



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



UFMG

ANA CLÁUDIA DIAS RODRIGUES DA SILVA

**PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS EM *Solanum lycopersicum* EM
RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de Concentração Fisiologia Vegetal

BELO HORIZONTE – MG

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



ANA CLÁUDIA DIAS RODRIGUES DA SILVA

**PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS *EM Solanum lycopersicum* EM
RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO**

Versão final da dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de Concentração Fisiologia Vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Valentina Modolo

Coorientadora: Cristiane Jovelina da Silva

Universidade Federal de Minas Gerais

BELO HORIZONTE – MG

2019

043 Silva, Ana Cláudia Dias Rodrigues da.
Produção de moléculas sinalizadoras em *Solanum lycopersicum* em resposta ao estresse salino [manuscrito] / Ana Cláudia Dias Rodrigues da Silva. – 2019. 57 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Luzia Valentina Modolo. Co-orientadora: Cristiane Jovelina da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

1. Fisiologia vegetal. 2. Monóxido de Carbono. 3. Heme Oxigenase-1. 4. Estresse Salino. 5. Sulfeto de Hidrogênio. 6. Óxido Nítrico. 7. Estresse Oxidativo. I. Modolo, Luzia Valentina. II. Silva, Cristiane Jovelina da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 581



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - MESTRADO
(Defesa MS nº 170)
Ana Cláudia Dias Rodrigues da Silva

Data: 31/05/2019
Entrada: 2017/1

Mat.: 2017661486
CPF: 10789005662

Às nove horas do dia trinta e um de maio de dois mil e dezenove, reuniu-se na sala de seminários do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora de Dissertação indicada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Produção de moléculas sinalizadoras em *Solanum Lycopersicum* em resposta ao estresse salino", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal e Ecologia, pela aluna Ana Cláudia Dias Rodrigues da Silva. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, professora Dra. Luzia Valentina Modolo, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Membro da Comissão Examinadora	Instituição	Resultado
Dra. Luzia Valentina Modolo (orientadora)	Universidade Federal de Minas Gerais	APROVADA
Dra. Juliana da Silva Martins Pimentel	Faculdade Pitágoras - Belo Horizonte	APROVADA
Dr. José Pires de Lemos Filho	Universidade Federal de Minas Gerais	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou-se presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 31 de maio de 2019.

Dra. Luzia Valentina Modolo (UFMG)	
Dra. Juliana da Silva Martins Pimentel (Faculdade Pitágoras)	
Dr. José Pires de Lemos Filho (UFMG)	

“Olhemos para cada detalhe, mínimo que seja, como para uma folha, e veremos que sua perfeição e harmonia são deslumbrantes. Creio que a folha resulta do processo de seleção natural, indicado por Darwin, ao longo de quase bilhões de anos de evolução da vida na Terra. Se olhamos essa mesma folha através de um microscópio, ficamos ainda mais maravilhados. Se alguém quer chamar esse sentimento de religioso, isso não me incomoda.”

Carl Sagan

Agradecimentos

Em tempos de “balbúrdia”, só mesmo com muita ajuda eu poderia concluir esta dissertação. Agradeço profundamente a todos os colaboradores diretos ou indiretos.

Obrigada, minha mãe amada, Vanilda Aparecida Pereira, por ser minha primeira morada, pelos cuidados, pelo amor incondicional. Por ser a sólida base na qual construí meu caráter. Por ser a primeira Mestre de casa, pelo exemplo positivo de profissional.

Agradeço ao André Carvalho por ser luz quando eu não via, pelos conselhos, por me ajudar a exercer minha liberdade, por me ajudar a carregar tanto peso (literal e metaforicamente) e pelos cuidados na escrita dessa dissertação.

Ao Dalvit Greiner por estar sempre próximo e preocupado com meu bem-estar. Por ser exemplo de profissional e por cuidar bem de quem eu amo.

Ao meu pai, Antônio Carlos Rodrigues da Silva, por todo o carinho e disponibilidade de sempre (e por esse sobrenome gigante!).

À Luzia Valentina Modolo, por ser um grande exemplo. Agradeço toda disponibilidade, finais de semana de trabalho na bancada e fora dela, por ter dividido o tempo do Kevin comigo. Agradeço imensamente pela orientação. Muito obrigada por todo o carinho, toda delicadeza, toda preocupação.

Agradeço também ao Kevin por ter me cedido um pouco do tempo e da presença de sua mãe, especialmente aos finais de semana.

À minha querida Co-orientadora, Cristiane Jovelina da Silva, pela disponibilidade, preocupação, conselhos, por todo o conhecimento compartilhado e por seu caderno de laboratório, que se tornou meu livro sagrado!

Aos membros titulares e suplente da minha banca de defesa de dissertação (Dra. Juliana Martins Pimenta, Dr. José Pires de Lemos Filho e Dr. Fernando Henrique Aguiar Vale) pelas importantíssimas contribuições e pela atenção dedicada.

Aos meus queridos colegas de Laboratório e aos membros do Grupo de Estudos em Bioquímica de Plantas (GEBioPlan), que foram essenciais para a realização desse trabalho. Aos meus amigos, companheiros de todas as horas (inclusive dos finais de semana), eu agradeço imensamente. Um abraço especial para meus amigos Samuel, Thamara e Carol. Muito obrigada!

Aos professores do Departamento de Botânica da UFMG pela disponibilidade em dividir um pouquinho de seus saberes. Agradeço, de maneira especial, aos professores Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira e Dr. Élder Antônio Sousa e Paiva pela imensa dedicação ao ensino e pela disponibilidade. À Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias pelos equipamentos cedidos e indispensáveis à realização desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Ângelo de Fátima (Departamento de Química – UFMG) e seu grupo de pesquisa, em especial Breno e Panta pela ajuda inestimável.

Ao Prof. Dr. Lázaro Peres (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP) pela doação das sementes utilizadas nesta pesquisa.

Às secretárias Denise e Isabela pela inestimável ajuda e por terem colorido as burocracias inevitáveis. Agradeço também aos técnicos Socorro e Wagner Rocha por toda presteza e atenção que me foram dedicadas.

Às minhas amigas desde o início do mestrado, meus braços direitos, meus pilares, minhas companhias, pessoas que expandiram minha maneira de pensar e fazer pesquisa, Sarita e Débora. Vocês foram essenciais!

Aos colegas de departamento por todos os encontros, em especial Jana Garcia e Dani Pianetti. Ao pessoal do Laboratório de Anatomia pela imensa ajuda.

Aos meus amigos de graduação, pela ajuda e companheirismo há mais de uma década: Amanda, Rayan, André, Carlitos, Alan, Luciana, Luís, Camila Lucas, Vinícius.

À minha amada Pereira Family por todo o apoio e compreensão nas minhas ausências. Em especial ao meu primo, Brunno, companheiro de aventuras na UFMG e consultor eventual na área de solos.

Aos meus queridos sogros, Gilda e Francisco Lino, pela dedicação, pelas palavras de apoio, pelas comidinhas, pelo acolhimento.

À minha família de alma, amigas de toda uma vida, aquelas que me acompanham desde o início de minha vida escolar: Lorena Calonge, Ana Flávia Campos, Anna Karoline Silva Dias. E um agradecimento especial à minha sobrinha Lara, que veste com muito orgulho seu pequeno jaleco! À Marjorie pelo apoio, mesmo que distante.

Aos amigos que conquistei ao longo da vida. Em especial, Caju, Lorraine e Armando. À Lelê, querida, pela preocupação à distância e por dar à luz ao acreano mais lindo do mundo, o Huguinho.

Aos meus mestres, professores dos meus tempos de escola, que me instigaram a sempre querer evoluir intelectualmente: Júnia Cardoso, Derly, Márcia e Mary.

Aos conselhos científicos e filosóficos de Carl Sagan e Jane Goodall. Alexandra Elbakyan pela socialização de dados tão preciosos da e para a humanidade.

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Departamento de Botânica e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal por todo o apoio e pela oportunidade de realizar minhas pesquisas desde os tempos de graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e às agências Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por toda ajuda financeira. Que elas possam ainda ajudar muitos outros que, como eu, dependem dessa ajuda para concluir um sonho profissional. Que sobrevivam!

Sumário

Lista de Figuras e Tabelas	v
Resumo	vii
Abstract	viii
1. Introdução.....	1
1.1. Gasotransmissores	2
1.2. Heme oxigenase em plantas	7
1.3. Resposta de plantas ao estresse salino.....	10
1.4. Interação entre NO, CO e H ₂ S.....	11
2. Objetivo	14
2.1. Objetivos Específicos	15
3. Materiais e Métodos	15
3.1. Material Vegetal	15
3.2. Germinação e cultivo das plantas	16
3.3. Imposição do estresse e coleta do material vegetal	17
3.4. Caracterização dos genótipos	18
3.5. Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidante.....	19
3.6. Determinação da atividade HO	20
3.7. Acúmulo de NO e H ₂ S em resposta a um doador de CO	21
3.8. Acúmulo de NO, CO e H ₂ S em função do tempo	22
3.9. Análises estatísticas	23
4. Resultados.....	23
4.1. Teor de pigmentos fotossintéticos	23
4.2. Determinação de conteúdo hídrico	24
4.3. Atividade antioxidante em plantas submetidas a estresse salino.....	25
4.4. Atividade de HO em plantas submetidas a estresse salino.....	29
4.5. Produção de H ₂ S e NO em plantas submetidas simultaneamente a estresse salino um doador de CO	31
4.6. Detecção <i>in situ</i> e conteúdo de NO, H ₂ S e CO em raízes de tomateiros	32
5. Discussão.....	38
6. Conclusão.....	45
7. Referências Bibliográficas.....	46

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1	Fenótipo de dois genótipos de <i>Solanum lycopersicum</i>	10
Figura 2	Possíveis padrões regulatórios dos gases sinalizadores e seu <i>cross-talk</i> no metabolismo de prolina em plantas sob estresse abiótico.....	14
Figura 3	Estufa não climatizada.....	16
Figura 4	Plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> submetidas a concentrações crescentes de NaCl por hidroponia.....	17
Figura 5	Quantidade de clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> e carotenoides em folhas de tomateiros dos genótipos MT e MT-yg2, com 30 dias de idade.....	24
Figura 6	Conteúdo hídrico em genótipos de tomateiro.....	25
Figura 7	Plantas de tomateiro do genótipo MT yg-2 com 32 dias de idade sob tratamento controle (A) ou NaCl 150 mM (B).....	30
Figura 8	Efeito de doador de CO nos níveis de NO e H ₂ S em dois genótipos de <i>Solanum lycopersicum</i> sob estresse salino.....	34
Figura 9	Produção de NO, CO e H ₂ S em dois genótipos de tomateiro (MT e MT yg-2) sob estresse salino.....	35
Figura10	Imagens representativas do acúmulo de NO em raízes de plantas de tomateiro em função da duração do estresse salino.....	36
Figura11	Imagens representativas do acúmulo de CO em raízes de plantas de tomateiro em função da duração do estresse salino.....	37
Figura12	Imagens representativas do acúmulo de H ₂ S em raízes de plantas de tomateiro em função da duração do estresse salino.....	37

Tabela 1	Atividade de enzimas do sistema antioxidante em dois genótipos de <i>Solanum lycopersicum</i> (MT e MT yg-2) tratados com concentrações crescentes de NaCl por 48 h.....	29
Tabela 2	Atividade da enzima heme oxigenase em dois genótipos de <i>Solanum lycopersicon</i> (MT e MT yg-2) tratados com concentrações crescentes de NaCl por 48 h em plantas com 30 dias de vida.....	34

Resumo

A elevada salinidade dos solos reduz a produtividade e afeta o valor nutritivo de muitas plantas de interesse agrícola. A compreensão da resposta bioquímica de plantas ao estresse salino é importante para a produção de tecnologias que aumentem a tolerância de vegetais às condições desfavoráveis e para o estabelecimento de hábitos que reduzam as perdas na produtividade e qualidade nutricional das plantas. Este trabalho investigou a influência do estresse salino na produção de moléculas sinalizadoras nos genótipos MT e MT *yg-2* de tomateiro (*Solanum lycopersicum*). As diferenças fenotípicas entre esses genótipos foram comprovadas pelo conteúdo reduzido de água e de clorofilas em MT *yg-2*, defectivo em heme oxidase 1 (HO-1). Estresse salino por 48 h resultou no aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) numa maneira dependente da concentração de NaCl. Supreendentemente, o genótipo MT *yg-2*, apresentou maior atividade HO em folhas do que o parental MT sugerindo que outras isoformas de HO estejam sendo estimuladas pelo estresse imposto. Da mesma maneira, o tratamento com NaCl 100 mM induziu mais rapidamente um aumento da produção de CO em MT *yg-2* do que no parental MT. CO exógeno, liberado a partir de CORM-2, induziu a produção de NO e H₂S em raízes e folhas de MT e apenas de NO em raízes do genótipo *yg-2*. De maneira geral, a resposta diferenciada do genótipo MT *yg-2* ao CO pode explicar, em parte, a maior sensibilidade dessas plantas ao estresse salino.

Palavras-chave: monóxido de carbono, heme-oxigenase, estresse salino, sulfeto de hidrogênio, óxido nítrico, estresse oxidativo.

Abstract

Soil salinization is one of the factors that most decrease plant nutritional value and crop productivity. A better understanding of the biochemical mechanisms that drive plant tolerance to high salinity is valuable for the development of technologies to overcome the negative impact of this abiotic stress on agriculture. This work focuses on the extent of production of signaling molecules in *Solanum lycopersicum* cv. MT and MT *yg-2* during the response to salt stress. The lower water and chlorophyll contents found in MT *yg-2* plants confirm its phenotype as such genotype is defective for the biosynthesis of heme oxidase 1 (HO-1), involved in phytochrome production. NaCl treatment for 48 h induced the activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD) in a salt concentration manner. Strikingly, the HO activity in MT *yg-2* leaves were higher than that of its parental MT, suggesting that HO isoforms other than HO-1 are being stimulated during the abiotic stress. Additionally, 100 mM NaCl fastly induced CO accumulation in MT *yg-2* plants when compared to the MT ones. Exogenous CO provided as CORM-2 induced the production of NO and H₂S in roots and leaves of MT plants while only NO accumulation was recorded in *yg-2* upon CORM-2 treatment. Overall, the differential response of MT *yg-2* to CO regarding the stimulation of NO and H₂S production during stress may partly explain the higher sensitiveness of MT *yg-2* to high salinity than that of MT plants.

Keywords: carbon monoxide, heme oxygenase, saline stress, hydrogen sulfide, nitric oxide, oxidative stress.

1. Introdução

O vertiginoso crescimento da população mundial tem despontado a demanda para o aumento da produção alimentar (Godfray et al., 2010), objetivo que ainda precisa superar as consequências cada vez mais intensas das mudanças climáticas, como secas prolongadas e aquecimento global (IPCC, 2018). Neste cenário, o setor agrícola se utiliza de irrigação como uma das técnicas para expansão da produtividade. Este procedimento, no entanto, é a principal causa de origem antrópica para o aumento da salinidade dos solos a médio e longo prazo (Ivushkin et al., 2018). Solos de zonas áridas e semiáridas são especialmente afetados, uma vez que a irrigação do solo pode promover o deslocamento de sais de camadas mais profundas para a superfície do solo (Rozema e Flowers, 2008). Além do mais, a própria água utilizada na irrigação e práticas de adubação podem carregar o solo com sais que elevam sua salinidade e sodicidade (Abbas et al., 2013).

Um solo salino é caracterizado por apresentar quantidade de sal suficiente para afetar o crescimento da maior parte de espécies cultiváveis, com um limite mínimo de condutividade elétrica do extrato de saturação de 4 dS m^{-1} a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, em alguma época do ano. (Santos et al., 2018). Estimativas de 2013 sugerem a ocorrência global de pelo menos 800 milhões de hectares de terras salinizadas (Abbas et al., 2013). No Brasil, esse problema é pouco explorado em estudos, mas sabe-se que a salinização pode atingir de 25 a 30% de solos cultivados com irrigação somente na região nordeste do país (Heinze, 2002).

A salinidade é um importante fator limitante para o crescimento de plantas e o aumento da quantidade de sais no solo pode restringir a produtividade e a qualidade das colheitas (Squires e Glenn, 2011). A cada ano, é registrada queda de 1% na produtividade nacional de culturas de tomates (Saito e Matsukura, 2015), tendo em vista

que essa espécie seja moderadamente sensível à elevada salinidade do solo (Katerji et al., 2004).

Plantas que crescem em solos salinizados sofrem com efeitos osmóticos a curto prazo e, em fase mais avançada do crescimento, apresentam sintomas de toxicidade (Wang et al. 2015). Dessa maneira, o conhecimento sobre a resposta bioquímica das plantas à elevada salinidade é de grande importância para propor tecnologias que produzam plantas mais tolerantes a esse estresse e para criação de hábitos que reduzam as perdas na produtividade e na qualidade nutricional das plantas agrícolas.

Alterações na expressão e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e heme oxigenase (HO) (Zilli et. al, 2009; da-Silva et. al, 2017) estão entre os mecanismos que as plantas utilizam a fim de melhor tolerar os estresses ambientais. O sistema antioxidante da planta controla o acúmulo e ações deletérias de espécies reativas de oxigênio (ROS). Outro importante mecanismo é a sinalização celular para controle do estresse oxidativo (Munns e Tester, 2008; Yadav et al., 2011). Monóxido de carbono (CO), óxido nítrico (NO) e sulfeto de hidrogênio (H₂S) são exemplos de sinalizadores gasosos que, além de participarem de processos fisiológicos, aumentam a tolerância de plantas a estresses bióticos e abióticos (Lamattina e García-Mata, 2016).

1.1. Gasotransmissores

Gasotransmissores são moléculas gasosas sinalizadoras produzidas endogenamente, que apresentam composição molecular e estrutural muito simples, cuja produção não envolve processos químicos extremamente complicados e que necessitam de muitos substratos (Jin et al., 2013). Por causa destas características, esses gasotransmissores

podem se movimentar nos espaços intra e intercelulares com facilidade e rapidamente, o que é importante uma vez que seus tempos de meia-vida são curtos. A facilidade de removê-los permite que as vias de sinalização das quais os gases fazem parte sejam desligadas prontamente sem elevado gasto energético (Lamattina e García-Mata, 2016). Já suas capacidades de dispersão e permeação em membrana sem necessidade de transportador específico permitem que estejam presentes em todos os órgãos, células e em muitas organelas em concentrações suficientes para desencadear processos de sinalização celular, já que, até em concentração relativamente baixa, seus efeitos moleculares e celulares são bastante notáveis (Wang, 2014).

As pesquisas que inicialmente investigaram a existência de NO em plantas levaram em consideração as descobertas realizadas em animais. O NO, espécie reativa de nitrogênio (RNS), foi inicialmente descrito em mamíferos como um importante mensageiro dos sistemas cardiovascular, nervoso e imune, exercendo um papel regulatório, de sinalização e de proteção das células (Ignarro, 1990 e Anbar, 1995).

Em mamíferos, foram descritas três isoformas de enzimas sintetizadoras de óxido nítrico (Óxido Nítrico Sintases; NOS). Ainda que nenhum gene que codifica NOS ou proteína similar à de mamíferos tenham sido encontrados em vegetais, o NO pode ser produzido por vias enzimática e não-enzimática. A presença de ácido ascórbico (AsA) ou outro agente redutor pode converter nitrato e nitrito a NO (Omar et al., 2016). Essa reação só ocorre nas condições ácidas encontradas em tecidos e compartimentos celulares, pois requer a forma ácida não dissociada de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). (Weitzberg & Lundberg, 1998). Também foi reportada a produção de NO dependente de luz, auxiliada por carotenoides a partir de dióxido de nitrogênio (Klepper, 1990; Cooney et al., 1994). Os mecanismos de produção enzimática de NO envolvem reações

de oxirredução. A enzima nitrato redutase (NR) catalisa a redução de NO_3^- a NO_2^- em uma ampla faixa de pH (Dean & Harper, 1988). A enzima plasmática ligada à membrana nitrito:NO-redutase (NI-NOR) consegue reduzir NO_2^- para formação de NO (Stöhr et al., 2001). A participação de citocromo P450 monoxigenases, também foi reportada. Há ainda a atuação de um sistema de proteínas mitocondriais - xantina oxidorreductase (XOR) - na produção de NO, junto de outras vias enzimáticas (Urarte et al., 2014).

Dentre as funções já atribuídas ao NO em plantas estão a influência desta RNS na resposta de sementes e de plantas ao estresse salino (Hayat et al., 2012; Mostofa et al. 2015; da-Silva et al., 2017), controle dos níveis celulares das ROS (Keyster et al., 2012; Ahmad et al., 2016); e osmoproteção (Wu et al., 2011; Tian et al., 2015; Hasanuzzaman et al., 2018)

O gasotransmissor descoberto mais recentemente em plantas, H_2S , é uma espécie reativa de enxofre (RSS) lipofílica que atravessa membranas sem a necessidade de um transportador (Zhang et al., 2008). Em animais o H_2S foi reconhecido como o terceiro gasotransmissor apenas em 2002 (Wang, 2002), mas a primeira evidência do papel fisiológico do gás sulfídrico foi obtido no final da década de 1980 em estudos que mediram os níveis de H_2S em cérebros de ratos e humanos após a morte (Goodwin et al., 1989; Warenycia et al., 1989). Em animais, o gás apresenta o papel de mensageiro celular para terminar estados de hibernação (Blackstone et al., 2005), inibir a sinalização da insulina (Yang et al., 2005), apoptose de células endoteliais (Yang et al., 2004) e regular o diâmetro de vasos sanguíneos e o processo inflamatório (Szabó, 2007; Li e Moore, 2008).

Já em plantas, apesar de o H₂S ter sido considerado um gás fitotóxico (Buwalda et al., 1990), seu papel no alívio do estresse induzido por cobre e estímulo à germinação de sementes de trigo foi reportado (Zhang et al., 2008). Hoje há conhecimento sobre seu papel como sinalizador no movimento estomático (Jin et al., 2011 e 2013; Deng et al., 2016), organogênese de raiz (Jin et al., 2011), acúmulo de osmólitos (Shi et al., 2015) e ativação do sistema antioxidante para controle de ROS em diversos tipos de estresse abiótico (Christou et al., 2014; Shan et al., 2014; Zhu et al., 2014; Luo et al., 2015; da-Silva et al., 2017; 2018).

Quatro vias de biossíntese do gás sulfídrico são descritas em vegetais. A L-DES é uma enzima citoplasmática que converte L-cisteína em piruvato liberando H₂S e NH₄⁺ (Li, 2015) usando fosfato piridoxal como cofator (Calderwood e Kopriva, 2014). Por sua vez, o enantiômero D-DES metaboliza D-cisteína para produção de H₂S (Riemenschneider et al., 2005). Outra enzima que participa na produção de H₂S é a β-cianoalanina sintase (CAS), que catalisa uma reação reversível entre H₂S e L-cisteína e CN⁻ na presença de piruvato. Assim, CAS participa também no controle de H₂S. Cisteína sintase (CS), uma enzima presente no citosol, mitocôndria e cloroplastos, está relacionada ao controle de H₂S através da condensação de L-cisteína com acetato, liberando a *O*-acetil-L-serina e H₂S (Li, 2015; Wirtz e Hell, 2006). Por fim, sulfito redutase (SiR) é uma enzima cloroplastídica redutora de SO₃²⁻ com formação de H₂S e H₂O usando ferredoxina como doador de elétron (Nakayama et al., 2000).

O gás CO possui efeitos tóxicos conhecidos desde a Antiguidade na Grécia e Roma, em que este composto era utilizado na execução de prisioneiros (Lascaratou e Marketos, 1998). Além disso, CO é um dos maiores poluidores atmosféricos em todo o mundo (Weaver, 2009). Apesar dos efeitos citotóxicos, o CO também é produzido no

metabolismo homeostático de organismos (Coburn et al., 1963; Conrad e Seiler, 1980). Seu mecanismo de ação se baseia na competição com O₂ pelos sítios ativos da hemoglobina, resultando em asfixia. Outras proteínas que contêm o grupo heme, como citocromo-*c* oxidase, citocromo P450 e triptofano dioxigenase também são alvos desse gás (Dulak e Józkwicz, 2003; Boczkowski et al., 2006). De maneira geral, o CO tem afinidade por metaloproteínas e, por ser uma molécula bastante estável e com tempo de vida maior do que a maioria dos gases, exerce importante papel na sinalização intracelular nos seres vivos (Tichá et al., 2016). Seu papel como sinalizador endógeno em animais foi sugerido apenas em 1991 por Furchgott e Jothianandan, a partir da descoberta dos múltiplos efeitos fisiológicos do NO, notável vasodilatador em mamíferos. Os primeiros indícios de que as células vegetais produzem CO foram demonstrados por Wilks (1959), que descobriu o CO como subproduto do metabolismo de oxidação. A partir da aplicação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou ácido ascórbico, ficou provado que as pontes de metileno podem ser quebradas e CO liberado endogenamente (Dulak e Józkwicz, 2003). Além desta via não enzimática, considera-se que a maior parte do CO produzida em células de mamíferos e plantas seja devido à atividade de heme oxigenases (HO) (Xuan et al., 2008). Por outro lado, em soja a produção de CO não apresentou como fonte principal as reações catalisadas por heme oxigenases (Zilli et al., 2014). Os resultados sugeriram outras fontes de produção de CO, como peroxidação de lipídios e metabolismo de ureídeos (Zilli et al., 2014). No corpo humano, outras vias de produção de CO foram sugeridas através de vias metabólicas também presentes em plantas, como foto-oxidação e quebra de pontes de heme metileno através da suplementação externa com H₂O₂ ou ácido ascórbico (Dulak and Józkwicz, 2003).

1.2. Heme oxigenase em plantas

A enzima HO foi inicialmente descrita em fígado de ratos (Tenhunen et al., 1968). Na década de 1970, Troxler e colaboradores (1973) especularam a existência de uma enzima em plantas com ação semelhante à HO de mamíferos, mas apenas no final da década de 1990 houve a demonstração de que vegetais também produzem essa enzima (Davis et al., 1999). Em plantas foram identificadas quatro componentes da família das heme oxigenases divididas em duas subfamílias. A menor delas é a subfamília *HO2-like* cuja única integrante é a HO-2 e não apresenta a capacidade de agir sobre o grupamento heme. A maior subfamília é *HO1-like*, composta por HO-1, HO-3 e HO-4 e todas as enzimas apresentam a capacidade de converter heme em biliverdina (BV) com concomitante liberação de CO e Fe^{2+} (Shekhawat e Verma, 2010). A HO-1 de vegetais não apresenta homologia com a sequência primária de aminoácidos das enzimas de animais e bactérias, mas possui estrutura terciária bem preservada entre esses clados (Linley et al., 2006). O número de isoformas varia entre os grupos, mas é possível encontrar pelo menos dois tipos nos organismos supramencionados: uma induzível (HO-1) e outra constitutiva (HO-2). Foram reconhecidas duas isoformas em *Arabidopsis thaliana*, sendo a HO-1 a que mais contribui com a produção de CO nesta e em outras espécies vegetais, como o tomate (Emborg et al., 2006).

O CO é liberado juntamente com Fe^{2+} a partir da abertura do anel porfirínico do grupo heme *b* na presença de ferredoxina (como agente redutor) e O_2 , com consequente formação de biliverdina IX α (BV-IX α). Esta, por sua vez, é reduzida a fitocromobilina (P Φ B), o grupo cromóforo do fitocromo (Davis et al., 2001). Assim, o papel inicial atribuído à HO em plantas foi o de estimular a fotomorfogênese (Muramoto et al., 1999; Davis et al., 2001). Mais recentemente, o papel sinalizador do sistema HO-1/CO tem

sido investigado em plantas em resposta ao estresse. A HO é uma enzima presente em cloroplastos e mitocôndrias (Shekhawat e Verma, 2010). O gene sintetizador de HO-1 de repolho apresenta uma expressão ubíqua nos órgãos da planta, mas em maior quantidade em folhas não-cotiledonares, indicando seu possível papel no desenvolvimento foliar (Duan et al., 2016). O gene que sintetiza HO-1 em *Arabidopsis thaliana* foi expresso em maior quantidade no tecido vascular de folhas, caules e raízes (Emborg et al., 2006). Estudos aprofundados sobre a produção de CO em diversos tecidos vegetais são necessários, uma vez que, ao contrário dos tecidos animais, as hemoproteínas não são abundantes nos tecidos vegetais. Em plantas, a expressão de HO-1 pode ser estimulada por diversos tipos de estresses, como metais pesados (Noriega et al., 2004; Balestrasse et al., 2005; 2006; 2008; Han et al., 2008;), radiação ultravioleta (Yannarelli et al., 2006) e estresse salino (Xie et al., 2008; Zilli et al., 2008; Ling et al., 2009). Em situações de estresse, a HO é regulada em nível transcricional, isto é, ou o gene não é transcrito ou o mRNA produzido é degradado. Outros fatores que podem regular a transcrição de HO são ROS/RNS, tais como H₂O₂ (Chen et al., 2009; Santa-Cruz et al., 2017) e NO (Noriega et al., 2007; Xuan et al., 2008; Xu et al., 2011). O H₂O₂ é capaz de aumentar o nível transcricional de HO-1 na ausência de estresse abiótico em plantas (Santa-Cruz et al., 2017). O NO também pode agir na regulação *upstream* de HO, mas a resposta completa ao estresse só acontece se ROS agirem em conjunto com NO (Yannarelli et al., 2006).

O sistema HO-1/CO está implicado na germinação de sementes (Liu et al., 2007 e 2010; Amooaghaie et al., 2015), no fechamento estomático (She e Song, 2008; Song et al., 2008), no desenvolvimento de raiz (Lin et al., 2007; Guo et al., 2009; Xuan et al., 2012; Lin et al., 2014;) e retardamento da morte celular (Wu et al., 2010). Em relação

ao estresse salino, foco maior desta dissertação, o CO exibe um papel protetor ao regular os sistemas antioxidantes (Singh et al., 2016; Wang et al., 2017). CO exógeno (usado em solução aquosa) aliviou a inibição de germinação de sementes de *Oryza sativa* (arroz) causada por salinidade ao mitigar danos oxidativos e peroxidação de lipídios (Liu et al., 2007). CO, suplementado em solução aquosa ou a partir de hematina mitigou danos causados por estresse oxidativo em *Cassia obtusifolia* (sin. *Senna obtusifolia*) (Zhang et al., 2012) e em *Nicotiana tabacum* (tabaco) sob estresse salino (Zhang et al., 2017). CO em solução aquosa reduziu a inibição do crescimento da raiz provocada por estresse salino e diminuiu a morte celular programada por meio da inibição da superprodução de ânion superóxido (O_2^-) (Ling et al., 2009) em *Triticum aestivum* (trigo).

Ao longo do desenvolvimento, os sintomas das plantas deficientes em HO-1 reduzem, sugerindo outras vias de produção de fitocromos (phy) (provavelmente outras HOs assumem esse papel) (Terry e Kendrick, 1999). Em micro-tom, os mutantes *yg-2* apresentam mutação no gene *LeHO1* e os sintomas apresentados pelas plantas ao longo do seu desenvolvimento envolvem a redução na produção de clorofila, conferindo à planta uma coloração amarelada (característica que concedeu o nome a esse mutante). Plântulas jovens apresentam hipocótilos mais longos, desenvolvimento tardio do hipocótilo e do meristema apical e redução de antocianina (Terry e Kendrick, 1999). Plantas adultas desses tomates apresentam fenótipo parcialmente estiolado e a coloração amarelo-esverdeada permanece (Fig. 1).



Fig. 1. Fenótipo de dois genótipos de *Solanum lycopersicum*. À direita, um exemplar de tomateiro do genótipo MT. À esquerda, um exemplar de tomateiro do genótipo MT-yg2. Plantas com 30 dias de idade.

1.3. Resposta de plantas ao estresse salino

As respostas de plantas ao estresse salino diferem entre espécies, mas, de maneira geral, o aumento da salinidade e sodicidade dos solos leva ao estresse oxidativo (Hajiboland e Joudmand, 2009) resultante do aumento do extravasamento de elétrons na cadeia de transporte de elétrons do cloroplasto e da mitocôndria. Os mecanismos de proteção e sistemas de reparo utilizados pelas plantas para minimizar os danos causados pelas espécies reativas podem ser divididos em três categorias: os baseados em compostos solúveis em água (ascorbato, por exemplo), compostos solúveis em lipídios (como α -tocoferol e β -caroteno) e a atuação de enzimas sequestradoras de ROS, como SOD, CAT e APX, além da enzima HO (Zilli et al., 2009; da-Silva et al., 2017). Dentre as ROS estão o O_2^- , o H_2O_2 , o oxigênio singleto ($^1O_2^*$) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) (Latef e Chaoxing, 2011; da-Silva et al., 2018). A manutenção da atividade de SOD, APX e CAT nas células é determinante para o controle de ROS (Shafi et al., 2015).

SOD é uma metaloenzima responsável pela conversão do O_2^- em H_2O_2 , para posterior decomposição através da ação das APXs, CATs e outras peroxidases (Shafi et al., 2015). SODs são encontradas em quase todos os compartimentos celulares, um

aspecto importante para a realização da sua função: as espécies carregadas não permeiam membranas plasmáticas das células e sua presença é importante nos locais em que o ânion superóxido é formado (Caverzan et al., 2016). Peroxidases (PXs) e CATs catalisam a conversão de H_2O_2 em água e oxigênio e elas se diferem pela necessidade das peroxidases apresentarem um agente redutor enquanto as CATs não necessitam de um doador de elétrons. A APX apresenta localização ubíqua na célula e a CAT é apenas encontrada em peroxissomos. Quanto ao tempo de turnover, CATs são mais rápidas, mas APX apresentam afinidade maior com H_2O_2 e atuam no estágio inicial de produção de ROS (da-Silva et al., 2017).

Dois genótipos de tomates Micro-Tom (MT) e *Water Economy Locus in Lycopersicon* (MT-Well) submetidos a um estresse salino (NaCl 100 mM) mostraram redução das concentrações de H_2O_2 a partir do aumento da atividade de CAT. SOD também apresentou atividades intensificadas em ambos os genótipos, especialmente sob tratamento com sal concomitante ao tratamento com doadores de NO (*S*-nitrosoglutaciona) e H_2S (NaHS) (da-Silva et al., 2018). Esses gases estão intimamente relacionados à ativação do sistema antioxidante.

1.4. Interação entre NO, CO e H_2S

As funções celulares são controladas não apenas pela atividade de um gasotransmissor isolado mas pela atividade conjunta de pelo menos dois desses gases. De fato, há evidências de que esses três gasotransmissores interagem uns com os outros de muitas maneiras, inclusive afetando a biossíntese um do outro e as respostas biológicas nos tecidos e órgãos (Li et al., 2009; da-Silva et al., 2018; Zhu et al., 2018).

A primeira demonstração da interação entre NO e H₂S utilizou plântulas de *Medicago sativa* (alfafa) sob estresse induzido por cádmio e mostrou que os doadores de ambos os gases diminuíram os efeitos da toxicidade gerada pela produção de ROS. As respostas das plântulas eram anuladas quando se utilizava um sequestrador de NO (Li et al., 2012), que também bloqueava os efeitos do NaHS. Os resultados sugerem, então, que a via de atuação de H₂S em estresse por metal pesado necessita da participação de NO (Wang et al., 2012). Por outro lado, nosso grupo de pesquisa já demonstrou a relação entre a biossíntese de H₂S e NO em dois genótipos de tomateiros sob estresse salino (da-Silva et al., 2018). O acúmulo de NO em tomateiros teve início a partir de 1 h da imposição do estresse, enquanto a produção de H₂S só começou a partir de 2 h do início do estresse. O uso de doadores de NO aumentaram a produção tanto de NO quanto de H₂S, mas doador de H₂S não levou ao aumento da produção de NO (da-Silva et al., 2018). Resultados similares dessa interação foram obtidos em tabaco (da-Silva et al., 2017), bem como em *Hordeum vulgare* (cevada) onde o uso de sequestradores de H₂S interferiram pouco na produção de NO, mas sequestrador de NO afetou negativamente a produção de H₂S (Chen et al., 2013).

A relação entre os gases NO e CO foi investigada em *Arabidopsis thaliana* sob deficiência de ferro e demonstrou que a sinalização de NO ocorre downstream à sinalização de CO para absorção de ferro, visto que a adição de NO promoveu normalização da absorção de Fe em mutantes que não produzem CO (Yang et al., 2016). O mesmo resultado foi encontrado em outro estudo com *Arabidopsis thaliana* sob estresse salino (Xie et al., 2011).

Dado que a maior fonte de CO nas plantas são as enzimas HOs, é possível e necessário avaliar a interrelação entre HOs e NO, mesmo que indiretamente. Muitos

processos fisiológicos em plantas, como germinação e formação de raízes laterais e adventícias, são modulados pela interação entre HO-1 e NO (Xuan et al., 2008; Chen et al., 2012; Wu et al., 2013). HOs podem ser reversivelmente inibidas por NO ou doadores de NO em humanos, pois NO se liga ao átomo de ferro do grupo heme ou pode se ligar ao de sítio de ligação do ferro na HO (Wang et al., 2003). Como o valor de K_d dessa interação é baixo, o turnover da enzima também pode ser inibido por NO (Beckman e Koppenol, 1996). A atuação sinérgica de NO e HO na sinalização de plantas sob estresse salino foi revelada a partir do aumento da expressão do gene que codifica HO-1 em *Arabidopsis thaliana* e arroz mutantes deficientes em NO (Bonifácio et al., 2011; Xie et al., 2013) sob crescente estresse salino e sob ação de doadores de NO. Isso também significa que a produção de NO e do sistema HO-1/CO apresentam funções semelhantes na adaptação das plantas a diversos tipos de estresse (Santa-Cruz et al., 2010; Cui et al., 2011; Xie et al., 2013).

Já o estudo da relação entre HO-1/CO e H₂S se mostra ainda no início, mas dados apontam a relação entre esses dois gases na formação de raízes adventícias em trigo (Lin et al., 2012). Neste estudo, o desenvolvimento de raízes adventícias induzido pelo doador de H₂S, NaHS, foi impedido a partir da presença concomitante do bloqueador de HO-1, ZnPPiX. Em trigo, a ação citoprotetora de H₂S apresenta envolvimento de HO-1, uma vez que a aplicação de um indutor de HO-1 (hemina) conseguiu aliviar os efeitos da morte celular programada (PCD) induzida por giberelina (GA); NaHS induziu a expressão do gene *HO-1* e o inibidor de HO-1 bloqueou a redução (promovida por NaHS) da PCD (Xie et al., 2014). As mesmas evidências para ação concomitante e complementar de HO-1/CO e H₂S mostrou que a formação de raízes laterais em tomates depende dessa interrelação. Em tabaco, o pré-tratamento com CO melhorou a tolerância

do tabaco ao calor e as evidências sugerem que H₂S exerce um papel como sinalizador *downstream* em relação ao CO (Li e Gu, 2016).

A interação entre CO, NO e H₂S foi descrita baseada no acúmulo de prolina, produto comum em plantas sob estresse (He e He, 2018). Foi observado que os três gases possuem um dreno em comum, a hemoglobina com quem apresentam a seguinte ordem de afinidade de ligação: NO > CO > H₂S (Wang, 2012). Além disso, CO, NO e H₂S conseguem aumentar os níveis de prolina individualmente, cujos níveis são controlados pelo balanço entre P5CS e ProDH (He e He, 2018). O resumo do *interplay* entre os três gases é apresentado na Fig. 2.

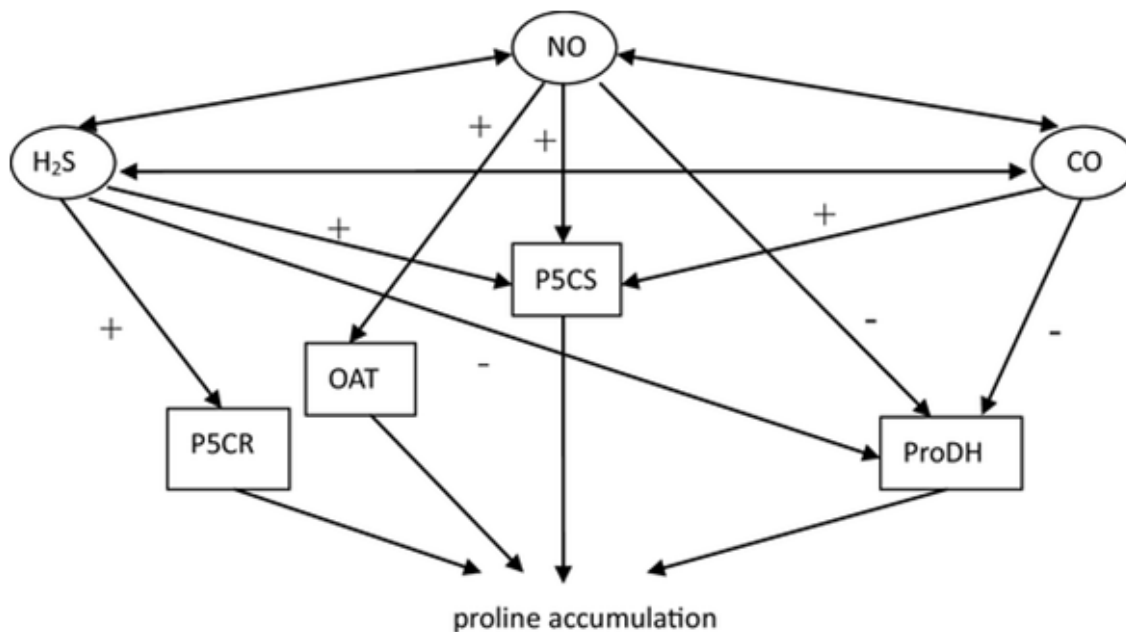


Fig. 2. Possíveis padrões regulatórios dos gases sinalizadores e seu *cross-talk* no metabolismo de prolina em plantas sob estresse abiótico. + representa *up*-regulação e – representa *down*-regulação. Setas duplas indicam a interação de moléculas gasosas sinalizadoras. **P5CS**, Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato-sintetase; **P5CR**, Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato-redutase; **OAT**, ornitina aminotransferase; **ProDH**, prolina desidrogenase. Fonte: He e He (2018).

2. Objetivo Geral

Avaliar a relação entre a produção de NO, H₂S e CO na resposta de *S. lycopersicum*, genótipos MT e MT *yg-2* ao estresse salino.

2.1. *Objetivos Específicos*

Caracterizar dois fenótipos de tomateiros (MT e MT yg-2) através dos conteúdos de massa seca, massa fresca, teor de carotenoides antes e após imposição de estresse salino e clorofilas *a* e *b* em plantas que não foram submetidas ao estresse salino;

Determinar a atividade de enzimas do sistema antioxidante SOD, CAT, APX e HO pré e pós imposição de estresse salino aos dois genótipos de tomateiros;

Relacionar o tratamento com um doador de CO ao acúmulo de NO, H₂S e imposição de estresse salino em dois genótipos de tomateiros;

Investigar o acúmulo de três gasotransmissores (NO, CO e H₂S) ao longo do tempo, durante a imposição do estresse salino nos dois genótipos de tomateiros.

3. **Materiais e Métodos**

3.1. *Material Vegetal*

Dois genótipos de *Solanum lycopersicum* foram selecionados para a realização deste trabalho: Micro-Tom (MT) e *yellow green 2* (MT-yg2). O primeiro genótipo, MT, apresenta mutações nos genes que garantem auto-poda e nanismo (Martí et al., 2006). Já o genótipo MT-yg2, além das mutações de nanismo, apresenta também deficiência no gene que codifica a produção de heme-oxigenase (Carvalho et al., 2011). As sementes foram fornecidas pelo Prof. Dr. Lázaro Peres (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP) e multiplicadas de agosto de 2017 a maio de 2019 em estufa não climatizada (Fig. 3).



Fig 3. Estufa não climatizada. $67,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por estante. Foram utilizadas lâmpadas de LED brancas, azuis e vermelhas para obtenção de sementes.

3.2. Germinação e cultivo das plantas

As sementes de MT e MT-yg2 foram embebidas em água deionizada, acondicionadas em vermiculita e irrigadas com solução de Hoagland (pH 5.8) a 10% da força iônica (Epstein, 1972). Após germinação as plântulas foram acondicionadas em estufa com abrangência fotométrica de $67,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h. Com 15 dias de crescimento, as plântulas foram transferidas para vasos de plástico preto (600 mL) que foram mantidos em casa de vegetação e cultivadas em hidroponia com solução de Hoagland a 25% da força iônica (pH 5.8). A solução foi trocada a cada dois dias para evitar hipóxia nas raízes. Na casa de vegetação, as plantas foram cultivadas em condições naturais de luz e temperatura, com o máximo de $963 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 29°C de temperatura média ao meio dia, e $5,55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 23°C de temperatura média ao pôr-do-sol.

3.3. Imposição do estresse e coleta do material vegetal

Após 15 dias sob as condições de cultivo descritas acima, plantas de tamanho semelhante foram selecionadas e submetidas a concentrações crescentes de NaCl (0 a 150 mM) preparado em solução de Hoagland a 25% da força (pH 5.8) (Fig. 4). O estresse salino foi imposto durante 48 h. Após este tempo, uma parte das plantas foi pesada, teve a parte aérea e raiz separadas e foi congelada em nitrogênio líquido para posterior análise de atividade de enzimas do sistema antioxidante: CAT, SOD, APX e HO-1 (da-Silva et al., 2017). Outra parte foi utilizada para caracterização dos genótipos através da obtenção de massa seca, massa úmida e plantas não estressadas foram utilizadas para obtenção do teor de pigmentos.



Fig. 4. Plantas de *Solanum lycopersicum* submetidas a concentrações crescentes de NaCl por hidroponia. Da esquerda para a direita: NaCl 0, 25, 50, 100 e 150 mM. **A**, genótipo MT yg-2; **B**, genótipo MT.

3.4. Caracterização dos genótipos

Análise de massas fresca (*MF*) e seca (*MS*) foram realizadas em plantas dos dois genótipos tratadas ou não com NaCl 100 mM. As plantas foram separadas em parte aérea e raiz, pesadas e submetidas à secagem em estufa a 60°C por quatro dias. Após esse período, as plantas foram novamente pesadas e o conteúdo hídrico (*C*) foi calculado para raízes e folhas, analisados individualmente nos tratamentos com e sem estresse salino, conforme equação abaixo (Liang et al., 2009):

$$C = \frac{MF - MS}{MS}$$

A unidade de *C* pode ser expressa como a relação de perda de água e massa seca da folha ou da raiz, g/g.

Outra análise foi realizada para obter o teor de clorofilas *a* e *b* e de carotenoides em ambos os genótipos. Neste experimento, as plantas não foram submetidas a estresse salino. Três discos foliares de 1 cm de diâmetro foram removidos de cada planta, de regiões desprovidas de nervuras centrais, foram pesados e colocados em frascos de cor âmbar contendo 2 mL de dimetil sulfóxido (DMSO). Os frascos foram armazenados por 72 h na ausência de luz e, após esse período, constatou-se que os cortes estavam totalmente descoloridos. Assim, medições de 100 µL de cada solução (em sextuplicata) foram realizadas em leitor espectrofotométrico nos comprimentos de onda de 480, 649 e 665 nm. Os cálculos para determinação dos pigmentos foram realizados de acordo com Hiscox e Israelstam, 1979:

$$\text{Clorofila } a = (12,47 \times \text{Abs}_{665}) - (3,63 \times \text{Abs}_{649})$$

$$\text{Clorofila } b = (25,06 \times \text{Abs}_{649}) - (6,5 \times \text{Abs}_{665})$$

$$\text{Carotenoides} = [(1000 \times \text{Abs}_{470}) - (1,29 \times \text{Ca}) - (53,78 \times \text{Cb})] / 220$$

Os resultados foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ MS e as análises estatísticas foram conduzidas comparando o teor de cada pigmento entre os dois genótipos de tomateiro.

3.5. Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidante

Folhas e raízes congeladas (0,3 g) de cada um dos genótipos, tratadas em concentrações crescentes de NaCl (0, 25, 50, 100 e 150 mM) foram maceradas separadamente com nitrogênio líquido na presença de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Para a extração das proteínas solúveis utilizou-se 1 mL de tampão de extração composto por tampão fosfato (pH 6,8) 50 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 100 μM e coquetel inibidor de protease (Sigma). Esse extrato foi submetido à centrifugação a $10000 \times g$ por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para posterior análise das atividades das enzimas APX, CAT e SOD.

O tampão teste para determinação da atividade de APX era composto de tampão fosfato (pH 6,0) 50 mM, ácido ascórbico 1 mM e H_2O_2 2 mM, de acordo com Nakano e Asada (1981). Medidas espectrofotométricas a 290 nm foram realizadas para monitorar a redução da concentração de ácido ascórbico no meio. Os cálculos da atividade foram realizados com base no coeficiente de extinção molar (ϵ) de $2,8 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade de CAT foi determinada como em da-Silva et al. (2017). As amostras foram incubadas em meio de reação constituído de tampão fosfato 50 mM (pH 6,8) e H_2O_2 125 μM . A atividade da enzima foi estimada de acordo com a degradação de H_2O_2 a 240 nm e ϵ igual a $39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

O meio de reação para análise da atividade de SOD era constituído de tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), L-metionina 13 mM, nitro blue tetrazolium (NBT) 75 µM, EDTA 100 µM e riboflavina 2 µM. As reações foram conduzidas à temperatura ambiente com dois conjuntos de reações acondicionados em câmara fechada. Um conjunto, a reação controle, foi mantida na ausência de luz e o outro foi mantido na presença de luz (15 W) por 10 min. A quantificação da atividade de SOD ocorreu a partir da redução de O₂ em presença de riboflavina e L-metionina sob iluminação e consequente formação do radical O₂. Este radical, então, foi utilizado como substrato para a SOD e o radical não dismutado pela enzima reduziu o NBT. Essa redução levou à formação de azul de formazana que foi medido espectofotometricamente a 575 nm. Uma unidade de SOD foi determinada como a quantidade de enzima necessária para inibir a fotorredução do NBT em 50%. (Giannopolitis e Ries, 1977), com modificações por Horta et al., 2014.

A quantificação de proteínas totais de cada amostra foi realizada utilizando-se o método de Bradford (1976), em que as proteínas se ligam ao *coomassie blue* e utiliza-se a albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Os dados obtidos a partir da quantificação de proteínas totais foram utilizados para normalizar os resultados de atividades das enzimas abordadas no presente estudo.

3.6. Determinação da atividade de HO

Amostras de raízes e folhas (0,3 g) congeladas foram maceradas em presença de PVPP utilizando-se nitrogênio líquido. O tampão para extração de HO (EC 1.14.99.3) era composto por tampão fosfato (pH 7,4) 50 mM acrescido de EDTA 200 µM, sacarose 200 mM e coquetel inibidor de protease. O extrato foi centrifugado a 17000 *x g*

por 10 min a 4°C. O meio de reação para quantificação da atividade de HO era constituído de tampão fosfato (pH 7,4) 50 mM, NADPH 120 µM e hemina 400 µM. Após incubação de 1 h a 37°C, realizou-se a medida espectrofotométrica a 650 nm. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 6,25 mM⁻¹ cm⁻¹.

3.7. Acúmulo de NO e H₂S em resposta a um doador de CO

A fim de compreender a influência do CO na produção de NO e H₂S, plantas de tomate de 30 dias crescidas em solução nutritiva de Hoagland a ¼ da força (pH 5,8) foram submetidas a um tratamento com doador de CO (Tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer, CORM-2) por 48 h. A solução de CORM-2 (20 µM) foi preparada em DMSO 2% e acrescentada à solução nutritiva com ou sem adição de sal (100 mM). A concentração de sal utilizada foi escolhida a partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, pois foi uma concentração capaz de induzir respostas das enzimas antioxidantes ao estresse sem causar mortalidade dos indivíduos. Como tratamento controle, foi adicionado DMSO 2% à solução nutritiva com ou sem NaCl (100 mM). Após as 48 h raízes e folhas (terceira e quarta folhas totalmente expandidas) foram coletadas (200 mg), maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,8). As medições foram realizadas como em da-Silva et al. (2017), utilizando um volume de homogenato adicionado a quatro volumes de tampão fosfato 100 mM para quantificação de H₂S ou 100 mM de CuCl₂ para NO através de sensores amperométricos ISO-H₂S-2 e ISO-NOP. Curvas padrão com soluções de *S*-nitroso-*N*-acetilpenicilamina (SNAP) e Na₂S desoxigenado foram realizadas para a quantificação de NO e H₂S, respectivamente. Os sensores estavam acoplados a um Analisador de Radicais Livres (Free Radical

Analyzer) TBR4100 (WPI, USA) e possuem a capacidade de quantificar NO em concentração menor que 1 nM e H₂S em concentração menor do que 5 nM. Foram utilizadas três replicatas biológicas para cada tratamento.

3.8. Acúmulo de NO, CO e H₂S em função do tempo

O acúmulo dos três gasotransmissores foi monitorado nas raízes de tomateiro ao longo do tempo através de quantificação realizada por imageamento utilizando fluoróforos específicos para cada gás (da-Silva et al., 2017; Feng et al., 2017). Foram utilizados 5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2DA), WSP-5 e Probe 1 sintetizada pela equipe do Prof. Ângelo de Fátima, do Departamento de Química da UFMG de acordo com Feng et al. (2017). Esses fluoróforos são específicos para que NO, H₂S e CO, respectivamente. DAF-2DA apresenta excitação máxima em 488 nm e WSP-5 e Probe 1, em 490 nm.

As plantas de tomate com 30 dias de vida foram colocadas por 30 min, 2 ou 6 h em contato com NaCl 100 mM em solução nutritiva, como descrito anteriormente. Após cada tempo, as pontas das raízes foram coletadas (5 mm e 3 amostras por planta), lavadas em água ultrapura e submetidas à infiltração com as sondas DAF-2DA (10 µM) por 30 min, WSP-5 (100 µM) ou Probe 1 (10 µM) em PdCl₂ (10 µM) por 60 min. As amostras foram analisadas em microscópio de epifluorescência (DM 2500-LED, Leica Microsystem, DE), equipado com filtro de fluoresceína isoticianato (FITC) que abrange comprimentos de onda de 490 a 525 nm e uma câmera DFC 7000T (Leica, DE). As leituras foram realizadas com exposição de 688 ms em aumento de 5 vezes. As imagens foram analisadas através do software ImageJ (NIH, Nova Iorque, EUA). A

fluorescência foi expressa em unidades arbitrárias (UA) e a Fluorescência Corrigida e Total da Célula (CTCF) determinada de acordo com (Burgess et al., 2010):

$$\text{CTCF} = \text{Densidade Integrada} - (\text{Área selecionada} \times \text{fluorescência de fundo})$$

As análises estatísticas foram conduzidas separadamente para cada fluoróforo e compararam todas as medições dos dois genótipos entre si.

3.9. Análises estatísticas

Cada amostra biológica constituiu-se de duas plantas de tomate (duas plantas por pote) para os experimentos de avaliação da atividade de CAT, APX, SOD e HO. Nos demais experimentos, cada amostra era constituída de uma planta de tomate por pote. Os dados foram analisados para avaliar normalidade e homoscedasticidade com os testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os dados considerados não-paramétricos foram transformados com $\log(x)+1$ ou foi obtida a raiz quadrada dos dados para terem sua distribuição normalizada. Após a normalização dos dados, foi utilizado análise de variância. Por fim, as medias foram comparadas utilizando Scott-Knott ($P < 0,05$). Os dados submetidos aos testes Shapiro-Wilk, ANOVA e Levene foram analisados utilizando o software SigmaStat (SigmaStat 4.0) e os dados submetidos a Scott-Knott foram analisados utilizando o software Sisvar (Sisvar 5.3. Build 77).

4. Resultados

4.1. Teor de pigmentos fotossintéticos

O conteúdo de cloforila *a* em MT foi de $214,9 \pm 5,4 \mu\text{g g}^{-1}$ MF, enquanto em MT yg-2 foi de $130,3 \pm 3,97 \mu\text{g g}^{-1}$ MF. Seguindo a mesma tendência, o conteúdo de

clorofila *b* em MT foi de $109,6 \pm 5 \mu\text{g g}^{-1}$ MF, maior do que MT *yg-2* ($77,9 \pm 2,6 \mu\text{g g}^{-1}$ MF). Já o conteúdo de carotenoides foi menor em MT ($101,6 \pm 0,42 \mu\text{g g}^{-1}$ MF) do que em MT *yg-2* ($119,6 \pm 0,36 \mu\text{g g}^{-1}$ MF). As análises estatísticas foram conduzidas separadamente para cada pigmento (Fig. 5).

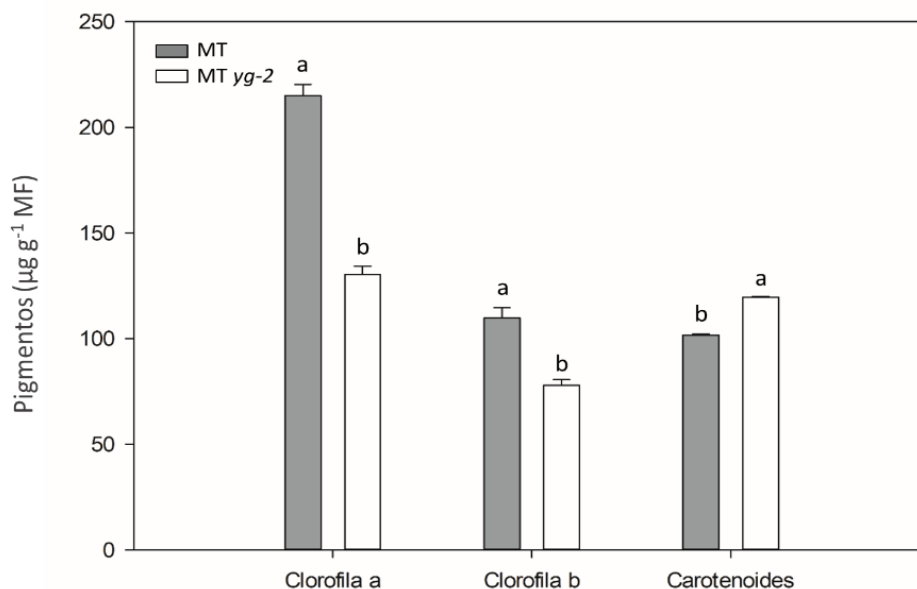


Fig. 5. Quantidade de clorofilas *a* e *b* e carotenoides em folhas de tomateiros dos genótipos MT e MT-*yg2*, com 30 dias de idade. Os dados são a média ($n = 6$) \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre genótipos para um dado pigmento (Teste Skott-Knott; $P < 0.05$).

4.2. Determinação do conteúdo hídrico

A Figura 8 apresenta os resultados de conteúdo hídrico nas folhas ou nas raízes dos genótipos de tomateiro. Após as plantas permanecerem por 48 h em estresse salino a 100 mM, foram comparados os valores de conteúdo hídrico obtidos a partir do mesmo órgão dos dois genótipos. As médias dos valores de conteúdo hídrico variaram de $7,63 \pm 0,68 \text{ g g}^{-1}$ MS (folha de MT controle) a $10,63 \pm 1,45 \text{ g g}^{-1}$ MS (folha de MT *yg-2*) em folhas. Portanto, o tratamento com NaCl e o genótipo não interferiram no conteúdo hídrico das folhas. O tratamento com NaCl também não interferiu no conteúdo hídrico

das raízes dentro de cada genótipo. Entre os genótipos, no entanto, os valores de conteúdo hídrico de MT foram cerca de 60% menores do que os de MT yg-2.

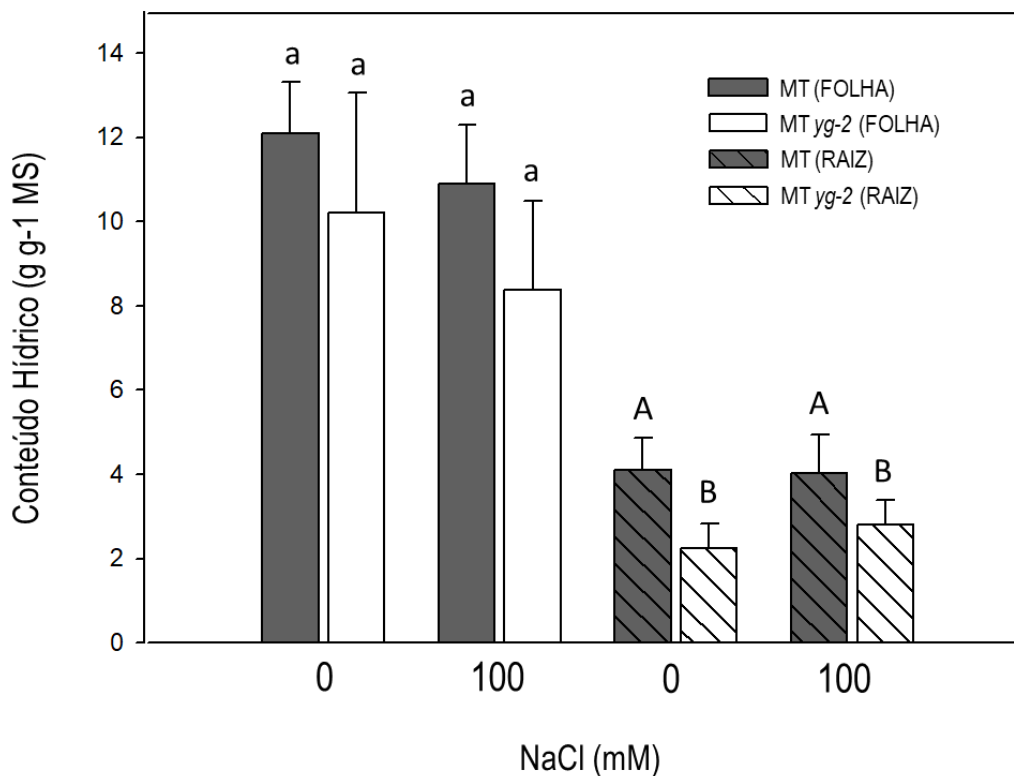


Fig. 6. Conteúdo hídrico em genótipos de tomateiro. Análises foram realizadas separadamente em folhas e raízes de plantas tratadas ou não com NaCl 100 mM por 48 h. Valores representam as médias ($n = 15$) \pm desvio padrão. Letras iguais indicam semelhança estatística entre tratamentos num mesmo órgão (Teste Scott-Knott; $P < 0,05$). MS, massa seca.

4.3. Atividade antioxidante em plantas submetidas a estresse salino

Os efeitos de concentrações crescentes de NaCl na atividade de enzimas do sistema antioxidante foram investigados em folhas e raízes, que revelaram capacidades diferentes de lidar com o estresse salino (Tabela 1). A atividade de APX nas folhas dos tomateiros foi maior no genótipo MT yg-2 do que em MT, atingindo o pico no controle e no tratamento com maior concentração de NaCl (150 mM; $P < 0,05$). Nesta última concentração, a atividade de APX foi 26% maior em MT yg-2 do que no genótipo

parental, MT ($P < 0,05$). Já em raízes, a maior atividade foi registrada no tratamento de 25 mM do genótipo MT, que foi quase 3 vezes maior do que a atividade de APX encontrada para MT *yg-2* no mesmo tratamento ($P < 0,05$). Em folha, a atividade de CAT foi 2,2 vezes maior em MT *yg-2* do que em MT. Em raiz, a atividade de CAT no genótipo MT *yg-2* foi aproximadamente 33% maior do que a atividade desta enzima em MT (Tabela 1; $P < 0,05$). A atividade de SOD em folhas e raízes no genótipo MT não foi afetada pelo estresse salino.

A atividade SOD em raízes de MT *yg-2* aumentou com o aumento da concentração de NaCl, exceto quando usado a 100 mM (Tabela 1). Por outro lado, decréscimo na atividade SOD foi registrado em folhas de MT *yg-2* em resposta à até 100 mM NaCl, em comparação com folhas de plantas controle (Tabela 1)

Tabela 1. Atividade de enzimas do sistema antioxidante em dois genótipos de *Solanum lycopersicum* (MT e MT yg-2) tratados com concentrações crescentes de NaCl por 48 h. Letras distintas indicam diferença significativa, num mesmo órgão, entre genótipos diferentes (Teste Scott-Knott; $P < 0,05$). Os valores representam as médias ($n = 5$) \pm desvio padrão.

NaCl (mM)	APX ($\mu\text{mol ascorbato min}^{-1} \text{prot}^{-1}$)		CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{min}^{-1} \text{prot}^{-1}$)		SOD ($\text{U min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$)		
	FOLHA	RAIZ	FOLHA	RAIZ	FOLHA	RAIZ	
MT	0	4,1 \pm 0,1 c	6,4 \pm 0,04 c	48,7 \pm 0,04 h	82,2 \pm 0,01 e	7,6 \pm 0,7 c	3,7 \pm 0,2 d
	25	4,3 \pm 0,1 c	8,7 \pm 0,03 a	55,4 \pm 0,04 f	77,7 \pm 0,01 f	7,9 \pm 0,5 c	4,4 \pm 0,01 d
	50	3,6 \pm 0,1 d	6,9 \pm 0,03 b	48,6 \pm 0,03 h	87,3 \pm 0,01 d	6,9 \pm 0,8 c	3,7 \pm 0,2 d
	100	3,5 \pm 0,1 d	6,2 \pm 0,04 c	46,8 \pm 0,02 i	108,7 \pm 0,02 b	6,9 \pm 0,3 c	3,5 \pm 0,1 d
	150	3,8 \pm 0,2 d	6,4 \pm 0,1 c	49,5 \pm 0,02 g	81,2 \pm 0,01 g	7,8 \pm 0,1 c	3,9 \pm 0,02 d
MT yg-2	0	6,0 \pm 0,3 a	2,7 \pm 0,2 a	78,6 \pm 0,02 d	78,7 \pm 0,01 h	10,6 \pm 1,1 a	10,0 \pm 1,1 c
	25	4,1 \pm 0,3 c	2,9 \pm 0,1 e	92,0 \pm 0,1 b	81,5 \pm 0,02 i	9,6 \pm 1,0 b	11,5 \pm 1,5 c
	50	4,5 \pm 0,9 c	2,4 \pm 0,2 f	77,5 \pm 0,03 e	77,5 \pm 0,01 j	8,7 \pm 1,3 b	11,9 \pm 0,2 b
	100	4,8 \pm 0,6 c	2,8 \pm 0,5 e	81,5 \pm 0,1 c	92,0 \pm 0,01 c	9,9 \pm 1,4 b	12,2 \pm 1,7 b
	150	5,1 \pm 0,4 a	3,2 \pm 0,3 f	109,8 \pm 0,1 a	109,8 \pm 0,02 a	11,7 \pm 0,5 a	15,5 \pm 2,3 a

4.4. Atividade de HO em plantas submetidas a estresse salino

Com a finalidade de constatar a ideia de que o genótipo MT yg-2 fosse defectivo na produção de HO (Carvalho et al., 2011), a atividade desta enzima nos dois genótipos de tomateiro foi investigada. Os níveis basais da atividade de HO em folhas foram similares entre os dois genótipos (Tabela 2; $P > 0,05$), mas nas raízes a atividade de HO em MT foi aproximadamente 20% maior do que em MT yg-2. Em folhas, a maior atividade de HO foi registrada no genótipo MT yg-2 nos tratamentos com NaCl 50 e 100 mM. Já em raízes, a maior atividade foi observada no genótipo MT no tratamento com NaCl 50 mM (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade da enzima heme oxigenase em dois genótipos de *Solanum lycopersicum* (MT e MT yg-2) tratados com concentrações crescentes de NaCl por 48 h em plantas com 30 dias de vida. Médias (n = 6) \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa, num mesmo órgão, entre genótipos diferentes (Teste Scott-Knott; $P < 0,05$).

		HO (nmol min ⁻¹ mg prot ⁻¹)	
		FOLHA	RAIZ
	NaCl (mM)		
MT	0	108,4 \pm 9,7 c	128,0 \pm 9,5 b
	25	104,0 \pm 9,6 c	110,7 \pm 12,0 c
	50	104,0 \pm 8,6 c	170,3 \pm 10,9 a
	100	89,9 \pm 8,3 d	110,0 \pm 9,4 c
	150	83,7 \pm 9,5 d	132,1 \pm 12,2 b
MT yg-2	0	98,6 \pm 10,6 c	105,8 \pm 3,8 c
	25	123,6 \pm 10,1 b	117,0 \pm 8,9 c
	50	132,3 \pm 14,1 a	144,8 \pm 9,3 b
	100	139,2 \pm 10,3 a	77,4 \pm 9,5 d
	150	120,7 \pm 8,8 b	86,7 \pm 6,1 d

A partir da análise das atividades destas enzimas do sistema antioxidante e de acordo com resultados observados por estudos do grupo em MT, foi estabelecido que a concentração de 100 mM de NaCl seria a utilizada nos testes seguintes (da-Silva et al., 2017). Embora a atividade de algumas enzimas tenha sido maior na concentração 150 mM de sal, houve mortalidade e necrose das folhas de algumas plantas submetidas a esse tratamento (Fig. 9). Assim, a concentração de 100 mM foi adotada nos demais testes.



Fig. 7. Plantas de tomateiro do genótipo MT yg-2 com 32 dias de idade sob tratamento controle (A) ou NaCl 150 mM (B). **1B**, Exemplo de mortalidade induzida pelo estresse salino. **2B**, Exemplo de murcha induzida pelo estresse salino.

4.5. Produção de H₂S e NO em plantas submetidas simultaneamente a estresse salino e um doador de CO

Esse experimento foi realizado com a finalidade de avaliar se haveria influência do CO no acúmulo de NO e H₂S nos dois genótipos de tomateiro, submetidos ou não a estresse. Folhas do genótipo MT yg-2 não apresentaram variação no conteúdo de NO e H₂S em nenhuma das condições de tratamento (Fig. 10; $P > 0,05$). A mesma tendência foi observada na produção de H₂S nas raízes desse mesmo genótipo. Por outro lado, as raízes de MT yg-2 produziram pelo menos 50% mais NO quando suplementadas com liberador de CO (CORM-2). Este aumento observado a partir da adição de CORM-2 não sofreu alteração do tratamento com NaCl, mesmo que o estresse salino também tenha provocado o aumento da produção de NO em plantas não tratadas com o liberador de CO. Já o genótipo MT mostrou-se mais sensível à adição de CO, no acúmulo de NO e H₂S, tanto em raízes quanto em folhas, independentemente do estresse salino. Em raízes, MT apresentou maior média de concentração de NO nas plantas estressadas submetidas a tratamento com liberador de CO (CORM-2). As médias desse tratamento chegaram a ser 1,5 vezes maiores do que as de plantas não estressadas e quase sete vezes maior do que as plantas não tratadas com liberador de CO (CORM-2) e submetidas a estresse salino. A concentração de H₂S nas raízes de MT não foi afetada pela concentração de NaCl, mas o conteúdo de H₂S aumentou 44% após tratamento das plantas com doador de CO. As folhas do genótipo MT sofreram influência do doador de CO em ambas as concentrações de NaCl, mas o estresse salino também induziu aumento de 60% da média de produção de NO e redução de aproximadamente 17% da média de produção de H₂S (Fig. 10).

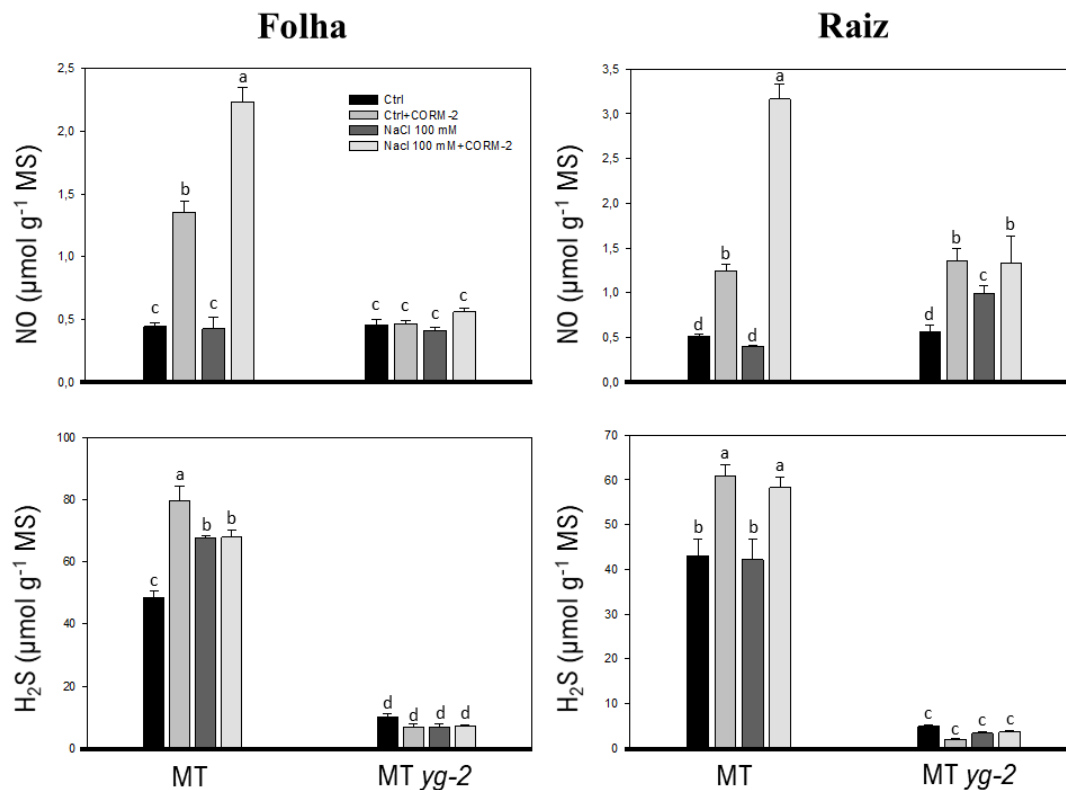


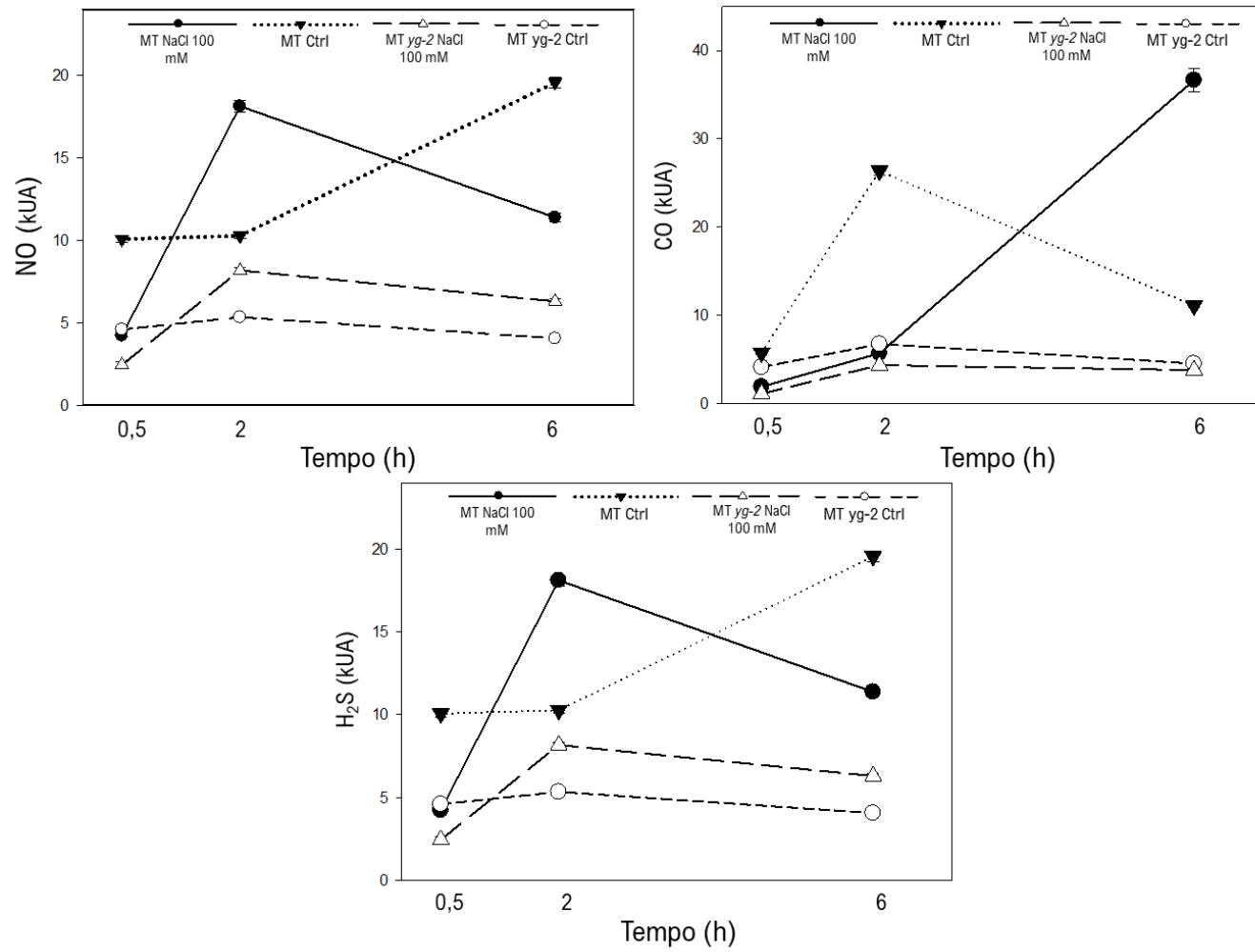
Fig.8. Efeito de doador de CO nos níveis de NO e H₂S em dois genótipos de *Solanum lycopersicum* sob estresse salino. Folhas e raízes foram coletadas após 48 h de imposição ou não de estresse com NaCl 100 mM na presença doador de CO (CORM-2). Letras distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos num mesmo órgão (Teste Scott-Knott; $P < 0,05$).

4.6. Detecção *in situ* e estimativa de conteúdo de NO, H₂S e CO em raízes de tomateiros

As análises estatísticas neste experimento foram conduzidas separadamente para cada tipo de gasotransmissor, uma vez que os fluoróforos que os detectam são diferentes entre si e apresentam capacidade distinta de marcação fluorescente. Assim, todos os tratamentos com NaCl (controle e NaCl 100 mM) foram comparados entre si, entre os tempos de incubação com fluoróforos apresentados (0,5, 2 e 6 horas) e entre os dois genótipos (MT e MT yg-2) (Scott-Knott; $P < 0,05$).

Plantas de tomate de dois genótipos foram submetidas a 100 mM NaCl por 0,5, 2 e 6 h a fim de detectar a influência desse estresse na produção de neurotransmissores. O tratamento com 100 mM NaCl influenciou a produção de NO em MT *yg-2* e CO em MT no tempo de 6 h (Tabela 3; Figs. 11 e 12). Nestas amostras, o aumento de CO chegou a ser 8 vezes maior em MT 100 mM NaCl do que MT 0 mM NaCl ($P < 0,05$), e o aumento de NO chegou a ser 3 vezes maior em MT *yg-2* 100 mM NaCl do que MT *yg-2* 0 mM NaCl ($P < 0,05$). Interessantemente, o genótipo MT *yg-2*, defectivo na enzima que produz a maior parte do CO nas plantas, submetido a estresse salino produziu três vezes mais CO do que o tratamento controle do mesmo genótipo já no menor tempo medido. Ainda assim, a produção basal de CO em MT *yg-2* foi pouco mais de duas vezes menor do que a produção basal de CO em MT no tempo 0,5 h. No genótipo mutante, a produção de NO nas plantas submetidas a 100 mM NaCl aumenta ao longo do tempo e o contrário acontece com H₂S, cuja produção detectada no tempo 0,5 h reduz pela metade às 6 h (Tabela 3; Fig. 13). Já o genótipo parental apresenta acúmulo ao longo do tempo deste gás em plantas submetidas a estresse.

Fig. 9. Produção de NO, CO e H₂S nas raízes de dois genótipos de tomateiro (MT e MT *yg-2*) sob estresse salino em três tempos de incubação com cada fluoróforo específico para cada gasotransmissor. Resultados expressos em kUA, kilo Unidades Arbitrárias. (Teste Skott-Knott; $P < 0.05$).



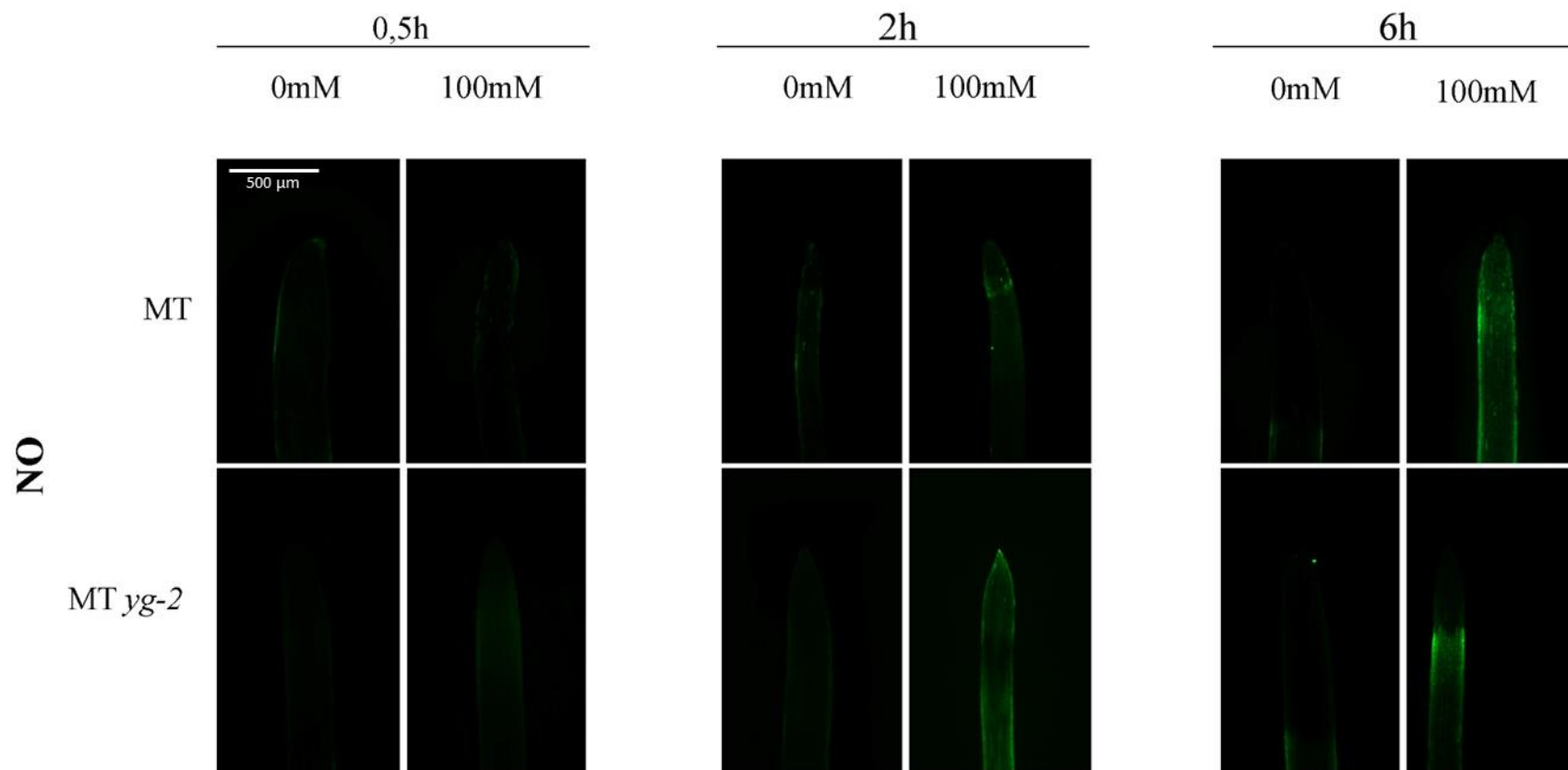


Fig. 10. Imagens representativas do acúmulo de NO em raízes de plantas de tomateiro em função da duração do estresse salino. Plantas dos genótipos MT e Mt yg-2 foram incubadas com NaCl 100 mM nos tempos indicados e as raízes coletadas e encubadas com DAF-2DA para localização *in situ* de NO (fluorescência verde).

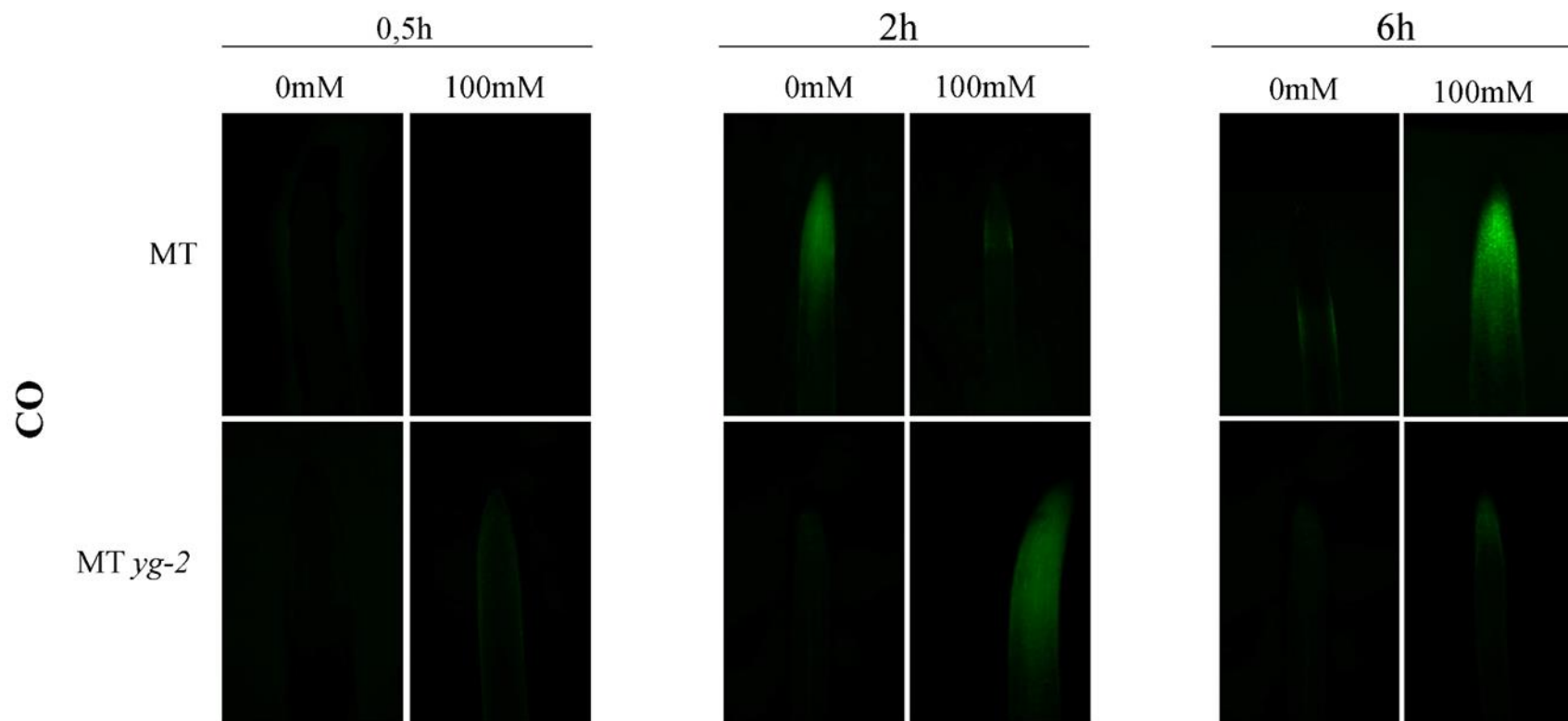


Fig. 11. Imagens representativas do acúmulo de CO em raízes de plantas de tomateiro em função da duração do estresse salino. Plantas dos genótipos MT e Mt *yg-2* foram incubadas com NaCl 100 mM nos tempos indicados e as raízes coletadas e encubadas com Probe 1 para localização *in situ* de CO (fluorescência verde).

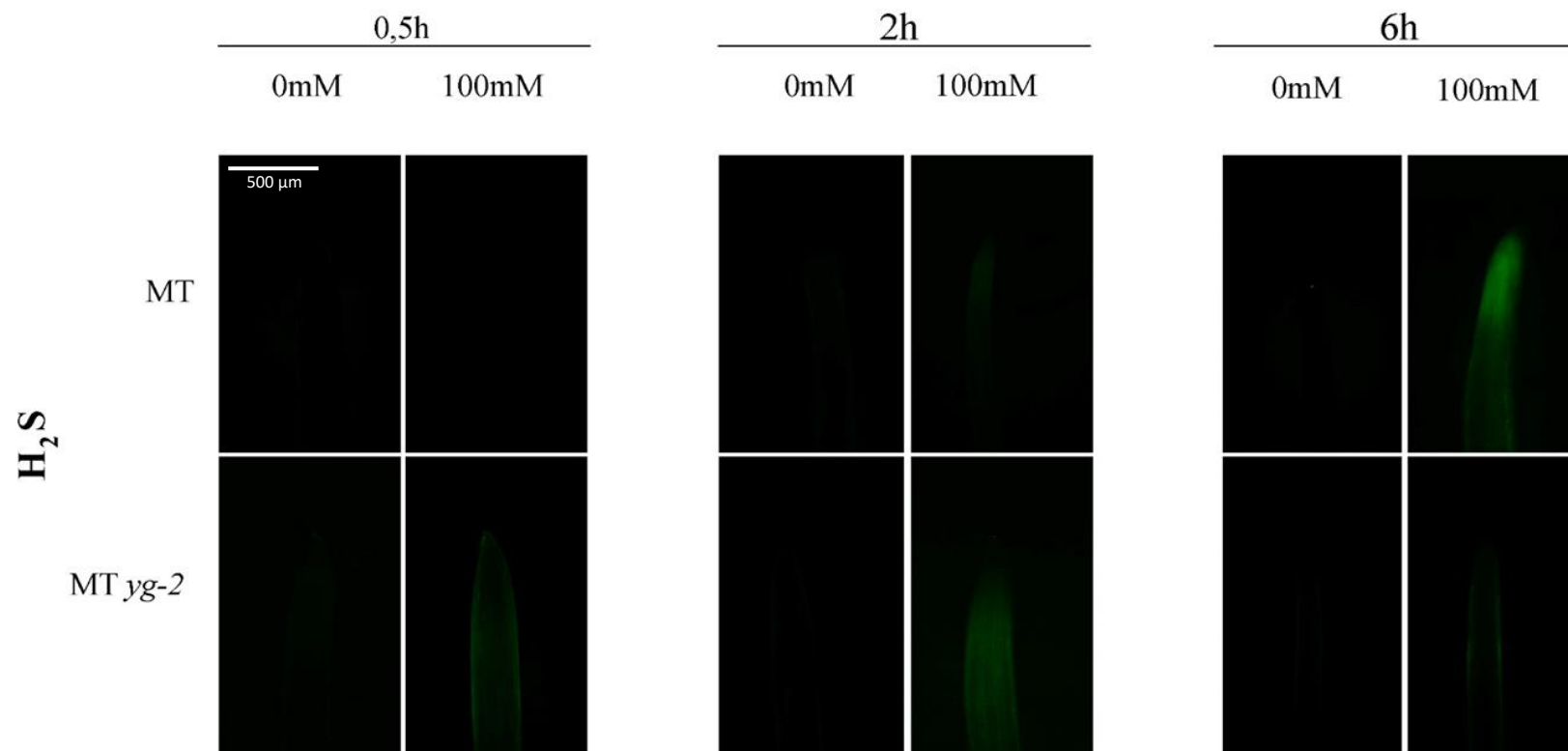


Fig. 12. Imagens representativas do acúmulo de H_2S em raízes de plantas de tomateiro em função da duração do estresse salino. Plantas dos genótipos MT e Mt *yg-2* foram incubadas com NaCl 100 mM nos tempos indicados e as raízes coletadas e encubadas com WSP-5 para localização *in situ* de H_2S (fluorescência verde).

5. Discussão

O conteúdo hídrico é um parâmetro crítico para o vigor do vegetal, uma vez que a presença de água nos tecidos vegetais permite a síntese de carboidratos a partir de CO₂, abertura estomática e manutenção do equilíbrio osmótico das células (Lin et al., 2019). O conteúdo hídrico foi aproximadamente 40% menor no genótipo MT *yg-2* do que no genótipo MT. Em plantas de interesse agrícola, o conteúdo hídrico dos vegetais pode ser reduzido por elevada salinidade do solo (Deumier et al., 1996), comprometendo a produtividade vegetal. As raízes são os primeiros órgãos do vegetal a entrarem em contato com condições adversas no solo e apresentam maior susceptibilidade aos efeitos do estresse do que a parte aérea da planta (Lazof e Bernstein, 1999). Raízes do genótipo MT *yg-2* apresentaram menor conteúdo hídrico do que MT e, uma vez que esta comparação fora realizada entre plantas da mesma espécie, sendo um indicativo de estresse (Morgan, 1984) a que as plantas mutantes estejam sujeitas devido à mutação na rota de biossíntese de fitocromos, reduzindo a produção de clorofilas tanto na planta jovem, quanto na planta adulta (Davis et al., 2001). Esta mutação afeta o desenvolvimento de plantas de Micro-Tom *yg-2* pela ausência de fitocromos totalmente funcionais: na fase adulta, um crescimento parcialmente estiolado; em plantas jovens, desenvolvimento tardio do cotilédone, alongamento acentuado da parte aérea e repressão da abertura do gancho apical.

A tendência de redução nos teores de clorofila em MT *yg-2* pôde ser observada nos conteúdos de clorofila *a* que, em MT, foi 60% maior do que no genótipo mutante; e nos conteúdos de clorofila *b*, com quase 30% a menos em MT *yg-2* em relação ao parental, MT. No entanto, o conteúdo de carotenoides totais foi 15% maior em MT *yg-2*

do que em MT. A coloração amarelo-esverdeada em MT *yg-2* se atenua ao longo da vida do vegetal, ficando restrita às folhas mais jovens, que naturalmente apresentam menos cloroplastos (Fig. 6). Ainda assim, a coloração verde de MT *yg-2* permanece levemente mais clara do que MT, mesmo na planta adulta (Fig. 7).



Fig. 13. Plantas de tomateiro do genótipo MT *yg-2* em três estágios de desenvolvimento. Da esquerda para a direita: 20 dias, 30 dias e 60 dias de idade. Plantas cultivadas em estufa não climatizada.



Fig. 14. Plantas de tomateiro com 60 dias de idade dos genótipos MT *yg-2* e MT, da esquerda para a direita. Plantas cultivadas em estufa não climatizada.

A resposta basal elevada do genótipo MT *yg-2* ao estresse salino foi observada nas atividades de enzimas do sistema antioxidante. A família das SODs atua primeiramente na resposta das plantas a estresse ao sequestrar o radical ânion superóxido e, a partir dele, sintetizar peróxido de hidrogênio (Meloni et al., 2003). Isso pode explicar os altos níveis de atividade SOD, até mesmo na atividade basal de folhas, uma vez que as plantas de MT *yg-2* já apresentam alto nível de estresse basal pelas consequências da mutação que carregam.

Por outro lado, o decréscimo da atividade de SOD revela atenuação do estresse a partir do aumento da ação de APX, inicialmente e, ação concomitante de APX e CAT. No genótipo parental, o mesmo nível médio de atividade de SOD foi encontrado em outros estudos realizados por nosso grupo de pesquisa que também investigava os efeitos do estresse salino, como em da-Silva et al. (2018). Apesar disso, os níveis de atividade de SOD foram menores em MT do que em MT *yg-2*. Essa tendência pode revelar maior tolerância ao estresse salino pelo genótipo parental e/ou, ainda, que as atividades das enzimas CAT e SOD foram capazes de mitigar o estresse provocado por NaCl. O padrão de resposta de SOD às ações de CAT e APX também foi observado em genótipos de tomate utilizados em cultivo: o aumento diferencial de APX e CAT resultou em redução da atividade de SOD nas plantas menos susceptíveis a estresse salino, tanto em nível de atividade enzimática quanto em nível transcricional (Gharsallah et al., 2016). O aumento induzido por NaCl das atividades de SOD e CAT protegeu tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill c.v.) do estresse oxidativo submetidos a estresse salino por um período de 10 a 27 dias (Al-aghabary et al., 2005). Em plantas mais tolerantes ao estresse, o aumento da atividade de APX foi maior do que o aumento observado na atividade de SOD em raízes em tratamento com NaCl (Al-aghabary et al.,

2005), como ocorreu nos resultados observados no presente estudo em MT. No entanto, a atividade de APX torna-se relevante quando as concentrações de H₂O₂ são relativamente baixas (Islam et al., 2015; da-Silva et al., 2017). Essa relação explica o declínio da atividade de APX e aumento da atividade de CAT em tratamentos com maior concentração de NaCl em MT. No outro genótipo, a atividade de CAT e de APX aumentam no tratamento de maior concentração salina, indicando que ambas as enzimas são importantes para contenção da superprodução de H₂O₂ em plantas de MT yg-2 sob estresse salino. Essa observação também foi feita em um experimento realizado com dois genótipos de feijoeiro, no qual o genótipo que apresentava maior sensibilidade a NaCl também apresentou aumento da atividade de APX e CAT nas maiores concentrações de sal (Taïbi et al., 2016). Tomateiros (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Zhongzha105) submetidos a concentrações diferentes de NaCl (0, 50 e 100 mM) tiveram aumento na atividade de SOD e CAT a partir de 50 mM e um aumento da atividade das duas enzimas ocorreu também na maior concentração de sal. A atividade de APX também aumentou de acordo com o aumento do estresse, mas não foi suficiente para controle e proteção contra os efeitos deletérios de ROS, uma vez que houve aumento de níveis de oxidação de membrana (Latef e Chaoxing, 2011).

A atividade antioxidante das enzimas SOD, APX e CAT varia relativamente de espécie para espécie. Em arroz submetido a estresse durante 10, 15 ou 20 dias, a atividade de SOD apresentou grande variabilidade, mas enquanto sua atividade aumentava, os níveis de O₂⁻ permaneciam baixos. Já APX apresentou aumento da atividade somente em 20 dias e CAT aumentou continuamente sua atividade em todos os tempos de estresse. No entanto, a elevação da atividade de APX acompanhou SOD, e tanto CAT quanto SOD conseguiram desintoxicar as células que apresentavam grande

quantidade de H₂O₂ (Rossato et al., 2017). Plantas de tabaco de 30 dias de idade submetidas a concentrações crescentes de NaCl (0, 300 e 600 mM) apresentaram aumento das atividades de CAT e SOD, enquanto APX apresentou maior atividade em concentrações intermediárias. Os níveis de H₂O₂ excederam o valor de K_M para o substrato de APX, fazendo com que a atividade de APX permanecesse inalterada. Já a elevação das atividades de SOD e CAT em maior concentração de sal mostra que elas contribuem efetivamente para o controle de ROS nas células (da-Silva et al., 2017).

Diferenças na quantidade de pigmentos cloroplastídicos, especialmente carotenoides, também poderiam explicar a tolerância diferencial ao estresse salino dos genótipos estudados. O genótipo MT *yg-2* é defeitivo em HO. A HO é importante na formação de fitocromos (*phy*) e sabe-se que fitocromos atuam no controle da diferenciação de etioplastos a cloroplastos estimulando a biossíntese de clorofilas (Kharshiing e Sinha, 2016). Os *phy* compõem uma família de cromoproteínas fotorreceptoras que apresentam o papel essencial na fotomorfogênese em vegetais (Smith, 2000). Mutantes fotomorfogênicos já foram isolados em muitas espécies de plantas que podem inibir as vias de síntese ou formar apoproteínas não funcionais (Devlin et al., 1998, 1999). As plantas deficientes em HO-1 se enquadram no segundo caso (Muramoto et al., 1999), uma vez que a suplementação de mutantes de *Nicotiana plumbaginifolia partly-etiolated-in-white-light (pew)-1* e *Arabidopsis long hypocotyl (hy)-1* com BV resgatou o fenótipo ao de plantas não mutadas (Parks e Quail, 1991; Kraepiel et al., 1994). Ervilha *phychromophore-deficient (pcd)-1*, tomate *yellow-green-2 (yg-2)* e arroz *photoperiodic sensitive (se)-5* não conseguem converter o grupo heme em BV, mas conseguem converter BV em PΦB (Terry e Kendrick, 1996; Weller et al., 1996). De acordo com o esperado, o conteúdo de clorofilas foi menor no genótipo MT

yg-2, que apresentou maior teor de carotenoides do que MT, resposta também observada em canola por Zhu et al. (2017). Apesar disso, é possível perceber que plântulas de todos estes mutantes apresentam sensibilidade à luz na faixa do vermelho/vermelho extremo (Koorneef et al., 1985). Ao longo do desenvolvimento, os sintomas das plantas deficientes em HO-1 reduzem, sugerindo que outras vias de produção de phy (incluindo outras isoformas de HOs) assumem esse papel (Terry e Kendrick, 1999). A sobreposição de funções entre HOs foi observada nos experimentos realizados neste trabalho e pode ser a explicação para os resultados que mostraram uma atividade basal de HO em raízes e folhas do genótipo MT yg-2. Assim como em Zilli et al. (2014), o protocolo de extração de HO possibilita a extração de todas as isoformas da enzima presentes na célula. Deve-se considerar, portanto, que os resultados obtidos na análise de atividade de HO certamente se referem a isoformas de HO outras que HO-1.

Esta sobreposição de funções entre as isoformas também pode explicar a produção de CO, quantificada através de fluoróforo específico, que mostra a produção cinco vezes maior deste gasotransmissor já no início do tratamento com NaCl do que a concentração basal em MT yg-2. O aumento do tempo de exposição ao estresse salino influenciou positivamente na produção de CO em ambos os genótipos. Além da sobreposição de funções de HOs, é provável que a produção de CO também decorra de outras fontes enzimáticas Zilli et al. (2014). A ação antioxidante de HOs e dos seus produtos da reação é bem conhecida em diversos tipos de estresse abiótico: agem na inibição da formação de H₂O₂. Foi demonstrado que, em tomates, o tratamento das plantas com H₂O₂ induziu a síntese e atividade de HO. Tendo esse substrato em comum, é possível que HOs atuem em sobreposição com outras enzimas do sistema antioxidante para mitigação do estresse provocado por NaCl em tomates, como proposto por Cao et

al., 2014. Assim como essas outras enzimas, a atuação de HO é limitada à intensidade do estresse e sua atividade decresce nos tratamentos de maior concentração de NaCl em folhas de ambos os genótipos e em raiz de MT yg-2. Esse padrão foi encontrado também em plantas de soja submetidas a estresse por UV: em maior intensidade luminosa, a atividade da enzima HO reduziu em relação ao tratamento intermediário e ficou estatisticamente igual à atividade registrada no tratamento controle (Santa-Cruz et al., 2017).

Em relação à maior atividade de HO em folhas ter sido encontrada no genótipo mutante, é possível que a parte aérea de MT yg-2 apresente maior susceptibilidade ao estresse do que MT por estar mais sujeita às consequências desvantajosas pela quantidade reduzida de phy funcionais. A raiz, por outro lado, é indiretamente influenciada pelos phy, pois também depende de hormônios produzidos na parte aérea e, portanto, são menos afetadas pela diminuição de phy funcionais (Salisbury et al., 2007).

Os dados de quantificação de NO e H₂S demonstraram que as folhas de MT yg-2 não apresentam resposta ao estresse salino mediada por estes gasotransmissores após imposição de estresse. Já as raízes deste genótipo apresentam alteração na produção de NO, mas não de H₂S. Pesquisas anteriores de nosso grupo (da-Silva et al., 2018) demonstraram que a produção de NO estimula a síntese de H₂S em raízes de tomateiros submetidos a estresse salino já nas primeiras horas de estresse em MT e esses níveis permanecem altos mesmo após 48 h de tratamento com NaCl. Assim, o aumento da concentração de NO nas raízes de MT yg-2 após 48 h pode ser uma resposta tardia do vegetal ao tratamento com NaCl ou resquícios de resposta anterior desencadeada no início da imposição do estresse. De fato, utilizando fluoróforos específicos nota-se que a produção de NO se inicia já nos primeiros momentos do estresse em MT yg-2 e

aumenta durante as primeiras 6 h de estresse salino. A produção de H₂S neste mesmo genótipo, por sua vez, apresenta comportamento contrário, decrescendo à medida que o tempo de exposição ao estresse aumenta. Assim, os resultados indicam que a quantificação de H₂S e NO realizadas no analisador de radicais livres mostram o final da resposta ao estresse salino em MT yg-2. Como o esperado, é possível inferir que esse genótipo responde mais rapidamente a estresse salino do que MT, uma vez que o nível de estresse oxidativo basal é mais alto devido a sua incapacidade de produzir maior concentração de phy funcionais. As medidas realizadas no analisador de radicais livres revelaram ainda a influência do liberador de CO (CORM-2) no aumento da concentração de NO em folhas e raízes. Por outro lado, o aumento de H₂S causado pela adição de CORM-2 ficou restrito a raiz, sugerindo que a produção endógena de CO e sua localização celular determinam onde será produzido H₂S.

6. Conclusão

Os gasotransmissores NO, CO e H₂S participam da resposta das plantas de tomate dos genótipos MT e MT yg-2 ao estresse oxidativo causado por NaCl 100 mM. MT yg-2 apresentou maior sensibilidade ao estresse salino. Surpreendentemente, apesar de apresentar mutações que comprometem a biossíntese de HO-1, as plantas deste genótipo exibiram atividade aumentada de HO dependente da concentração salina e, ainda, produziram CO como resposta ao estresse. A relação entre os três gases em resposta a estresse abiótico ainda carece de maior elucidação, mas a presente dissertação traz luz sobre a inter-relação entre os gasotransmissores e produção de CO que, possivelmente, é independente de HO-1 em tomate. Ainda, a limitação de plantas MT yg-2 em acumular H₂S na presença de liberador de CO pode explicar, em parte, a menor

tolerância desse genótipo ao estresse salino, em comparação ao genótipo parental MT. Assim, os dados obtidos nos experimentos apresentados neste estudo trazem luz sobre a sobreposição de funções entre isoformas de HO, ao passo que os resultados abrem um caminho para investigação do efeito do estresse em outras fases de vida do vegetal, até investigar a produtividade dos tomateiros e a qualidade dos tomates produzidos em condições de estresse salino.

7. Referências Bibliográficas

Abbas, A., Khan, S., Hussain, N., Hanjra, M. A., & Akbar, S. (2013). Characterizing soil salinity in irrigated agriculture using a remote sensing approach. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 55, 43-52.

Ahmad, P., Abdel Latef, A. A., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., Gucel, S., & Tran, L. S. P. (2016). Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea. *Frontiers in Plant Science*, 7, 347.

Al-aghabary, K., Zhu, Z., & Shi, Q. (2005). Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. *Journal of Plant Nutrition*, 27(12), 2101-2115.

Amooaghaie, R., Tabatabaei, F. and Ahadi, A.M., (2015). Role of hematin and sodium nitroprusside in regulating Brassica nigra seed germination under nanosilver and silver nitrate stresses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, pp.259-270.

Anbar, M. (1995). Nitric oxide: a synchronizing chemical messenger. *Experientia*, 51(6), 545-550.

Balestrasse, K. B., Noriega, G. O., Batlle, A., & Tomaro, M. L. (2005). Involvement of heme oxygenase as antioxidant defense in soybean nodules. *Free Radical Research*, 39(2), 145-151.

Balestrasse, K. B., Noriega, G. O., Batlle, A., & Tomaro, M. L. (2006). Heme oxygenase activity and oxidative stress signaling in soybean leaves. *Plant Science*, 170(2), 339-346.

Balestrasse, K. B., Yannarelli, G. G., Noriega, G. O., Batlle, A., & Tomaro, M. L. (2008). Heme oxygenase and catalase gene expression in nodules and roots of soybean plants subjected to cadmium stress. *Biometals*, 21(4), 433-441.

Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271(5), C1424-C1437.

Blackstone, E., Morrison, M., & Roth, M. B. (2005). H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science*, 308(5721), 518-518.

Boczkowski, J., Poderoso, J. J., & Motterlini, R. (2006). CO-metal interaction: vital signaling from a lethal gas. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(11), 614-621.

- Bonifacio, A., Martins, M. O., Ribeiro, C. W., Fontenele, A. V., Carvalho, F. E., MARGIS-PINHEIRO, M. Á. R. C. I. A., & Silveira, J. A. (2011). Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 34(10), 1705-1722.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Buwalda, F., Stulen, I., De Kok, L. J., & Kuiper, P. J. C. (1990). Cysteine, γ -glutamyl-cysteine and glutathione contents of spinach leaves as affected by darkness and application of excess sulfur. II. Glutathione accumulation in detached leaves exposed to H₂S in the absence of light is stimulated by the supply of glycine to the petiole. *Physiologia Plantarum*, 80(2), 196-204.
- Calderwood, A., & Kopriva, S. (2014). Hydrogen sulfide in plants: from dissipation of excess sulfur to signaling molecule. *Nitric Oxide*, 41, 72-78.
- Cao, Z., Fang, T., Chen, M., Li, J., Shen, W., & Huang, L. (2014). Involvement of haem oxygenase-1 in hydrogen peroxide-induced lateral root formation in tomato. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(4), 931-943.
- Carvalho, R. F., Campos, M. L., Pino, L. E., Crestana, S. L., Zsögön, A., Lima, J. E., ... & Peres, L. E. (2011). Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*, 7(1), 18.
- Caverzan, A., Casassola, A., & Brammer, S. P. (2016). Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genetics and Molecular Biology*, 39(1), 1-6.
- Chen J, Shiyab S, Han FX, Monts DL, Waggoner CA, Yang Z, Su Y. (2009) Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Pterisávitata* and *Nephrolepisáexaltata*. *Ecotoxicology*. Jan 1;18(1):110.
- Chen, J., Wang, W. H., Wu, F. H., You, C. Y., Liu, T. W., Dong, X. J., ... & Zheng, H. L. (2013). Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in barley seedlings. *Plant and Soil*, 362(1-2), 301-318.
- Chen, Y. H., Chao, Y. Y., Hsu, Y. Y., Hong, C. Y., & Kao, C. H. (2012). Heme oxygenase is involved in nitric oxide- and auxin-induced lateral root formation in rice. *Plant Cell Reports*, 31(6), 1085-1091.
- Christou, A., Manganaris, G. A., Papadopoulos, I., & Fotopoulos, V. (2013). Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways. *Journal of Experimental Botany*, 64(7), 1953-1966.
- Coburn, R. F., Blakemore, W. S., & Forster, R. E. (1963). Endogenous carbon monoxide production in man. *The Journal of Clinical Investigation*, 42(7), 1172-1178.
- Conrad, R., & Seiler, W. (1980). Role of microorganisms in the consumption and production of atmospheric carbon monoxide by soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(3), 437-445.
- Cooney, R. V., Harwood, P. J., Custer, L. J., and Franke, A. A. (1994). Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ. Health Perspect.* 102, 460-462.
- Cui, W., Fu, G., Wu, H., & Shen, W. (2011). Cadmium-induced heme oxygenase-1 gene expression is associated with the depletion of glutathione in the roots of *Medicago sativa*. *Biometals*, 24(1), 93-103.
- da-Silva, C. J., Fontes, E. P. B., & Modolo, L. V. (2017). Salinity-induced accumulation of endogenous H₂S and NO is associated with modulation of the antioxidant and redox defense systems in *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana. *Plant Science*, 256, 148-159.

da-Silva, C. J., Mollica, D. C., Vicente, M. H., Peres, L. E., & Modolo, L. V. (2018). NO, hydrogen sulfide does not come first during tomato response to high salinity. *Nitric Oxide*, 76, 164-173.

Davis, S. J., Bhoo, S. H., Durski, A. M., Walker, J. M., & Vierstra, R. D. (2001). The heme-oxygenase family required for phytochrome chromophore biosynthesis is necessary for proper photomorphogenesis in higher plants. *Plant Physiology*, 126(2), 656-669.

Davis, S. J., Kurepa, J., & Vierstra, R. D. (1999). The *Arabidopsis thaliana* HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6541-6546.

Dean, J. V., & Harper, J. E. (1988). The conversion of nitrite to nitrogen oxide (s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean. *Plant Physiology*, 88(2), 389-395.

Deng, Y. Q., Bao, J., Yuan, F., Liang, X., Feng, Z. T., & Wang, B. S. (2016). Exogenous hydrogen sulfide alleviates salt stress in wheat seedlings by decreasing Na⁺ content. *Plant Growth Regulation*, 79(3), 391-399.

Deumier, J. M., Leroy, P., & Peyremorte, P. (1996). Tools for improving management of irrigated agricultural crop systems. *Water Reports (FAO)*.

Devlin, P.F., Patel, S.R. and Whitelam, G.C., (1998). Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10(9), pp.1479-1487.

Devlin, P.F., Robson, P.R., Patel, S.R., Goosey, L., Sharrock, R.A. and Whitelam, G.C., (1999). Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiology*, 119(3), pp.909-916.

Duan, X., Dai, C., Li, Z., Zhou, H., Xiao, T., Xie, Y., & Shen, W. (2016). Ectopic over-expression of BoHO1, a cabbage heme oxygenase gene, improved salt tolerance in *Arabidopsis*: A case study on proteomic analysis. *Journal of Plant Physiology*, 196, 1-13.

Dulak, J., & Józkwicz, A. (2003). Carbon monoxide-a" new" gaseous modulator of gene expression. *Acta Biochimica Polonica-English Edition*-, 50(1), 31-48.

Emborg, T. J., Walker, J. M., Noh, B., & Vierstra, R. D. (2006). Multiple heme oxygenase family members contribute to the biosynthesis of the phytochrome chromophore in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 140(3), 856-868.

Epstein, E. (1972). **Analítico: Mineral nutrition of plants: principles and perspectives.**

Feng, S., Liu, D., Feng, W., & Feng, G. (2017). Allyl fluorescein ethers as promising fluorescent probes for carbon monoxide imaging in living cells. *Analytical Chemistry*, 89(6), 3754-3760.

Furchgott, R. F., & Jothianandan, D. (1991). Endothelium-dependent and-independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Journal of Vascular Research*, 28(1-3), 52-61.

Gharsallah, C., Fakhfakh, H., Grubb, D., & Gorsane, F. (2016). Effect of salt stress on ion concentration, proline content, antioxidant enzyme activities and gene expression in tomato cultivars. *AoB Plants*, 8.

Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59(2), 309-314.

Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., ... & Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327(5967), 812-818.

- Goodwin, L.R.; Francom, D.; Dieken, F. P.; Taylor, J.D.; Warenycia, M.W.; Reiffenstein, R.J.; Dowling, G. (1989). Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *J Anal Toxicol* 13:105-109.
- Guo, K., Kong, W.W. and Yang, Z.M. (2009). Carbon monoxide promotes root hair development in tomato. *Plant, Cell & Environment*, 32(8), pp.1033-1045.
- Hajiboland, R., & Joudmand, A. (2009). The K/Na replacement and function of antioxidant defence system in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B–Soil and Plant Science*, 59(3), 246-259.
- Han, Y., Zhang, J., Chen, X., Gao, Z., Xuan, W., Xu, S., ... & Shen, W. (2008). Carbon monoxide alleviates cadmium-induced oxidative damage by modulating glutathione metabolism in the roots of *Medicago sativa*. *New Phytologist*, 177(1), 155-166.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Nahar, K., Hossain, M., Mahmud, J., Hossen, M., ... & Fujita, M. (2018). Potassium: A vital regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses. *Agronomy*, 8(3), 31.
- Hayat, S., S.A. Hasan, M. Yusuf, Q. Hayat, and A. Ahmad. (2010). Effect of 28- homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. *Environ. Exp. Bot.* 69:105–112.
- He, H., & He, L. F. (2018). Regulation of gaseous signaling molecules on proline metabolism in plants. *Plant Cell Reports*, 37(3), 387-392.
- Heinze, B. C. L. B. (2002). Importância da agricultura irrigada para o desenvolvimento da Região Nordeste do Brasil. *Monografia apresentada ao curso MBA em Gestão Sustentável da Agricultura Irrigada da Ecobusiness School/FGV. Brasília.*
- Hiscox, J. D. & Israelstam, G. F. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal Of Botany*, 57(12), 1332-1334.
- Horta, L. P., Braga, M. R., Lemos-Filho, J. P., & Modolo, L. V. (2014). Organ-coordinated response of early post-germination mahogany seedlings to drought. *Tree Physiology*, 34(4), 355-366.
- Ignarro, L. J. (1990). Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacology & Toxicology*, 67(1), 1-7.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. (2018). Global Warming of 1.5° C: An IPCC Special Report on the Impacts of Global Warming of 1.5° C Above Pre-industrial Levels and Related Global Greenhouse Gas Emission Pathways, in the Context of Strengthening the Global Response to the Threat of Climate Change, Sustainable Development, and Efforts to Eradicate Poverty. *Intergovernmental Panel on Climate Change.*
- Islam, F., Yasmeen, T., Ali, S., Ali, B., Farooq, M. A., & Gill, R. A. (2015). Priming-induced antioxidative responses in two wheat cultivars under saline stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(8), 153.
- Ivushkin, K., Bartholomeus, H., Bregt, A. K., Pulatov, A., Bui, E. N., & Wilford, J. (2018). Soil salinity assessment through satellite thermography for different irrigated and rainfed crops. *International journal of applied earth observation and geoinformation*, 68, 230-237.
- Jin Z, Shen J, Qiao Z, Yang G, Wang R, Pei Y (2011) Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Co* 414: 481–486

- Jin Z, Xue S, Luo Y, Tian B, Fang H, Li H, Pei Y (2013) Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 62: 41–46
- Katerji, N., Van Hoorn, J. W., Hamdy, A., & Mastrorilli, M. (2004). Comparison of corn yield response to plant water stress caused by salinity and by drought. *Agricultural Water Management*, 65(2), 95-101.
- Keyster, M., Klein, A., & Ludidi, N. (2012). Caspase-like enzymatic activity and the ascorbate-glutathione cycle participate in salt stress tolerance of maize conferred by exogenously applied nitric oxide. *Plant Signaling & Behavior*, 7(3), 349-360.
- Kharshiing, E., & Sinha, S. P. (2016). Deficiency in phytochrome A alters photosynthetic activity, leaf starch metabolism and shoot biomass production in tomato. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 165, 157-162.
- Klepper, L. A. (1990). Comparison between NO_x evolution mechanisms of wild-type and nr1 mutant soybean leaves. *Plant Physiology*. 93, 26–32.
- Koorneef, M., Elgersma, A., Hanhart, C. V., van Loenen-Martinet, E. P., Van Rijn, L., & Zeevaart, J. A. D. (1985). A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 65(1), 33-39.
- Kraepiel, Y., Rousselin, P., Sotta, B., Kerhoas, L., Einhorn, J., Caboche, M., & Miginiac, E. (1994). Analysis of phytochrome-and ABA-deficient mutants suggests that ABA degradation is controlled by light in *Nicotiana plumbaginifolia*. *The Plant Journal*, 6(5), 665-672.
- Lamattina, L., & García-Mata, C. (Eds.). (2016). Gasotransmitters in Plants: The Rise of a New Paradigm in Cell Signaling. In *Gasotransmitters in Plants*. Springer, Cham.
- Lascaratos, J. G., & Marketos, S. G. (1998). The carbon monoxide poisoning of two Byzantine emperors. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 36(1-2), 103-107.
- Latif, A. A. H. A., & Chaoxing, H. (2011). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae*, 127(3), 228-233.
- Lazof, D. B., & Bernstein, N. (1998). The NaCl induced inhibition of shoot growth: the case for disturbed nutrition with special consideration of calcium. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 29, pp. 113-189). Academic Press.
- Li, L., & Moore, P. K. (2008). Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air? *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(2), 84-90.
- Li, L., Hsu, A., & Moore, P. K. (2009). Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation—a tale of three gases! *Pharmacology & therapeutics*, 123(3), 386-400.
- Li, L., Wang, Y., & Shen, W. (2012). Roles of hydrogen sulfide and nitric oxide in the alleviation of cadmium-induced oxidative damage in alfalfa seedling roots. *Biomaterials*, 25(3), 617-631.
- Li, Z. G. (2015). Analysis of some enzymes activities of hydrogen sulfide metabolism in plants. In *Methods in Enzymology* (Vol. 555, pp. 253-269). Academic Press.
- Li, Z. G., & Gu, S. P. (2016). Hydrogen sulfide as a signal molecule in hematin-induced heat tolerance of tobacco cell suspension. *Biologia Plantarum*, 60(3), 595-600.
- Liang, X., Su, D., Yin, S., & Wang, Z. (2009). Leaf water absorption and desorption functions for three turfgrasses. *Journal of Hydrology*, 376(1-2), 243-248.

- Lin, Q., Weis, S., Yang, G., Weng, Y. H., Helston, R., Rish, K., ... & Dennery, P. A. (2007). Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 282(28), 20621-20633.
- Lin, Y. T., Li, M. Y., Cui, W. T., Lu, W., & Shen, W. B. (2012). Haem oxygenase-1 is involved in hydrogen sulfide-induced cucumber adventitious root formation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(4), 519-528.
- Lin, Y., Chen, A., Yan, S., Rafay, L., Du, K., Wang, D., ... & Li, J. (2019). Available soil nutrients and water content affect leaf nutrient concentrations and stoichiometry at different ages of *Leucaena leucocephala* forests in dry-hot valley. *Journal of Soils and Sediments*, 19(2), 511-521.
- Lin, Y., Zhang, W., Qi, F., Cui, W., Xie, Y., & Shen, W. (2014). Hydrogen-rich water regulates cucumber adventitious root development in a heme oxygenase-1/carbon monoxide-dependent manner. *Journal of Plant Physiology*, 171(2), 1-8.
- Ling, T., Zhang, B., Cui, W., Wu, M., Lin, J., Zhou, W., ... & Shen, W. (2009). Carbon monoxide mitigates salt-induced inhibition of root growth and suppresses programmed cell death in wheat primary roots by inhibiting superoxide anion overproduction. *Plant Science*, 177(4), 331-340.
- Linley, P. J., Landsberger, M., Kohchi, T., Cooper, J. B., & Terry, M. J. (2006). The molecular basis of heme oxygenase deficiency in the pcd1 mutant of pea. *The FEBS Journal*, 273(12), 2594-2606.
- Liu, K., Xu, S., Xuan, W., Ling, T., Cao, Z., Huang, B., Sun, Y., Fang, L., Liu, Z., Zhao, N. and Shen, W. (2007). Carbon monoxide counteracts the inhibition of seed germination and alleviates oxidative damage caused by salt stress in *Oryza sativa*. *Plant Science*, 172(3), pp.544-555.
- Liu, Y., Xu, S., Ling, T., Xu, L. and Shen, W. (2010). Heme oxygenase/carbon monoxide system participates in regulating wheat seed germination under osmotic stress involving the nitric oxide pathway. *Journal of Plant Physiology*, 167(16), pp.1371-1379.
- Luo, Z., Li, D., Du, R., & Mou, W. (2015). Hydrogen sulfide alleviates chilling injury of banana fruit by enhanced antioxidant system and proline content. *Scientia Horticulturae*, 183, 144-151.
- Martí, E., Gisbert, C., Bishop, G. J., Dixon, M. S., & García-Martínez, J. L. (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany*, 57(9), 2037-2047.
- Meloni, D. A., Oliva, M. A., Martinez, C. A., & Cambraia, J. (2003). Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 49(1), 69-76.
- Morgan, J. M. (1984). Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 299-319.
- Mostofa, M. G., Hossain, M. A., & Fujita, M. (2015). Trehalose pretreatment induces salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings: oxidative damage and co-induction of antioxidant defense and glyoxalase systems. *Protoplasma*, 252(2), 461-475.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Muramoto, T., Kohchi, T., Yokota, A., Hwang, I., & Goodman, H. M. (1999). The *Arabidopsis* photomorphogenic mutant hyl is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase. *The Plant Cell*, 11(3), 335-347.
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880.

- Nakayama, M., Akashi, T., & Hase, T. (2000). Plant sulfite reductase: molecular structure, catalytic function and interaction with ferredoxin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 82(1-4), 27-32.
- Noriega GO, Yannarelli GG, Balestrasse KB, Batlle A, Tomaro ML. (2007) The effect of nitric oxide on heme oxygenase gene expression in soybean leaves. *Planta*. Oct 1;226(5):1155-63.
- Noriega, G. O., Balestrasse, K. B., Batlle, A., & Tomaro, M. L. (2004). Heme oxygenase exerts a protective role against oxidative stress in soybean leaves. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323(3), 1003-1008.
- Omar, S. A., Webb, A. J., Lundberg, J. O., & Weitzberg, E. (2016). Therapeutic effects of inorganic nitrate and nitrite in cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of internal medicine*, 279(4), 315-336.
- Parks, B. M., & Quail, P. H. (1991). Phytochrome-deficient hy1 and hy2 long hypocotyl mutants of *Arabidopsis* are defective in phytochrome chromophore biosynthesis. *The Plant Cell*, 3(11), 1177-1186.
- Riemenschneider, A., Wegele, R., Schmidt, A., & Papenbrock, J. (2005). Isolation and characterization of a D-cysteine desulphydrase protein from *Arabidopsis thaliana*. *The FEBS journal*, 272(5), 1291-1304.
- Rossatto, T., do Amaral, M. N., Benitez, L. C., Vighi, I. L., Braga, E. J. B., de Magalhaes Júnior, A. M., ... & da Silva Pinto, L. (2017). Gene expression and activity of antioxidant enzymes in rice plants, cv. BRS AG, under saline stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(4), 865-875.
- Rozema, J., & Flowers, T. (2008). Crops for a salinized world. *Science*, 1478-1480.
- Saito, T., & Matsukura, C. (2015). Effect of salt stress on the growth and fruit quality of tomato plants. In *Abiotic Stress Biology in Horticultural Plants* (pp. 3-16). Springer, Tokyo.
- Salisbury, F. J., Hall, A., Grierson, C. S., & Halliday, K. J. (2007). Phytochrome coordinates *Arabidopsis* shoot and root development. *The Plant Journal*, 50(3), 429-438.
- Santa-Cruz D, Pacienza N, Zilli C, Pagano E, Balestrasse K, Yannarelli G. (2017) Heme oxygenase up-regulation under ultraviolet-B radiation is not epigenetically restricted and involves specific stress-related transcriptions factors. *Redox Biology*. Aug 1;12:549-57.
- Santa-Cruz, D. M., Pacienza, N. A., Polizio, A. H., Balestrasse, K. B., Tomaro, M. L., & Yannarelli, G. G. (2010). Nitric oxide synthase-like dependent NO production enhances heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B-irradiated soybean plants. *Phytochemistry*, 71(14-15), 1700-1707.
- Santos, H. G. dos, Jacomine, P. K. T., Anjos, L. H. C. dos, Oliveira, V. A. de, Lumberras, J. F., Coelho, M. R., Almeida, J. A. de, Oliveira, J. B. de, Cunha, T. J. F. (2018). *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Brasília, DF: Embrapa, 2018.
- Shafi, A., Chauhan, R., Gill, T., Swarnkar, M. K., Sreenivasulu, Y., Kumar, S., ... & Singh, A. K. (2015). Expression of SOD and APX genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in *Arabidopsis* under salt stress. *Plant Molecular Biology*, 87(6), 615-631.
- Shan, C., Liu, H., Zhao, L., & Wang, X. (2014). Effects of exogenous hydrogen sulfide on the redox states of ascorbate and glutathione in maize leaves under salt stress. *Biologia Plantarum*, 58(1), 169-173.
- She, X.P. and Song, X.G. (2008). Carbon monoxide-induced stomatal closure involves generation of hydrogen peroxide in *Vicia faba* guard cells. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(12), pp.1539-1548.
- Shekhawat, G. S., & Verma, K. (2010). Haem oxygenase (HO): an overlooked enzyme of plant metabolism and defence. *Journal of Experimental Botany*, 61(9), 2255-2270.

- Shi, H., Ye, T., Han, N., Bian, H., Liu, X., & Chan, Z. (2015). Hydrogen sulfide regulates abiotic stress tolerance and biotic stress resistance in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57(7), 628-640.
- Silvertooth, J. C. (2001). Saline and Sodic Soil Identification and Management for Cotton. *repository.arizona.edu*.
- Singh, S. P., Bellner, L., Vanella, L., Cao, J., Falck, J. R., Kappas, A., & Abraham, N. G. (2016). Downregulation of PGC-1 α prevents the beneficial effect of EET-heme oxygenase-1 on mitochondrial integrity and associated metabolic function in obese mice. *Journal of Nutrition And Metabolism*, 2016.
- Smith, H. (2000). Phytochromes and light signal perception by plants—an emerging synthesis. *Nature*, 407(6804), 585.
- Song, X.G., She, X.P. and Zhang, B. (2008). Carbon monoxide-induced stomatal closure in *Vicia faba* is dependent on nitric oxide synthesis. *Physiologia Plantarum*, 132(4), pp.514-525.
- Squires, V. R., & Glenn, E. P. (2011). Salination, desertification, and soil erosion. *The Role of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries in Human Nutrition*, 3, 102-123.
- Squires, V. R., & Glenn, E. P. (2011). Salination, desertification and soil erosion. *The Role of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries in Human Nutrition*, 3, 102-123.
- Stöhr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W. R., & Rockel, P. (2001). A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta*, 212(5-6), 835-841.
- Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J., & Suprakash, R. (2014). Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Res J Chem Sci*, 2231, 606X.
- Szabó, C. (2007). Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(11), 917.
- Taïbi, K., Taïbi, F., Abderrahim, L. A., Ennajah, A., Belkhodja, M., & Mulet, J. M. (2016). Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. *South African Journal of Botany*, 105, 306-312.
- Tenhunen, R., Marver, H. S., & Schmid, R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61(2), 748-755.
- Terry, M. J., & Kendrick, R. E. (1996). The *aurea* and *yellow-green-2* mutants of tomato are deficient in phytochrome chromophore synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 271(35), 21681-21686.
- Terry, M. J., & Kendrick, R. E. (1999). Feedback Inhibition of Chlorophyll Synthesis in the Phytochrome Chromophore-Deficient *aurea* and *yellow-green-2* Mutants of Tomato. *Plant Physiology*, 119(1), 143-152.
- Tian, X., He, M., Wang, Z., Zhang, J., Song, Y., He, Z., & Dong, Y. (2015). Application of nitric oxide and calcium nitrate enhances tolerance of wheat seedlings to salt stress. *Plant Growth Regulation*, 77(3), 343-356.
- Tichá, T., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2016). Functions and Metabolism of S-Nitrosothiols and S-Nitrosylation of Proteins in Plants: The Role of GSNOR. In *Gasotransmitters in Plants* (pp. 175-200). Springer, Cham.
- Troxler, R. F., & Dokos, J. M. (1973). Formation of carbon monoxide and bile pigment in red and blue-green algae. *Plant Physiology*, 51(1), 72-75.

- Urarte, E., Esteban, R., Moran, J. F., & Bittner, F. (2015). Established and proposed roles of xanthine oxidoreductase in oxidative and reductive pathways in plants. In *Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants* (pp. 15-42). Springer, Cham.
- Wang R. (2002). Two's company, three's a crowd: Can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB Journal* 16: 1792–1798.
- Wang, F. Q., Yang, J., Dai, C., Wu, M. Z., Zhang, Y. H., & Shen, W. B. (2017). Characterization of the *Arabidopsis thaliana* heme oxygenase-1 promoter in response to salinity, iron deficiency, and mercury exposure. *Biologia Plantarum*, 61(1), 35-47.
- Wang, J., Lu, S., Moëne-Loccoz, P., & de Montellano, P. R. O. (2003). Interaction of nitric oxide with human heme oxygenase-1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2341-2347.
- Wang, R. (2014). Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(5), 227-232.
- Wang, X., Yang, J., Liu, G., Yao, R., & Yu, S. (2015). Impact of irrigation volume and water salinity on winter wheat productivity and soil salinity distribution. *Agricultural Water Management*, 149, 44-54.
- Wang, Y., Li, L., Cui, W., Xu, S., Shen, W., & Wang, R. (2012). Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant and Soil*, 351(1-2), 107-119.
- Warenycia MW, Goodwin LR, Benishin CG, Reiffenstein RJ, Francom DM, Taylor JD, Dieken FP (1989) Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochem Pharmacol* 38: 973–981.
- Weaver, L. K. (2009). Carbon monoxide poisoning. *New England Journal of Medicine*, 360(12), 1217-1225.
- Weitzberg, E., & Lundberg, J. O. N. (1998). Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric oxide*, 2(1), 1-7.
- Weller, J. L., Terry, M. J., Rameau, C., Reid, J. B., & Kendrick, R. E. (1996). The Phytochrome-Deficient *pcd1* Mutant of Pea Is Unable to Convert Heme to Biliverdin IX [alpha]. *The Plant Cell*, 8(1), 55-67.
- Wilks, S. S. (1959). Carbon monoxide in green plants. *Science*, 129(3354), 964-966.
- Wirtz, M., & Hell, R. (2006). Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties. *Journal of Plant Physiology*, 163(3), 273-286.
- Wu, C. L., Huang, A. C., Yang, J. S., Liao, C. L., Lu, H. F., Chou, S. T., ... & Chung, J. G. (2011). Benzyl isothiocyanate (BITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC)-mediated generation of reactive oxygen species causes cell cycle arrest and induces apoptosis via activation of caspase-3, mitochondria dysfunction and nitric oxide (NO) in human osteogenic sarcoma U-2 OS cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 29(8), 1199-1209.
- Wu, M., Huang, J., Xu, S., Ling, T., Xie, Y., & Shen, W. (2010). Haem oxygenase delays programmed cell death in wheat aleurone layers by modulation of hydrogen peroxide metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 235-248.
- Wu, M., Wang, F., Zhang, C., Xie, Y., Han, B., Huang, J., & Shen, W. (2013). Heme oxygenase-1 is involved in nitric oxide-and cGMP-induced α -Amy2/54 gene expression in GA-treated wheat aleurone layers. *Plant Molecular Biology*, 81(1-2), 27-40.

- Xie, Y. J., Xu, S., Han, B., Wu, M. Z., Yuan, X. X., Han, Y., ... & Shen, W. B. (2011). Evidence of *Arabidopsis* salt acclimation induced by up-regulation of HY1 and the regulatory role of RbohD-derived reactive oxygen species synthesis. *The Plant Journal*, 66(2), 280-292.
- Xie, Y., Ling, T., Han, Y., Liu, K., Zheng, Q., Huang, L., ... & Shen, Z. (2008). Carbon monoxide enhances salt tolerance by nitric oxide-mediated maintenance of ion homeostasis and up-regulation of antioxidant defence in wheat seedling roots. *Plant, Cell & Environment*, 31(12), 1864-1881.
- Xie, Y., Mao, Y., Lai, D., Zhang, W., Zheng, T., & Shen, W. (2013). Roles of NIA/NR/NOA1-dependent nitric oxide production and HY1 expression in the modulation of *Arabidopsis* salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 64(10), 3045-3060.
- Xie, Y., Zhang, C., Lai, D., Sun, Y., Samma, M. K., Zhang, J., & Shen, W. (2014). Hydrogen sulfide delays GA-triggered programmed cell death in wheat aleurone layers by the modulation of glutathione homeostasis and heme oxygenase-1 expression. *Journal of Plant Physiology*, 171(2), 53-62.
- Xu S, Hu B, He Z, Ma F, Feng J, Shen W, Yang J. (2011) Enhancement of salinity tolerance during rice seed germination by presoaking with hemoglobin. *International Journal of Molecular Sciences*. Apr 12;12(4):2488-501.
- Xuan, W., Xu, S., Li, M., Han, B., Zhang, B., Zhang, J., ... & Cui, J. (2012). Nitric oxide is involved in hemin-induced cucumber adventitious rooting process. *Journal of Plant Physiology*, 169(11), 1032-1039.
- Xuan, W., Zhu, F. Y., Xu, S., Huang, B. K., Ling, T. F., Qi, J. Y., ... & Shen, W. B. (2008). The heme oxygenase/carbon monoxide system is involved in the auxin-induced cucumber adventitious rooting process. *Plant Physiology*, 148(2), 881-893.
- Yadav, R. K., Perales, M., Gruel, J., Girke, T., Jönsson, H., & Reddy, G. V. (2011). WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Genes & Development*, 25(19), 2025-2030.
- Yang, G., Sun, X., & Wang, R. (2004). Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *The FASEB Journal*, 18(14), 1782-1784.
- Yang, L., Ji, J., Wang, H., Harris-Shultz, K. R., Abd_Allah, E. F., Luo, Y., ... & Hu, X. (2016). Carbon monoxide interacts with auxin and nitric oxide to cope with iron deficiency in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 112.
- Yang, W., Yang, G., Jia, X., Wu, L., & Wang, R. (2005). Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *The Journal of Physiology*, 569(2), 519-531.
- Yannarelli, G. G., Noriega, G. O., Battle, A., & Tomaro, M. L. (2006). Heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B irradiated soybean plants involves reactive oxygen species. *Planta*, 224(5), 1154-1162.
- Zhang, C., Li, Y., Yuan, F., Hu, S., & He, P. (2012). Effects of hematin and carbon monoxide on the salinity stress responses of *Cassia obtusifolia* L. seeds and seedlings. *Plant and soil*, 359(1-2), 85-105.
- Zhang, J., Yang, X., Ren, Y., Yang, B., Liu, Z., You, B., ... & Chen, X. (2017). β -Cyclodextrin-hemin enhances tolerance against salinity in tobacco seedlings by reestablishment of ion and redox homeostasis. *Plant Growth Regulation*, 81(3), 533-542.
- Zhang, T., Amrani, A., Ellis, G. S., Ma, Q., & Tang, Y. (2008). Experimental investigation on thermochemical sulfate reduction by H₂S initiation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(14), 3518-3530.

Zhu, L., Wang, W., Shi, J., Zhang, W., Shen, Y., Du, H., & Wu, S. (2014). Hydrogen sulfide extends the postharvest life and enhances antioxidant activity of kiwifruit during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(13), 2699-2704.

Zhu, L., Yang, Z., Zeng, X., Gao, J., Liu, J., Yi, B., ... & Wen, J. (2017). Heme oxygenase 1 defects lead to reduced chlorophyll in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology*, *93*(6), 579-592.

Zhu, Y. Z. (2018). Production L-cysteine/CSE-CBS-MST/H of H₂S–The System. *Gasotransmitters*, *12*, 44.

Zilli, C. G., Balestrasse, K. B., Yannarelli, G. G., Polizio, A. H., Santa-Cruz, D. M., & Tomaro, M. L. (2008). Heme oxygenase up-regulation under salt stress protects nitrogen metabolism in nodules of soybean plants. *Environmental and Experimental Botany*, *64*(1), 83-89.

Zilli, C. G., Santa-Cruz, D. M., & Balestrasse, K. B. (2014). Heme oxygenase-independent endogenous production of carbon monoxide by soybean plants subjected to salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, *102*, 11-16.

Zilli, C. G., Santa-Cruz, D. M., Yannarelli, G. G., Noriega, G. O., Tomaro, M. L., & Balestrasse, K. B. (2009). Heme oxygenase contributes to alleviate salinity damage in *Glycine max* L. leaves. *International Journal of Cell Biology*, 2009.