de sódio (Na) e potencial osmótico (Ψ_s).

	Na	Ψ_s
Alface	5.23E-09	7.92E-005
Sal	0	2.97E-006
Alface*Sal	2.23E-05	0.0006

Tabela 7: Valores de p (<0.05%) das variáveis peroxidação lipídica (PL), peróxido de hidrogênio (PH), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) da parte aérea de plântulas de alface.

	PL	PH	SOD	APX	CAT
Alface	0.7564	5.02E-06	0.0019	0.3986	0.0631
Sal	0.9686	0.0018	0.0023	0.7562	6.57E-10
Alface*Sal	0.99	0.0065	0.6768	0.5592	1.96E-01

Tabela 8: Valores de p (<0.05%) das variáveis peroxidação lipídica (PL), peróxido de hidrogênio (PH), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) da raiz de plântulas de alface.

	PL	PH	SOD	APX	CAT
Alface	0.0877	0.0047	4.72E-10	0.0094	0.0001
Sal	0.6952	0.0388	2.18E-06	1.08E-05	0.0018
Alface*Sal	0.6566	0.8475	7.81E-08	0.0111	0.0201



Figura 23: Preparação dos extratos.



Figura 24: Avaliação da atividade citogenética.

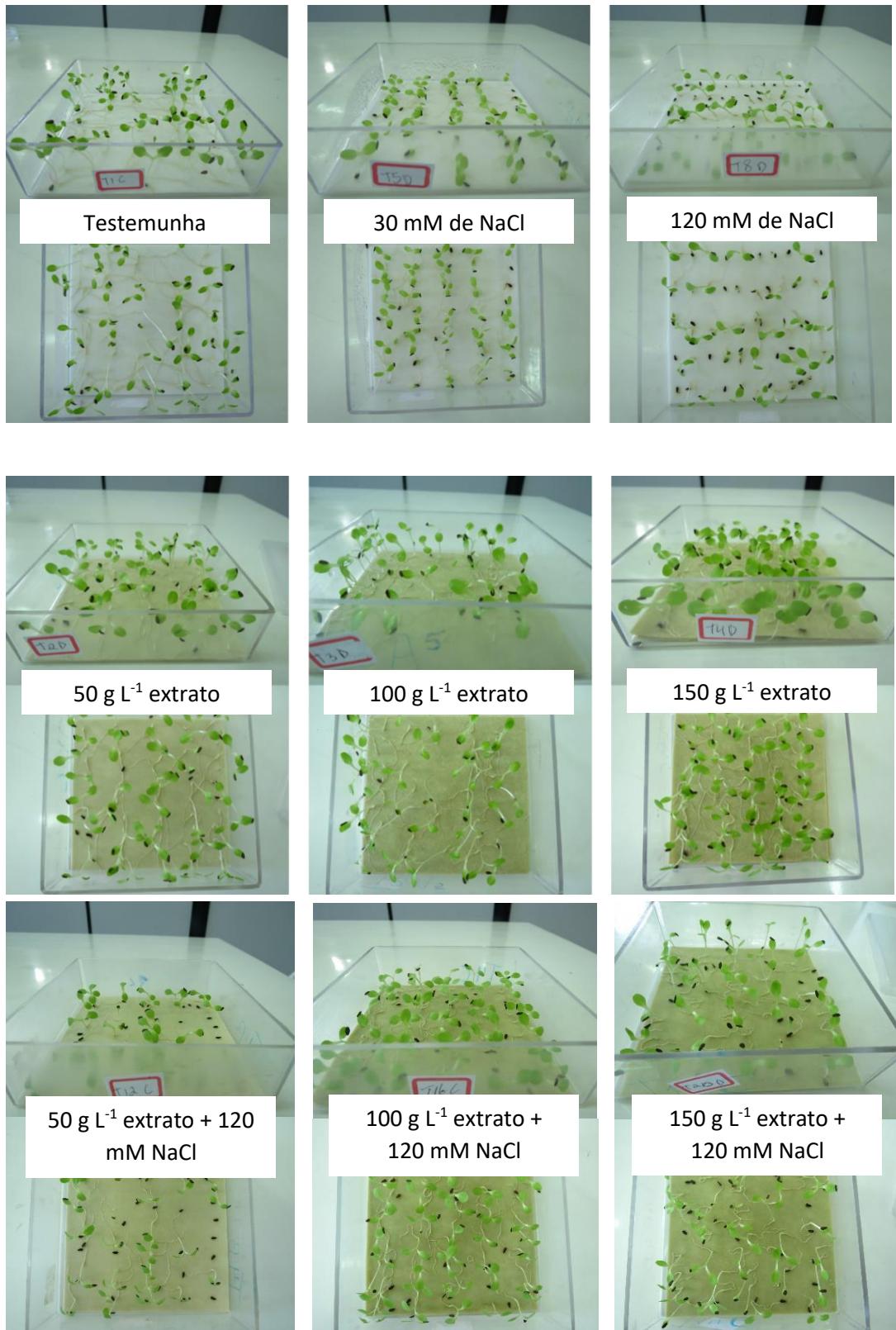


Figura 25: Germinação de sementes de alface, cv. Regina, em papel umedecido com diferentes concentrações de extrato de alface roxa e NaCl, de forma isolada e na combinação dos dois fatores.

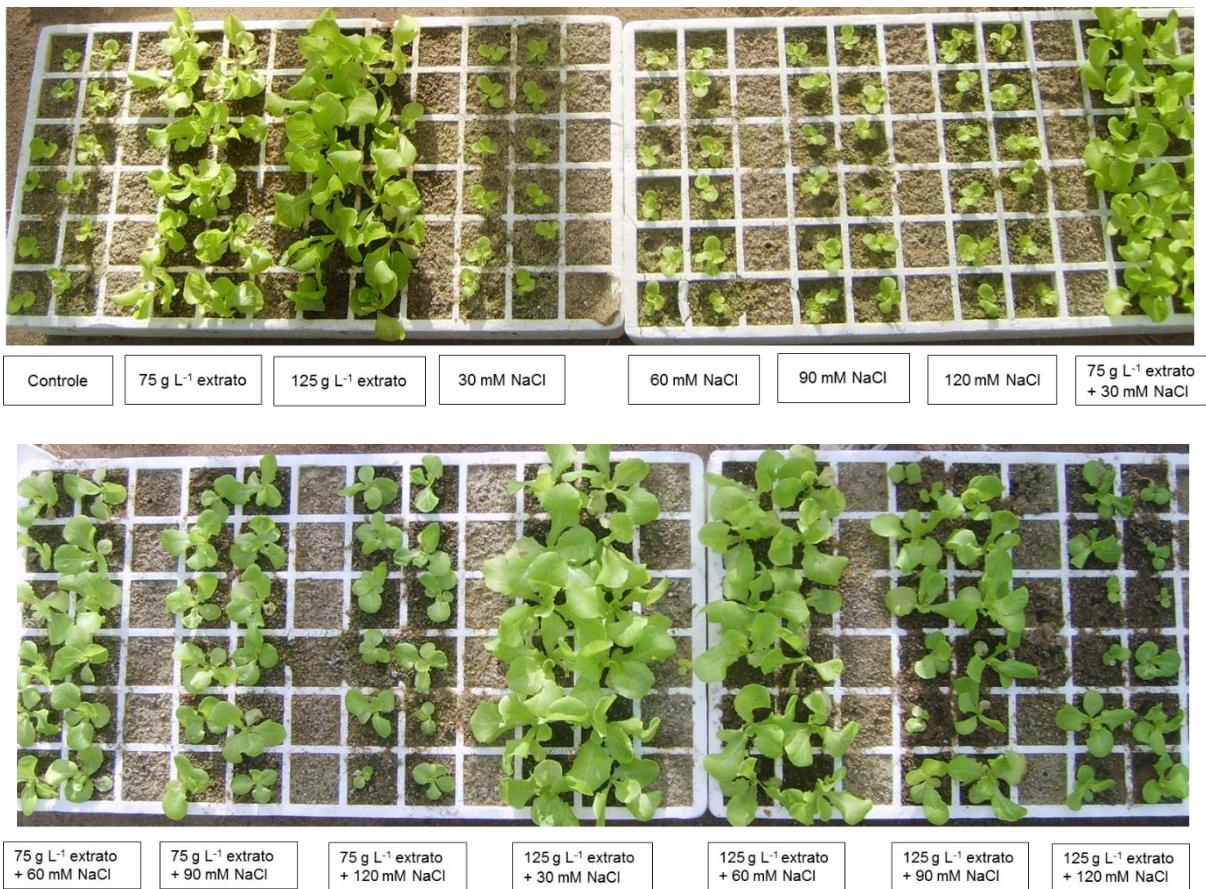


Figura 26: Desenvolvimento de plântulas de alface (24 dias após a semeadura), cv. Regina, cultivadas sob diferentes concentrações de extrato de alface roxa e NaCl, de forma isolada e na combinação dos dois fatores.



Figura 27: Desenvolvimento das plântulas de alface aos 24 dias após a semeadura.