

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**USO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM PLANTAS DE SOJA
SUBMETIDAS À SALINIDADE**

Gabriela Eugenia Ajila Celi

Engenheira Agrônoma

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**USO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM PLANTAS DE SOJA
SUBMETIDAS À SALINIDADE**

Gabriela Eugenia Ajila Celi

Orientadora: Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão

Coorientadora: Profa. Dra. Rita de Cassia Alves

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

A312u

Ajila-Celi, Gabriela Eugenia

Uso de ácido ascórbico em plantas de soja submetidas à salinidade / Gabriela Eugenia Ajila-Celi. -- Jaboticabal, 2022
61 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Priscila Lupino Gratão

Coorientadora: Rita de Cassia Alves

1. Glycine max. 2. Vitamina C. 3. Salinidade. 4. Estresse oxidativo. 5. Aplicação foliar. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: USO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM PLANTAS DE SOJA SUBMETIDAS À SALINIDADE

AUTORA: GABRIELA EUGENIA AJILA CELI
ORIENTADORA: PRISCILA LUPINO GRATÃO
COORIENTADORA: RITA DE CÁSSIA ALVES

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

Profa. Dra. PRISCILA LUPINO GRATÃO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária / FCAV UNESP Jaboticabal



Prof. Dr. RAFAEL FERREIRA BARRETO (Participação Virtual)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS / Chapadão do Sul/MS



Pós-Doutorando DILIER OLIVERA VICIEDO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP



Jaboticabal, 25 de março de 2022

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Gabriela Eugenia Ajila Celi, nasceu na cidade de Chilla, Província El Oro, Equador em 31 de março de 1989. Possui título de Técnico em Agropecuária (2007) pelo Colégio Técnico Agropecuario “Chilla”, e graduação em Engenharia Agrônômica (2014) pela Universidad Técnica de Machala (UTMACH) no Equador. Em março de 2016, começou um emprego no Ministerio de Agricultura e Ganadería do Equador, participando em projetos de extensão para o desenvolvimento produtivo de produtores de banana. Em março de 2020, ingressou no curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal), na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Câmpus de Jaboticabal, sob orientação da Prof. Dr. Priscila Lupino Gratão.

*Se quiser triunfar na vida, faça da
perseverança a sua melhor amiga; da
experiência o seu conselheiro; da
prudência, o seu irmão mais velho; e da
esperança, o seu anjo da guarda.*

Joseph Addison

Com muito amor aos meus pais Dalia e Jorge por
sempre me apoiarem em tudo que faço, eles são minha
maior inspiração, os anjos que Deus me deu.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Acredito em Deus e em seu amor infinito, ele é meu amigo incondicional nessa caminhada diária, obrigada por cuidar de mim.

Agradeço à minha família que está sempre presente em todos os meus projetos e sempre me envia vibrações positivas, para que todos os meus objetivos sejam cumpridos. Em especial aos meus pais Dalia e Jorge que sempre acreditaram no meu potencial, são meu exemplo a seguir, incutiram em mim os maiores valores, sempre me dizem para ser humilde, respeitoso por onde eu for e nunca esquecer de orar e agradecer a Deus por tudo que tenho. Obrigado papais amo vocês.

Aos meus irmãos Emily, Mario, Paul, Balky, Julio, Verónica e Pilar desde crianças compartilhamos muitas alegrias e tristezas, vocês são os que mais se alegram pelas minhas conquistas. Obrigado, eu amo a vocês.

O meu companheiro de vida Luis Felipe com seu amor e gentileza, desde o primeiro dia que tentei me candidatar para ganhar a bolsa de estudo, ele acreditou em mim e me apoiou em todos os momentos. Obrigada, meu amor.

Também quero agradecer a minha orientadora Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão pelo aprendizado e sua amizade, para a conclusão de este trabalho. De mesma forma, a minha coorientadora Profa. Dra. Rita de Cassia Alves pela ajuda e sua disposição quando eu precisei.

Agradeço a meus amigos que eu fiz durante mim estadia na Unesp e o Brasil, eles são Mariana, Kolima, Lucas, Reginaldo, Livia, Clebson, Luis, Clevi, María, Solange, Cassia, Diler, Alexander, Valeria, Ellén, José, Eduarda e muitos mais que me ajudaram, sempre os guardo em mi coração.

Agradeço aos colegas do grupo de pesquisa do laboratório de Fisiologia Vegetal, que contribuíram para meu aprendizado especialmente a Mirela, Mayara e Reginaldo. Agradeço ao Departamento de Ciências da Produção Agrícola e a todos os funcionários que me ajudaram no desenvolvimento de meus trabalhos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Importância da cultura de soja.....	3
2.2 Estresse salino	4
2.3 Estresse oxidativo	5
2.4 Sistema de defesa antioxidante.....	6
2.5 O ácido ascórbico como mitigador de estresse salino	7
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1 Materiais vegetais e condições de crescimento.....	8
3.2 Análises fisiológicas e bioquímicas.....	10
3.2.1 Quantificação da clorofila e carotenoides.....	10
3.2.2 Medições de fluorescência da clorofila e trocas gasosas	11
3.2.3 Determinação do conteúdo relativo da água e eficiência do uso da água	11
3.2.4 Determinação do acúmulo de Na ⁺ e K ⁺	12
3.2.5 Determinação da peroxidação lipídica	12
3.2.6 Extração de proteínas e determinação de enzimas antioxidantes	12
3.2.7 Antioxidantes não-enzimáticos.....	13
3.2.8 Quantificação de biomassa e área foliar	14
3.3 Análise estatística	15
4 RESULTADOS	15
4.1 Conteúdo relativo de água e eficiência do uso da água.....	15
4.2 Teor de pigmentos e fluorescência da clorofila.....	16
4.3 Parâmetros de trocas gasosas da folha.....	18
4.4 Acúmulo de Na ⁺ e K ⁺	20
4.5 Peroxidação lipídica	23
4.6 Atividade de enzimas antioxidantes.....	24
4.7 Teor de prolina e ácido ascórbico.....	26
4.8 Área foliar e produção de biomassa	28
5 DISCUSSÃO.....	30
6 CONCLUSÃO	38
7 REFERÊNCIAS	39

USO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM PLANTAS DE SOJA SUBMETIDAS À SALINIDADE

RESUMO - O ácido ascórbico (AsA) é um dos antioxidantes mais abundantes com potencial de modular uma série de funções em plantas sob condições de estresse abiótico. No entanto, pouco se sabe sobre a atenuação dos efeitos prejudiciais do estresse salino através de diferentes métodos de aplicação exógena de AsA. Assim, o efeito da aplicação de AsA: via radicular na solução nutritiva, via aplicações foliares, combinação radicular mais foliar e sem AsA foi avaliado quanto a capacidade de atenuar os efeitos adversos do estresse salino em plantas de soja. Foram conduzidos dois experimentos, com esquema fatorial 4x2, com 5 repetições, sob delineamento em blocos casualizados, cultivo hidropônico, desenvolvidos em casa de vegetação usando uma cultivar de soja tolerante (M 8372) e sensível (M-SOY 8222) à salinidade. As plantas de ambas as cultivares foram submetidas a 0 e 100 mmol L⁻¹ de NaCl e 0,85 mmol L⁻¹ e 100 mmol L⁻¹ de AsA via radicular e foliar, respectivamente. O estresse salino reduziu o teor de clorofila, carotenoides e a taxa fotossintética, e aumentou o acúmulo de Na⁺ e a peroxidação lipídica de ambas cultivares. No entanto, as aplicações de AsA via radicular e foliar combinada em M 8372 e via foliar em M-SOY 8222, atenuaram os efeitos adversos do estresse salino por aumentar a atividade antioxidante da SOD, APX e GPOX, assim como a prolina e nível endógeno de AsA, reduzindo o acúmulo de Na⁺ nos tecidos. Além disso, o AsA atenuou os danos causados no aparato fotossintético evidenciado pelo aumento do teor de pigmentos fotossintéticos e taxa fotossintética que, conseqüentemente, promoveram o crescimento das plantas. Juntos, esses resultados indicam uma nova perspectiva nos métodos de fornecimento do AsA no desenvolvimento da soja sob estresse salino.

Palavras-chave: atenuante, modos de aplicação, *Glycine max* L. Merrill, estresse salino, estresse oxidativo.

USE OF ASCORBIC ACID IN SOYBEAN PLANTS SUBMITTED TO SALINITY

ABSTRACT- Ascorbic acid (AsA) is one of the most abundant antioxidants with the potential to modulate a number of functions in plants under abiotic stress conditions. However, little is known about the attenuation of the detrimental effects of salt stress by different methods of exogenous AsA application. Thus, the effect of AsA application: via root in the nutrient solution, via foliar applications, root plus foliar combination, and without AsA was evaluated for the ability to attenuate the adverse effects of salt stress in soybean plants. Two experiments were conducted, with a 4x2 factorial scheme, with 5 repetitions, under a randomized block design, hydroponic cultivation, developed in a greenhouse using a soybean cultivar tolerant (M 8372) and sensitive (M-SOY 8222) to salinity. The plants of both cultivars were subjected to 0 and 100 mmol L⁻¹ of NaCl and 0.85 mmol L⁻¹ and 100 mmol L⁻¹ of AsA via root and foliar, respectively. Salt stress reduced chlorophyll content, carotenoids, and photosynthetic rate, and increased Na⁺ accumulation and lipid peroxidation of both cultivars. However, AsA applications via root and foliar combined in M 8372 and via foliar in M-SOY 8222, attenuated the adverse effects of salt stress by increasing the antioxidant activity of SOD, APX and GPOX, as well as proline and endogenous AsA level, reducing Na⁺ accumulation in tissues. In addition, AsA attenuated the damage caused to the photosynthetic apparatus evidenced by increased photosynthetic pigment content and photosynthetic rate, which consequently promoted plant growth. Together, these results indicate a new perspective on AsA delivery methods in soybean development under salt stress.

Keywords: attenuate, modes of application, *Glycine max* L. Merrill, salt stress, oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

A salinidade é um dos principais estresses abióticos que afeta seriamente a taxa de crescimento e a produtividade das culturas em nível global (Etesami e Beattie, 2018). O estresse salino afeta diferentes processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos das plantas, incluindo trocas gasosas e absorção de água e nutrientes (Talaat et al., 2015; Ahmad et al., 2019). O funcionamento metabólico das plantas é interrompido devido ao aumento do estresse iônico pelo acúmulo de íons sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-), e aumento do estresse osmótico que reduz a capacidade da planta de absorver água (Carillo et al., 2019; Hurtado et al., 2020). As alterações provocadas pela salinidade promovem o estresse oxidativo, que ocorre quando há um desequilíbrio nos compartimentos celulares pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o superóxido (O_2^-), hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (Nahar et al., 2015, 2017). O estresse oxidativo pode ativar a morte celular programada devido à peroxidação lipídica de membranas, oxidação de proteínas, inibição enzimática e danos ao DNA e RNA (Gratão et al., 2005).

As plantas apresentam uma variedade de mecanismos de defesa para sobreviver e se adaptar a condições desfavoráveis, como ambientes salinos. Estes incluem sistemas enzimáticos e não enzimáticos, que podem remover ou neutralizar os radicais de oxidação (Loutfy et al., 2020). O sistema de defesa enzimático inclui enzimas como: superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2) e catalase (CAT, EC 1.11.1.6); por outro lado, o não enzimático inclui compostos como: ascorbato (AAs), glutathione (GSH), flavonoides, fenólicos, tocoferol e carotenoides (Hurtado et al., 2020; Silva et al., 2020).

Diferentes estratégias para atenuar os danos causados pela salinidade tem sido relatados, mas com efeitos a longo prazo e com custos elevados (Willadino et al., 2016). Além disso, a seleção de cultivares tolerantes à salinidade tem sido uma opção muito adotada para superar o problema do estresse salino (Wu et al., 2015). Alternativamente, o uso de compostos relacionados às respostas antioxidantes das plantas apresentam um benefício potencial na agricultura e que vem sendo muito utilizado (Abdel et al., 2020).

O ácido ascórbico (AsA) fortalece o sistema antioxidante das plantas, pois, reduz com eficiência o estresse oxidativo e limita a produção de ERO geradas em resposta à salinidade (Zhang et al., 2019; Farooq et al., 2020). O AsA é representado por sua forma fisiologicamente ativa nas plantas, que é o ascorbato (Akram et al., 2017). A natureza regenerativa e a alta solubilidade em água, faz com que o AsA seja uma das moléculas antioxidantes mais poderosas nos sistemas biológicos (Farouk, 2011; Farooq et al., 2020). Além disso, o AsA através do ascorbato poderia atuar como um sinalizador de respostas na percepção de estresse abiótico (Akram et al., 2017).

Diferentes pesquisas indicam que um dos papéis mais eficientes do AsA, quando aplicado exogenamente, é proteger proteínas e lipídios contra o metabolismo oxidativo induzido pela salinidade (Wang et al., 2019; Naz et al., 2016). O AsA é um antioxidante capaz de promover a atividade de antioxidantes enzimáticos nas plantas. O aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como SOD, POD, CAT, APX, com aplicação foliar de AsA foi relatado em plantas de milho (Billah et al., 2017), arroz (Alhasnawi et al., 2016), cevada (Agami, 2014), trigo (Elnaz Ebrahimian, 2012) e tomate (Alves et al., 2021), crescendo sob estresse salino. Estudos recentes indicam que o AsA pode regular a síntese de solutos compatíveis como a prolina e α -tocoferol, minimizando a peroxidação lipídica e aliviando a toxicidade por NaCl (Noreen et al., 2020; Wang et al., 2019; El-Afry et al., 2018). Além disso, destacam-se os efeitos do AsA no crescimento das plantas, pela melhoria da taxa fotossintética, atividade do fotossistema, transpiração e defesa oxidativa dos pigmentos fotossintéticos (Khan et al., 2012; Lisko et al., 2014).

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é considerada uma das leguminosas mais importantes a nível mundial, devido a sua composição nutricional, por apresentar elevado teor de proteínas, minerais, além de ser uma das principais fontes de óleo (Akond et al., 2018). No entanto, o crescimento e desenvolvimento da soja é grandemente afetado em ambientes salinos, ocasionando reduções drásticas na produção de grãos (Feng et al., 2020). Nesse sentido, com vista a melhorar o crescimento e proteção da soja contra o estresse salino, pesquisas recentes tem indicado que o uso de AsA é capaz de estimular atividade de enzimas antioxidantes,

regular a homeostase iônica e aumentar os pigmentos fotossintéticos (Shahbazi Zadeh et al., 2015; Gomma et al., 2020).

O potencial do AsA como estratégia para atenuar os efeitos do estresse por salinidade é promissor, embora seja necessária uma maior compreensão do seu mecanismo de ação sob diferentes métodos de fornecimento em plantas de soja. Portanto, para ampliar o entendimento sobre as respostas da soja ao AsA, nossas principais hipóteses foram as seguintes: (i) diferentes métodos de aplicação de AsA poderiam regular as mudanças induzidas pelo estresse salino através de adaptações a nível fisiológico e bioquímico contra o estresse oxidativo; (ii) a aplicação foliar e radicular combinada de AsA é mais promissora na atenuação dos efeitos prejudiciais do estresse salino tanto na cultivar tolerante e sensível à salinidade; e (iii) apenas aplicações foliares de AsA poderiam atenuar os efeitos causados pela salinidade na cultivar de soja sensível.

Para isto, objetivou-se avaliar o efeito de métodos de aplicação de AsA na atenuação dos efeitos prejudiciais do estresse salino, através da modulação de respostas fisiológicas e bioquímicas em cultivares de soja tolerante e suscetível à salinidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da cultura da soja

A soja é a cultura oleaginosa mais importante cultivada no mundo (Lazzarotto e Hirakuri, 2010), originou-se na China, aproximadamente há 5000 anos atrás (EMBRAPA, 2019). A cultura da soja foi introduzida de maneira definitiva no Brasil no estado do Rio Grande do Sul, no ano de 1980, como alternativa para a rotação com a cultura do trigo (Cattelan e Dall'Agnol, 2018). Com a intervenção do melhoramento genético, hoje a soja é cultivada em quase todo o território brasileiro, adaptando-se às diferentes condições climáticas existentes.

Esta planta é uma espécie de grande interesse socioeconômico a nível mundial, devido à composição nutricional de seus grãos que apresentam elevado teor de proteínas, minerais, além de ser uma das principais fontes de óleo (Akond et al., 2018), sendo empregada para diversas finalidades.

Segundo dados levantados pela Conab (2020), a área cultivada de soja no Brasil na safra 2020/2021 foi de 38,502 milhões de hectares, posicionando-se no primeiro lugar no ranking mundial de produção e exportação de grãos de soja, o que demonstra a importância econômica da cultura no país.

A produção total na safra 2020/2021 foi de 135,409 milhões de toneladas, sendo que o estado de Mato Grosso foi responsável por 35,947 milhões de toneladas de grãos produzidas em uma área plantada de 10,924 milhões de hectares com produtividade média de 3.492 kg ha⁻¹, assumindo o primeiro lugar no ranking dos maiores estados produtores de soja a nível Brasil (Conab, 2020).

Esta importante leguminosa, é afetada por vários estresses abióticos, como a salinidade, que pode impactar negativamente no crescimento e a produtividade da soja (Yasmin et al., 2020). A salinidade geralmente perturba o equilíbrio de nutrientes nas plantas de soja, resultando em toxicidade iônica, que leva ao estresse osmótico e oxidativo (Adhikari et al., 2020).

2.2 Estresse salino

A salinidade é reconhecida como um dos principais fatores restritivos ao crescimento e à produtividade das culturas, principalmente em regiões áridas e semiáridas (Etesami e Beattie, 2018). A salinidade pode ocorrer de forma natural (intemperismo de material rochoso, deposição de sal marinho ocasionado por vento ou chuva, inundações marítimas) ou pelas atividades antrópicas (uso incorreto de fertilizantes, irrigação com águas salinas, por drenagens ineficientes, aumento do lençol freático, excesso de irrigação com águas subterrâneas, etc.) (Zaman et al., 2018).

A nível mundial, estima-se que 6,5% dos solos tem problemas de salinidade e 20% do total da área cultivada é afetada pela salinidade, tornando-se um dos maiores problemas para a agricultura, pois, afeta negativamente o crescimento, desenvolvimento e produtividade das culturas (Billah et al., 2017; Mukhopadhyay et al., 2021). O estresse salino não afeta apenas a produtividade das culturas, mas também pode impactar negativamente os aspectos ecológicos, sociais e econômicos (Billah et al., 2017).

O estresse salino é considerado um dos principais fatores abióticos que afeta diferentes processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos das plantas, incluindo trocas gasosas, absorção de água e nutrientes e atividade do sistema antioxidante (Talaat et al., 2015; Ahmad et al., 2019). O funcionamento metabólico das plantas é interrompido devido ao aumento do estresse iônico pelo acúmulo de íons sódio (Na^+) e cloro (Cl^-), e aumento do estresse osmótico que reduz a capacidade da planta de absorver água (Carillo et al., 2019; Hurtado et al., 2020).

Além disso, o estresse salino causa redução na atividade respiratória, síntese de proteínas, fechamento estomático e funcionamento do aparato fotossintético, provocando a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Hinojosa et al., 2018). Embora as ERO sejam formadas na planta como parte do metabolismo celular normal, a superacumulação devido ao estresse danifica gravemente os compartimentos celulares.

2.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo nas plantas é causado pela superprodução de ERO, e ocorre quando há um desequilíbrio nos compartimentos celulares, o que pode provocar a degradação da clorofila e na peroxidação lipídica, afetando assim a fluidez e permeabilidade da membrana devido a alterações na composição dos lipídeos (Desoky et al., 2020b; Li et al., 2021).

Entre as principais ERO temos o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroxila ($\text{OH}^{\cdot}$) e oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), que surgem através da excitação ou redução incompleta de oxigênio molecular (Choudhury et al., 2017; Janku et al., 2019). A produção de ERO ocorre principalmente no cloroplasto, mitocôndrias e peroxissomos (Hasanuzzaman et al., 2020). Os danos celulares provocados pela superprodução de ERO se manifestam na forma de degradação de biomoléculas como pigmentos, proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, que finalmente provocam a morte celular da planta, devido a sua natureza altamente reativa (García-Caparrós et al., 2021).

2.4 Sistema de defesa antioxidante

As plantas apresentam uma variedade de mecanismos de defesa para sobreviver e se adaptar a condições desfavoráveis, como ambientes salinos. Estes incluem sistemas enzimáticos e não enzimáticos, que podem remover ou neutralizar os radicais de oxidação (Dumanović et al., 2021). O sistema de defesa enzimático inclui enzimas como: superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GOPX), glutathione redutase (GR) e catalase (CAT); por outro lado, o não enzimático inclui compostos como: ascorbato (AAs), glutathione (GSH), flavonoides, fenólicos, tocoferol e carotenoides (Hurtado et al., 2020; Silva et al., 2020).

Nas plantas, a enzima SOD está diretamente relacionada ao estresse, que inicia a primeira linha de defesa, convertendo $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (Laxa et al., 2019). Este H_2O_2 gerado pode ainda ser convertido em H_2O pelas enzimas CAT, APX, GPX, ou catalisado no ciclo AsA-GSH. Na célula vegetal, o ciclo AsA-GSH é a principal via de defesa antioxidante para desintoxicar H_2O_2 , que consistem em antioxidantes não enzimáticos como o AsA e GSH, bem como quatro enzimas importantes ascorbato peroxidase (APX), monodeidroascorbato redutase (MDHAR), deidroascorbato redutase (DHAR) e glutathione redutase (GR) (Hasanuzzaman et al., 2020).

No sistema de defesa antioxidante, um papel fundamental é desempenhado pelo ciclo AsA-GSH para minimizar H_2O_2 e homeostase redox. Além disso, GPX e GST também são enzimas vitais para a desintoxicação de H_2O_2 (Dumanović et al., 2021). Entre os antioxidantes não enzimáticos, AsA e GSH são os antioxidantes solúveis mais abundantes em plantas superiores, que desempenham um papel vital como doadores de elétrons e eliminam ERO diretamente através do ciclo AsA-GSH. Além disso, o beta-caroteno reage com os radicais $OH^{\cdot}$, $O_2^{\cdot-}$ e hidroperóxidos (ROOH) resultando em concentrações celulares reduzidas de ERO (Laxa et al., 2019; Dumanović et al., 2021).

Os danos fisiológicos induzidos pelo estresse salino nas plantas variam entre espécies (Bustingorri e Lavado 2011). Existem muitos mecanismos pelos quais a salinidade pode ser mitigada, como por exemplo o uso de plantas com genes tolerantes à salinidade, manejo da fertilidade de solo e uso de plantas fitoextratoras. Entretanto, estas alternativas representam custos elevados e os resultados são

obtidos a longo prazo (Willadino et al., 2016). Alternativamente, o uso de compostos relacionados às respostas antioxidantes das plantas representa um benefício potencial na agricultura. Compostos não enzimáticos como o ácido ascórbico (AsA), elementos benéficos como o silício (Si) e selênio (Se), e uso de aminoácidos como prolina e glutamato vem sendo muito utilizados através de aplicações exógenas nas culturas (Ahmad et al., 2019; Abdel et al., 2020). Entretanto, o AsA poderia ter vantagem em relação aos outros compostos devido a sua alta solubilidade em água, sendo de fácil absorção e acúmulo preferencialmente nas folhas, modulando uma série de fatores fundamentais em plantas sob condições de estresse (Akram et al., 2017).

2.5 O ácido ascórbico como mitigador de estresse salino

O ácido ascórbico (AsA) é um dos antioxidantes não enzimáticos mais importantes que desempenha um papel vital no crescimento e funcionamento normal das plantas. O AsA regula uma série de processos celulares, como divisão celular, diferenciação celular e senescência (Bilska et al., 2019). A forma fisiologicamente ativa do AsA é a forma aniônica estabilizada (formada devido à desprotonação do grupo hidroxil em C₃) que é denominada ascorbato (Akram et al., 2017; Dehnadi et al., 2020). Da mesma forma, o ânion ascorbato (AH⁻) é uma molécula antioxidante solúvel em água, vital dentro do sistema biológico (Akram et al., 2017; Farooq et al., 2020).

O AsA se encontra em diferentes tecidos vegetais como meristemas, células fotossintéticas e principalmente nos cloroplastos das folhas, regulando uma série de funções fundamentais em plantas tanto em condições normais e sob estresse, como salinidade, seca e temperaturas extremas (Yoshimura e Ishikawa 2017; Bilska et al., 2019).

Em relação ao mecanismo de defesa antioxidante, o AsA é conhecido por proteger organelas e células do dano oxidativo provocado pelo excesso de ERO (Akram et al., 2017). Dentro dessas condições, o AsA controla a divisão celular, atua como cofator enzimático, doa elétrons, modula a fotossíntese, biossíntese hormonal e atua na regeneração de outros compostos antioxidantes (Tóth et al., 2013). Entretanto, os níveis endógenos de AsA nas plantas não são suficientes para

cumprir esse conjunto de processos e atenuar efetivamente os efeitos adversos originados pelo estresse salino (Latif et al., 2016).

Diante disso, tem sido indicado que as aplicações exógenas de AsA podem aumentar eficientemente as concentrações de AsA nos tecidos das plantas e melhorar a proteção contra o estresse oxidativo (Naz et al., 2016; Wang et al., 2019). Existem diferentes formas de fornecimento de AsA que tem sido avaliadas para atingir maior concentração do composto nas plantas, como aplicações foliares, via radicular e pré-tratamento de sementes (Athar et al., 2008). Alguns estudos demonstraram claramente que a aplicação exógena de AsA é eficaz para melhorar a produtividade e crescimento das culturas em condições com e sem estresse (Hossain et al., 2018; Penella et al., 2017). No entanto, na atualidade, ainda pouco se sabe sobre o uso de AsA como atenuador dos efeitos do estresse por salinidade, portanto, é relevante a busca do conhecimento sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos de resposta das plantas em defesa do dano oxidativo ocasionado pela superprodução das ERO.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais vegetais e condições de crescimento

O trabalho foi realizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp-Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal – SP, (21° 14' 05" S, 48° 17' 09" W, e 615,01 m de altitude). A temperatura máxima da casa de vegetação foi 41,53°C ± 4 e a temperatura mínima de 21,44°C ± 4 e uma umidade relativa máxima de 71,41% ± 4 e a mínima de 19,74% ± 4 durante o dia, esses dados foram registrados diariamente (Fig. 1). As sementes de soja da cultivar tolerante (M 8372) e sensível (M-SOY 8222) à salinidade foram obtidas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil.

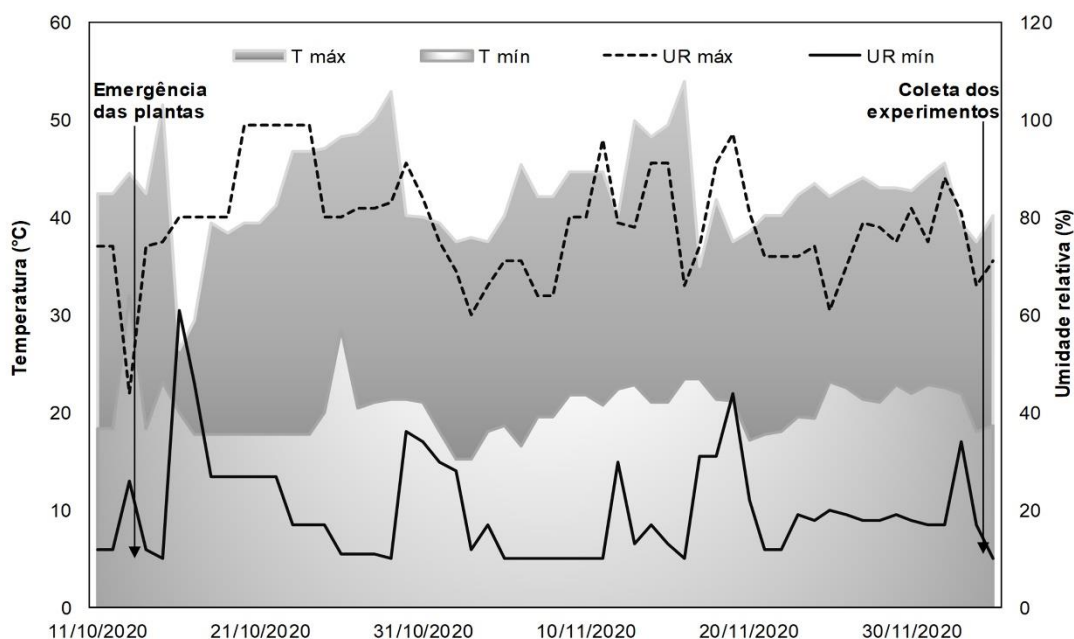


Figura 1. Condições experimentais na casa de vegetação durante o desenvolvimento do experimento. Temperatura máxima (T° Máx.), temperatura mínima (T° Mín.), umidade relativa máxima (UR Máx.) e umidade relativa mínima (UR Mín.).

Dois experimentos foram realizados neste estudo, sob delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial 4x2, com cinco repetições, desenvolvidos em sistema de cultivo hidropônico. Os tratamentos corresponderam a quatro formas de aplicação de ácido ascórbico (AsA), via radicular na solução nutritiva ($0,85 \text{ mmol L}^{-1}$ AsA), via aplicações foliares (100 mmol L^{-1}), combinação radicular mais foliar e o controle, sem AsA, e duas concentrações de cloreto de sódio (0 e 100 mmol L^{-1} de NaCl). A concentração utilizada de AsA via foliar foi determinada em ensaios preliminares, onde a partir dos resultados obtidos, chegou-se à escolha da mesma. A concentração de AsA via radicular foi escolhida segundo a recomendação de Athar et al. (2008).

Seis sementes de soja foram semeadas em potes de plástico contendo 5 dm^3 de areia previamente lavada e esterilizada com ácido clorídrico (HCl) e água deionizada. De acordo com o desenvolvimento das plantas, apenas duas plantas por vaso foram mantidas. A solução nutritiva usada foi a do Hoagland and Arnon (1950), sendo considerado o dobro da concentração recomendada de Fe, conforme indicação de Cavalcante et al. (2016). A concentração iônica foi incrementada

durante o ciclo da cultura, iniciando-se com 10% durante os primeiros 10 dias após a emergência, e seguida para 25% no desenvolvimento foliar (V3), 50% a partir do estágio V4 e, finalmente 75% no estágio V5, até o fim de experimento no estágio V6. O pH da solução foi mantido em $5,5 \pm 0,2$ com uso de solução de HCl ou NaOH, ambos a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

O fornecimento do AsA via radicular na solução nutritiva foi feito de forma contínua durante todo o período experimental, após a emergência das plantas. O fornecimento via foliar de AsA, consistiu em uma aplicação em cada estágio de desenvolvimento da soja (V4, V5 e V6), sendo realizadas durante as primeiras horas da manhã, considerando umidade relativa superior a 70%. O pH da solução para aplicação foliar foi mantido em $5,5 \pm 0,2$, a fim de garantir maior absorção foliar (Fernández et al., 2013). No tratamento controle (-AsA) e com aplicação radicular de AsA, as plantas receberam a aplicação de água deionizada via foliar. Aos cinco dias após da primeira aplicação foliar as plantas foram submetidas a estresse salino, usando a concentração de 100 mmol L^{-1} de NaCl. O NaCl foi fornecido diariamente via solução nutritiva até que as plantas apresentaram os primeiros sintomas de estresse por salinidade como cloroses nas folhas inferiores. Posteriormente, as plantas foram coletadas e feitas as respectivas análises fisiológicas, bioquímicas, e determinações dos teores de AsA, Na^+ e K^+ .

3.2 Análises fisiológicas e bioquímicas

3.2.1 Quantificação da clorofila e carotenoides

Para a quantificação dos teores de clorofila e carotenoides, os discos foliares de 0,25 a 0,30 g da terceira folha bem desenvolvida foram removidos e mensurados. Sob condições de pouca luz, os discos foram colocados em tubos eppendorf contendo 2 mL de acetona (80%) mantido por 72 horas a 4°C . Após este período as soluções foram lidas em triplicata em espectrofotômetro de Beckman Du 640 nos seguintes comprimentos de onda: Clorofila *a* (*Chl a*) a 647 nm; Clorofila *b* (*Chl b*) a 663 nm e Carotenoides a 470 nm (Lichtenthaler, 1987).

3.2.2 Medições de fluorescência da clorofila e trocas gasosas

A fluorescência da clorofila, se realizou na quarta folha de acima para abaixo e foram aclimatadas em escuro por um período mínimo de 30 minutos antes da análise, utilizando-se cliques de alumínio fornecidos com o MINI-PAM-II. Após este período, a eficiência quântica do fotossistema II (Fv:Fm) foi determinada seguindo os procedimentos padrões de Maxwell e Johnson (2000). Em seguida, as curvas de fluorescência de luz foram realizadas usando o protocolo "rapid light curves" (White e Critchley, 1999), e armazenadas na memória do equipamento MINI-PAM-II. As medições foram realizadas na primeira folha completamente desenvolvida por planta e por tratamento entre 11:00 e 12:00 horas. Foram utilizados 12 níveis de intensidade luminosa (0-1600 nmol m⁻² s⁻¹), sendo as folhas aclimatadas em cada nível por 30 min, após o pulso de saturação de luz e os dados de taxa de transporte de elétrons (Fv/F0) armazenados. Usando o ajuste automático da curva do software MINI-PAM II (WinCrontrol 3.0) a taxa máxima de transporte de elétrons (Fv/F0).

Os parâmetros de troca gasosa foram determinados na quarta folha de acima para abaixo da planta de soja, entre 9 e 11 horas, na presença de luz natural dentro da estufa, usando quatro repetições para cada tratamento. A taxa fotossintética (*A*), a taxa de transpiração (*E*) e a condutância estomática (*gs*) foram medidas usando um analisador de gás infravermelho aberto (IRGA LcPro-SD, ADC BioScientificLtd., Hoddesdon, Reino Unido). A câmara IRGA foi irradiada com uma densidade de fluxo de fótons fotossintéticos de 2000 µmol m⁻² s⁻¹.

3.2.3 Determinação do conteúdo relativo da água e eficiência do uso da água

O conteúdo relativo de água na folha foi determinado a partir da coleta de seis discos foliares com aproximadamente 129 mm² da primeira folha completamente desenvolvida, sendo imediatamente pesado em balança analítica para a aferição da massa fresca do tecido (*Pf*). Após isso, as amostras foram reidratadas em água deionizada por 6 horas, para a obtenção da massa túrgida (*Pst*), fazendo-se uso de papel toalha para extrair o excesso de água. A massa seca (*Ps*) foi obtida após os discos permanecerem em estufa de circulação de ar forçada a 80°C, por 24 horas. Os valores do conteúdo relativo de água foram obtidos pela equação proposta por Barrse Weatherley (1962), $CRA = [(Pf - Ps)/(Pst - Ps)] \times 100$.

A eficiência do uso da água (EUA) foi calculada como a taxa fotossintética líquida (A) dividido para a taxa de transpiração (E): $EUA = A/E$.

3.2.4 Determinação do acúmulo de Na^+ e K^+

A determinação do teor de Na^+ e K^+ foi realizada na raiz e na parte aérea. As amostras foram digeridas com uma mistura de ácido nítrico e perclórico, segundo Carmo et al. (2000). As concentrações de Na^+ e K^+ foram determinadas pelo método de espectrometria de emissão de chama usando um fotômetro de chama (Micronal - B462). As concentrações de Na^+ e K^+ foram expressas em $mg\ kg^{-1}$ de tecido seco. O acúmulo foi obtido pela seguinte expressão:

$$\text{Acúmulo de } Na^+ \text{ e } K^+ = \frac{\text{massa seca (mg)} \times \text{concentração (mg kg}^{-1}\text{)}}{1000} = \text{mg por planta}$$

3.2.5 Determinação da peroxidação lipídica

O estresse oxidativo foi realizado nas raízes e folhas pelo análise da peroxidação lipídica a partir da quantificação do conteúdo de substâncias reativas ao tiobarbitúrico (TBA), dentre as quais se destaca o malondialdeído (MDA). O teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi quantificado como produto final do processo de peroxidação lipídios, com leituras entre 535 e 600 nm (Gratão et al., 2012). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol mg}^{-1}$ de massa fresca (Shimizu et al., 2006).

3.2.6 Extração de proteínas e determinação de enzimas antioxidantes

As amostras de material vegetal fresco de raízes e folhas previamente coletadas e estocadas em freezer - 80°C foram maceradas em N_2 líquido e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio $100\ \text{mmol L}^{-1}$ (pH 7,5) contendo $1\ \text{mmol L}^{-1}$ de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), $3\ \text{mmol L}^{-1}$ DTT e 4% PVPP (Boaretto et al., 2014). A mistura foi centrifugada a $10.000\ \text{g}$ por 30 min a 4°C e o sobrenadante foi cuidadosamente separado e armazenado a -80°C para posterior análises de SOD, APX e GPOX. A quantificação das proteínas solúveis totais foi realizada conforme Bradford, (1976).

3.2.6.1 Superóxido dismutase – SOD (EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada espectrofotometricamente pelo método do cloreto de nitrotetrazólio azul (Giannopolitis e Ries, 1977). O meio de ensaio continha 50 mmol L⁻¹ de tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 50 mmol L⁻¹ de metionina, 10 mmol L⁻¹ de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 1 mmol L⁻¹ de cloreto de nitrotetrazólio azul (NBT) e 0,1 mmol L⁻¹ de riboflavina e extrato vegetal. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir fotoquimicamente a redução de NBT em 50% a 560 nm. A atividade da SOD foi expressa como U SOD mg⁻¹ de proteína.

3.2.6.2 Ascorbato peroxidase - APX (EC 1.11.1.11)

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada em uma mistura de reação contendo 50 mmol L⁻¹ de tampão de fosfato de potássio (pH 7,0), 0,5 mmol L⁻¹ de ascorbato, 0,1 mmol L⁻¹ de EDTA e 0,1 mmol L⁻¹ de H₂O₂ (Alves et al., 2021). A atividade de APX foi determinada pela monitoração da taxa de oxidação de ascorbato a uma absorbância a 290 nm durante 1 min a 30°C. A atividade da APX foi expressa como µmol ascorbato min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3.2.6.3 Guaiacol peroxidase - GPOX (EC 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase de Guaiacol (GPOX) foi determinada em um meio de reação contendo 250 µL de tampão fosfato-citrato (fosfato de sódio dibásico 0,2 M: ácido cítrico 0,1 M) pH 5,0, 15 µL de extrato enzimático e 25 µL de guaiacol 0,5%, que foi incubado a 30 °C por 15 min. A reação foi interrompida em banho de água gelada, seguida da adição de 25 µL de solução de metabisulfito de sódio a 2%. A atividade GPOX foi avaliada monitorando a absorbância a 450 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) de GPOX corresponde a um aumento de 0,001 na absorbância por minuto por mg de proteína (Checchio et al., 2021).

3.2.7 Antioxidantes não enzimáticos

3.2.7.1 Teor de prolina livre

Foram pesados 0,25 mg do material fresco de raízes e folhas, macerados em nitrogênio líquido e adicionados 10 mL de ácido sulfossalicílico a 3%. A solução homogeneizada foi submetida a duas filtrações para a eliminação parcial dos interferentes e diluída com ácido ninhidrina diluída em ácido acético. Em um tubo de ensaio, foram colocados 2 mL do filtrado que reagiram com 2 mL de ácido ninhidrina e 2 mL de ácido acético glacial, por 60 minutos, em banho-maria, à temperatura de 100°C. Decorrido este tempo, o tubo de ensaio foi colocado em um recipiente com gelo para finalizar a reação. Em seguida, foram adicionados 4 mL de tolueno, e a solução foi homogeneizada agitando-se por 15 a 20 segundos. A leitura de absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro de Beckman DU 640, no comprimento de onda de 520 nm (Bates et al., 1973), sendo os teores definidos com base na massa fresca ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF).

3.2.7.2 Teor de ácido ascórbico

Seguindo o protocolo de Mukherjee e Choudhuri (1983), uma amostra de raízes e folhas (0,25 g) foi misturada com 5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6% e, em seguida, filtrada. O filtrado (2 mL) foi misturado com 1,0 mL de 2,4 dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) e com uma gota de tioureia a 10%. As amostras foram incubadas em banho-maria a 100°C por 15 min, resfriadas à temperatura ambiente e adicionados 2,5 mL de H_2SO_4 a 80% a cada amostra. A densidade óptica de cada amostra foi observada em 530 nm usando um espectrofotômetro (Mukherjee e Choudhuri, 1983).

3.2.8 Quantificação de biomassa e área foliar

Foi determinada através da mensuração da massa seca de raízes e parte aérea (caule mais folhas), coletadas e mantidas em estufa por 65 a 70 °C, depois, a massa foi pesada utilizando uma balança analítica com precisão de 0,0001 g. Os resultados foram expressos em g por planta. A área foliar foi quantificada eletronicamente no equipamento LICOR 3100.

3.3 Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade usando o teste de Kolmogorov-Smirnov e homogeneidade pelo teste de Shapiro-Wilk, posteriormente o efeito dos tratamentos foi submetido a análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,05$). As medias comparadas por meio do teste de Tukey quando ($p \leq 0,05$), utilizando o software estatístico AgroEstat® (Barbosa e Maldonado JR, 2010).

4 RESULTADOS

4.1 Conteúdo relativo de água e eficiência do uso da água

Com relação ao conteúdo relativo de água na folha, um efeito de interação significativa do AsA e NaCl foi observado dentro e entre as concentrações de NaCl (0 e 100 mmol L⁻¹ NaCl), nas duas cultivares de soja M 8372 e M-SOY 8222 (Fig. 2A,B). Nas duas cultivares, sob estresse salino, houve um aumento do conteúdo relativo de água (CRA) quando aplicados os tratamentos de AsA, em relação ao controle (-AsA). Um efeito significativo da interação entre AsA e NaCl também foi observado para a eficiência de uso da água (EUA) para ambas as cultivares (Fig. 2C,D). Todos os tratamentos com aplicação de AsA aumentaram a EUA na cultivar M-SOY 8222, sob estresse salino, em relação ao controle. As plantas sem fornecimento de NaCl mostraram maior EUA em M 8372 e M-SOY 8222, quando aplicado AsA(R+F) (Fig. 2C).

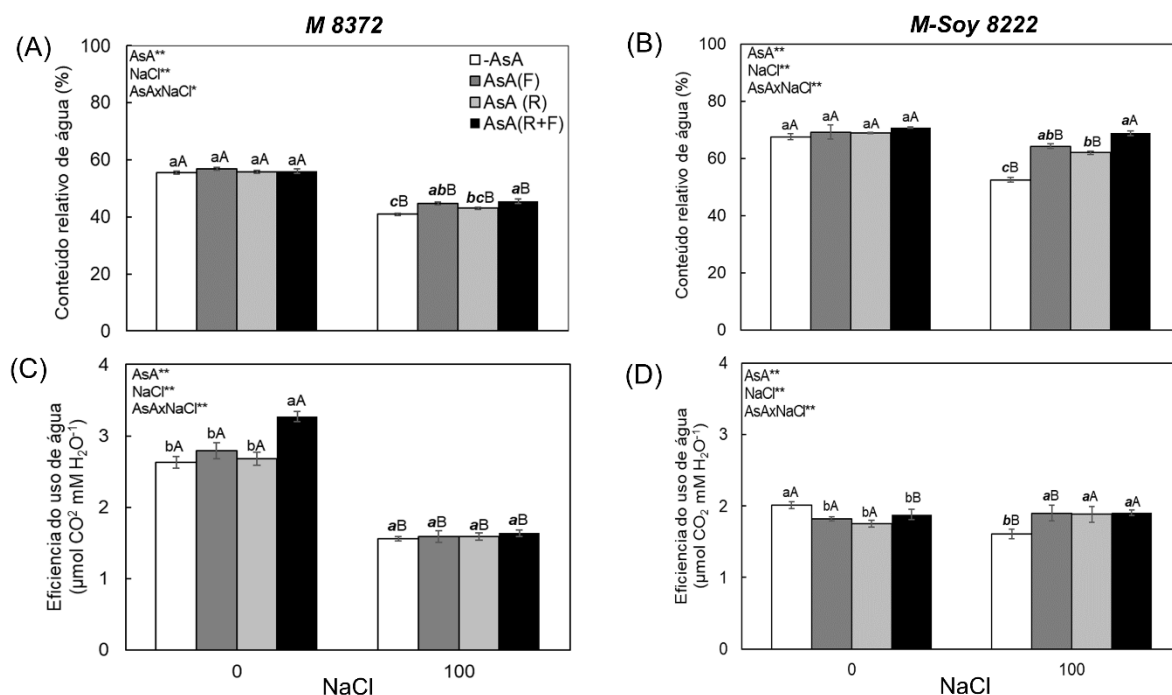


Figura 2. Conteúdo relativo de água em M 8372 (A) e M-SOY 8222 (B); eficiência de uso de água em M 8372 (C) e M-SOY 8222 (D) cultivadas em dois níveis de NaCl (0 e 100 mmol L⁻¹) combinados com diferentes métodos de aplicação de ácido ascórbico (AsA): -AsA, controle; AsA(F), aplicação foliar de AsA; AsA(R), aplicação radicular de AsA; AsA(R+F), aplicação foliar e radicular combinada de AsA. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos sem NaCl e com NaCl no mesmo método de AsA, de acordo com o teste de Tukey. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) (n=5); *(p $\leq$ 0,05), **(p $\leq$ 0,01) de acordo com o teste F. Barras verticais representam o EPM.

4.2 Teor de pigmentos e fluorescência da clorofila

Os teores de clorofila total e carotenoides das duas cultivares de soja diminuíram significativamente sob estresse salino (Fig. 3). O teor de clorofila total foi afetado pela interação entre os fatores AsA e NaCl. Apenas a aplicação de AsA(R+F) aumentou o teor de clorofila total de M 8372, sob estresse salino e sem sal. No entanto, os tratamentos AsA(F) e AsA(R+F) promoveram o teor de clorofila total de M-SOY 8222, tanto no estresse salino e sem sal (Fig. 3A,B). Foi demonstrado um efeito de interação do AsA e NaCl sobre o teor de carotenoides. Na condição de estresse salino, a aplicação de AsA(R+F) aumentou o teor de carotenoides de M 8372. No entanto, para M-SOY 8222, os tratamentos AsA(F) e

AsA(R+F) apresentaram o mesmo efeito no aumento do teor de carotenoides (Fig. 3C,D).

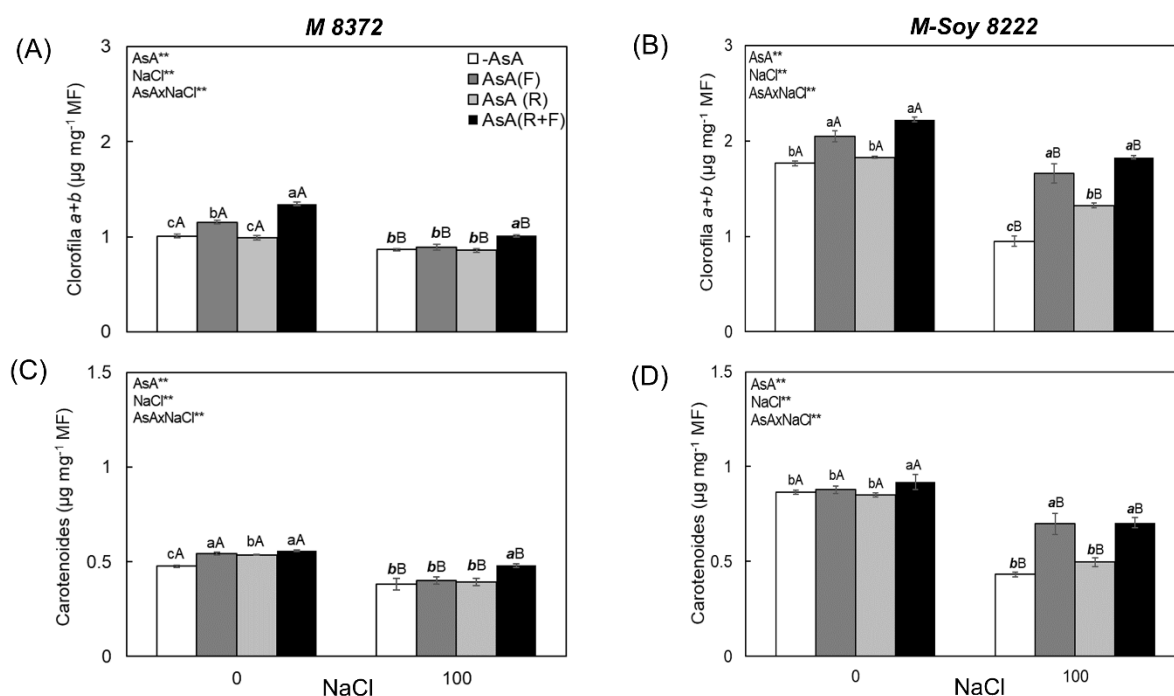


Figura 3. Teor de clorofila *a+b* em M 8372 (A) e M-SOY 8222 (B); teor de carotenoides em M 8372 (C) e M-SOY 8222 (D) cultivadas em dois níveis de NaCl (0 e 100 mmol L⁻¹) combinados com diferentes métodos de aplicação de ácido ascórbico (AsA): -AsA, controle; AsA(F), aplicação foliar de AsA; AsA(R), aplicação radicular de AsA; AsA(R+F), aplicação foliar e radicular combinada de AsA. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos sem NaCl e com NaCl no mesmo método de AsA, de acordo com o teste de Tukey. Os dados representam a média ± EPM (n=5); *(p ≤ 0,05), **(p ≤ 0,01) de acordo com o teste F. Barras verticais representam o EPM.

Houve interação entre os fatores AsA e NaCl para Fv/Fm e Fv/Fo para ambas as cultivares. A eficiência fotoquímica do PSII foi aumentada com a aplicação de AsA(R+F) para M 8372 e, AsA(F) mais AsA(R+F) para M-SOY 8222, sob condição de estresse salino (Fig. 4A,B). Além disso, a taxa de transporte de elétrons foi maior quando fornecido AsA(R+F) nas duas cultivares submetidas a 100 mmol L⁻¹ de NaCl (Fig. 4C,D).

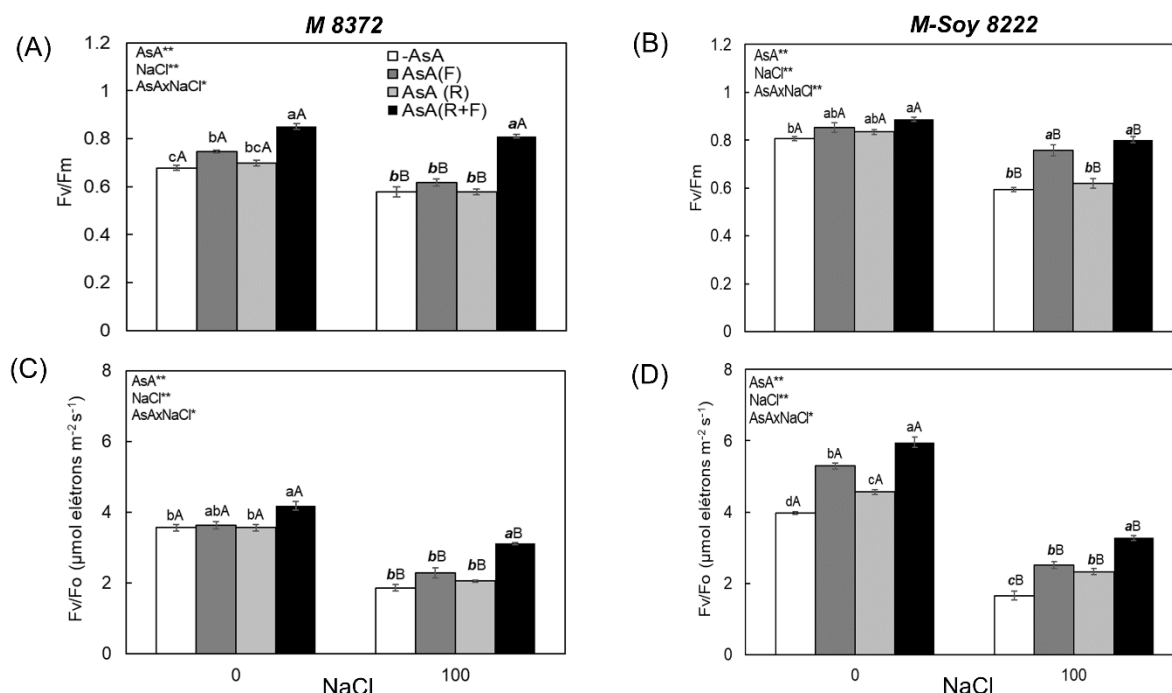


Figura 4. Eficiência fotoquímica do PSII (Fv/Fm) em M 8372 (A) e M-SOY 8222 (B); taxa de transporte de elétrons (Fv/Fo) em M 8372 (C) e M-SOY 8222 (D) cultivadas em dois níveis de NaCl (0 e 100 mmol L⁻¹) combinados com diferentes métodos de aplicação de ácido ascórbico (AsA): -AsA, controle; AsA(F), aplicação foliar de AsA; AsA(R), aplicação radicular de AsA; AsA(R+F), aplicação foliar e radicular combinada de AsA. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos sem NaCl e com NaCl no mesmo método de AsA, de acordo com o teste de Tukey. Os dados representam a média $\pm$ EPM (n=5); *(p $\leq$ 0,05), **(p $\leq$ 0,01) de acordo com o teste F. Barras verticais representam o EPM.

4.3 Parâmetros de trocas gasosas da folha

Os parâmetros de trocas gasosas da folha foram significativamente afetados pela interação dos fatores AsA e NaCl (Fig. 5). A aplicação de AsA(R+F) promoveu a maior taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) de M 8372, quanto na condição de estresse salino e sem sal. A aplicação dos tratamentos AsA(F) e AsA(R+F) tiveram o mesmo efeito significativo sobre A de M-SOY 8222, sob estresse salino (Fig. 5A,B). Na condição de estresse salino, as duas cultivares de soja apresentaram menor A, independentemente do método de aplicação de AsA.

A aplicação de AsA(R+F) aumentou a condutância estomática (g_s) de M 8372 e M-SOY 8222, sob condição sem sal (Fig. 5C,D). A aplicação de AsA não teve

efeito sobre g_s de M 8372 cultivada sob salinidade, porém, o fornecimento de AsA(R+F) aumentou a g_s de M-SOY 8222. Na condição de estresse salino, o tratamento AsA(R+F) aumentou a taxa transpiratória (E) de M 8372, entretanto, houve aumento de E com AsA(F) e AsA(R+F) para M-SOY 8222 (Fig. 5E,F). As duas cultivares sob 100 mmol L⁻¹ de NaCl exibiram A , g_s e E diminuída, independentemente do método de aplicação de AsA.

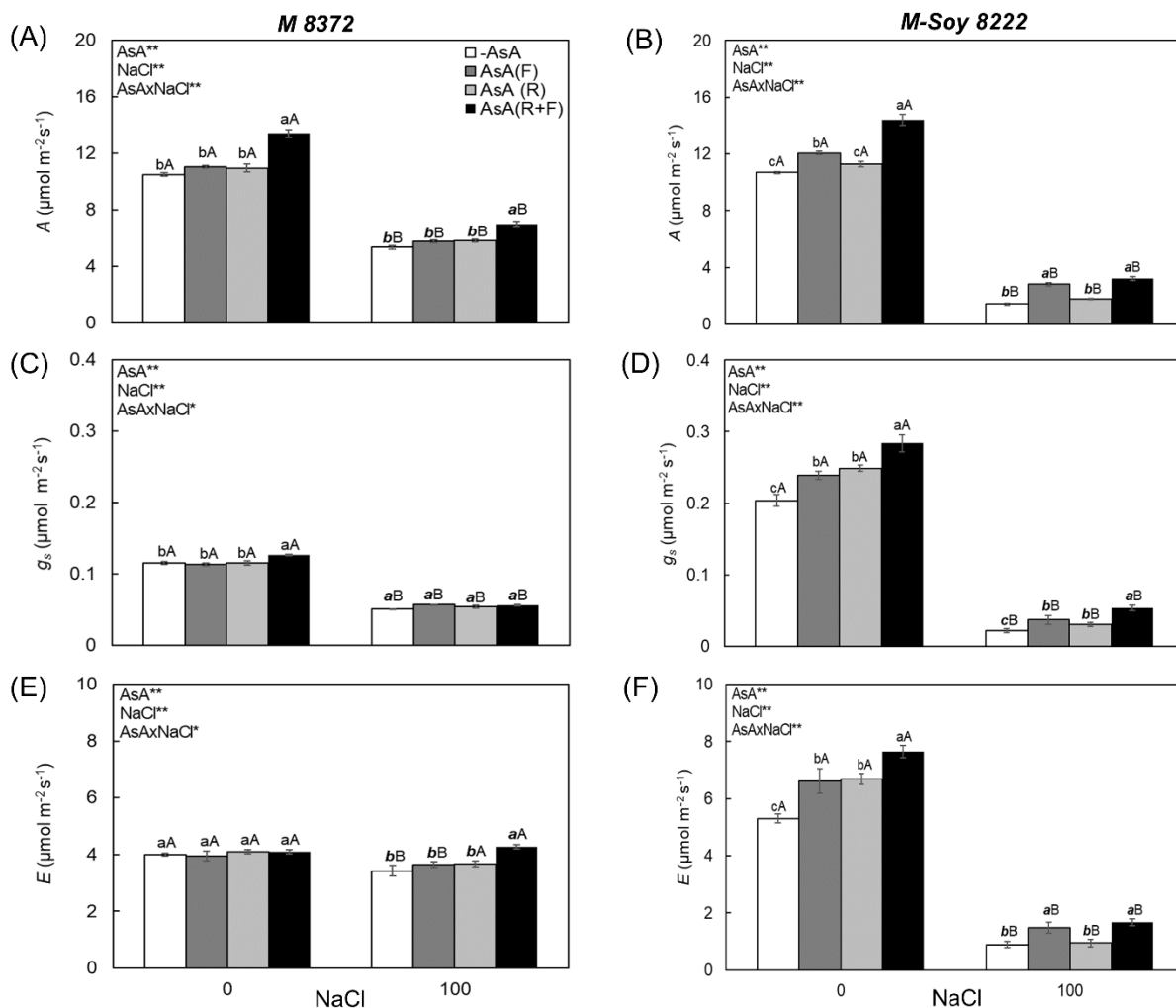


Figura 5. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) em M 8372 (A) e M-SOY 8222 (B); condutância estomática ao vapor de água (g_s) em M 8372 (C) e M-SOY 8222 (D); taxa de transpiração (E) em M 8372 (E) e M-SOY 8222 (F) cultivadas em dois níveis de NaCl (0 e 100 mmol L⁻¹) combinados com diferentes métodos de aplicação de ácido ascórbico (AsA): -AsA, controle; AsA(F), aplicação foliar de AsA; AsA(R), aplicação radicular de AsA; AsA(R+F), aplicação foliar e radicular combinada de AsA. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos sem NaCl e com NaCl no mesmo método de AsA, de acordo com o teste de Tukey. Os dados representam a média $\pm$ EPM (n=5); *(p $\leq$ 0,05), **(p $\leq$ 0,01) de acordo com o teste F. Barras verticais representam o EPM.

4.4 Acúmulo de Na⁺ e K⁺

O acúmulo de Na⁺ e K⁺ foi significativamente afetado pela interação entre AsA e NaCl. O fornecimento de AsA(R+F) diminuiu significativamente o acúmulo de Na⁺ na parte aérea e raiz de M 8372, sob condição de estresse salino (Fig. 6A,C). Tanto AsA(F) como AsA(R+F) diminuíram o acúmulo de Na⁺ na parte aérea de M-SOY 8222 (Fig. 5B). O acúmulo de Na⁺ nas raízes das duas cultivares reduziu quando fornecido AsA(R+F) (Fig. 6C,D). Por outro lado, a aplicação de AsA(R+F) promoveu o acúmulo de K⁺ na parte aérea e raiz das duas cultivares, tanto na condição de estresse salino e sem sal (Fig. 6E,FG,H).

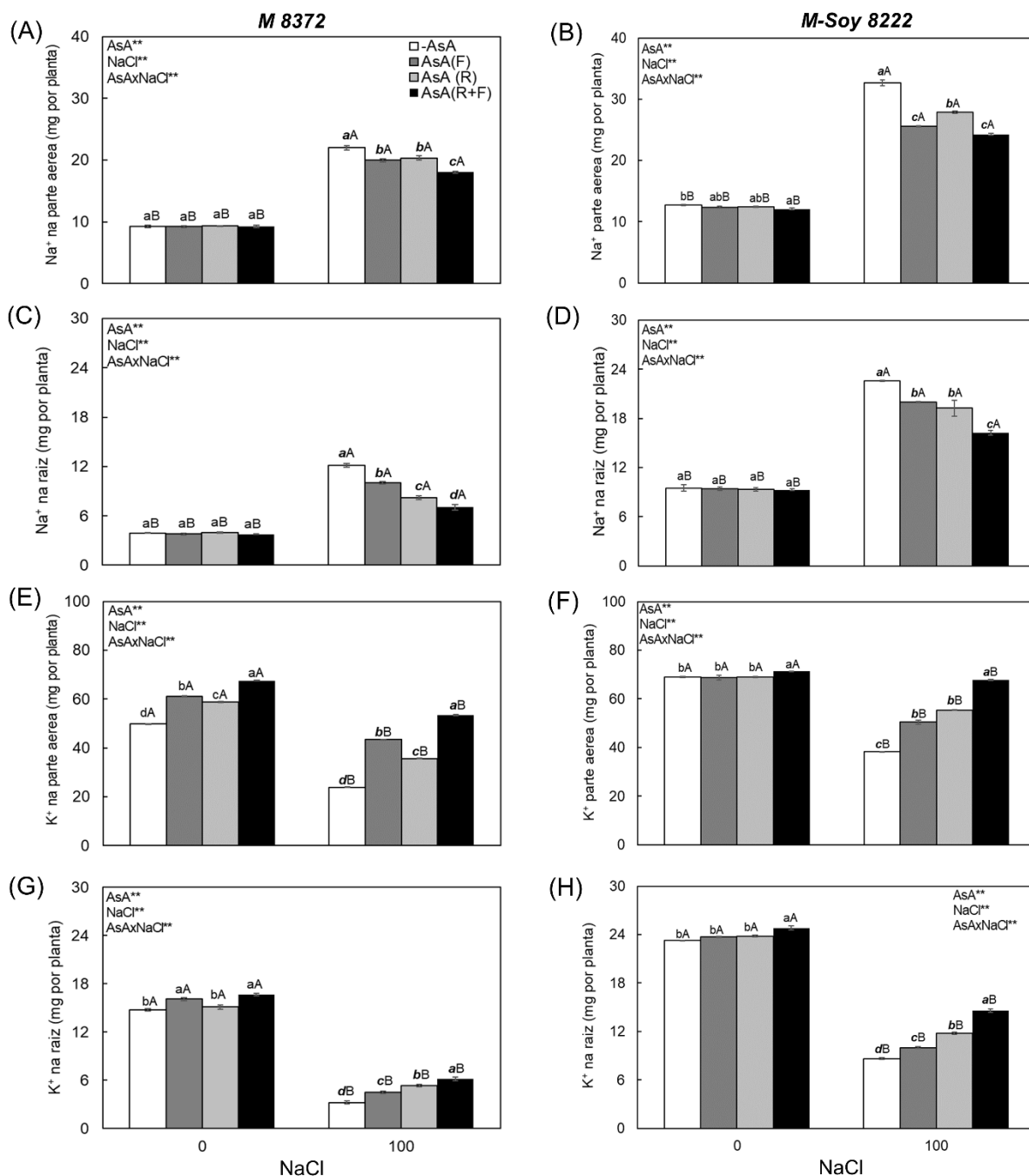


Figura 6. Acúmulo de Na⁺ na parte aérea de M 8372 (A), M-SOY 8222 (B) e na raiz de M 8372 (C), M-SOY 8222 (D); acúmulo de K⁺ na parte aérea de M 8372 (E), M-SOY 8222 (F); e na raiz M 8372 (G), M-SOY 8222 (H) cultivadas em dois níveis de NaCl (0 e 100 mmol L⁻¹) combinados com diferentes métodos de aplicação de ácido ascórbico (AsA): -AsA, controle; AsA(F), aplicação foliar de AsA; AsA(R), aplicação radicular de AsA; AsA(R+F), aplicação foliar e radicular combinada de AsA. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos sem NaCl e com NaCl no mesmo método de AsA, de acordo com o teste de Tukey. Os dados representam a média ±

EPM (n=5); *($p \leq 0,05$), **($p \leq 0,01$) de acordo com o teste F. Barras verticais representam o EPM.

4.5 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi afetada pelo efeito significativo da interação entre AsA e NaCl (Fig. 7). A aplicação de AsA(R+F) reduziu significativamente o teor de MDA nas folhas das duas cultivares expostas ao estresse salino (Fig. 7A,B). De forma geral, o teor de MDA foi maior nas raízes de M-SOY 8222 em relação a M 8372, sob condição de estresse salino e sem aplicação de AsA (Fig. 7C,D). Entretanto, a aplicação de AsA(R+F) diminuiu significativamente o teor de MDA nas raízes de M 8372 e M-SOY 8222, sob condição de salinidade.

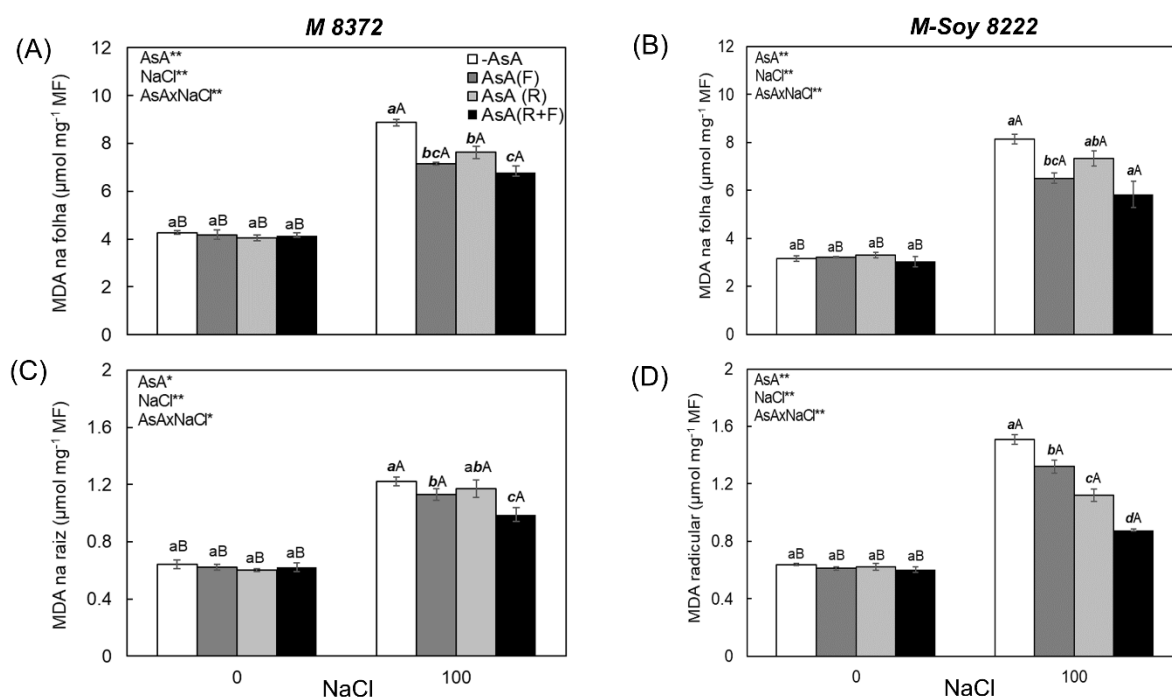


Figura 7. Teor de MDA na folha de M 8372 (A), M-SOY 8222 (B) e na raiz de M 8372 (C), M-SOY 8222 (D) cultivadas em dois níveis de NaCl (0 e 100 mmol L⁻¹) combinados com diferentes métodos de aplicação de ácido ascórbico (AsA): -AsA, controle; AsA(F), aplicação foliar de AsA; AsA(R), aplicação radicular de AsA; AsA(R+F), aplicação foliar e radicular combinada de AsA. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos sem NaCl e com NaCl no mesmo método de AsA, de acordo com o teste de Tukey. Os dados representam a média ± EPM (n=5); *($p \leq 0,05$), **($p \leq 0,01$) de acordo com o teste F. Barras verticais representam o EPM.

4.6 Atividade de enzimas antioxidantes

Um efeito significativo de interação entre o NaCl e AsA foi observado em raízes e folhas das duas cultivares para a atividade enzimática de SOD, APX e GPOX. Com relação à SOD, os métodos de aplicação AsA(F) e AsA(R+F) desencadearam um aumento na atividade enzimática nas folhas de M 8372 e M-SOY 8222, submetidas a estresse salino (Fig. 8A,B). Os métodos de aplicação de AsA aumentaram a atividade da SOD em relação ao controle (-AsA), nas raízes de M-SOY 8222 sob salinidade (Fig. 8C,D). A atividade da SOD foi maior com a aplicação de AsA(R+F) em M 8372 sob estresse salino.

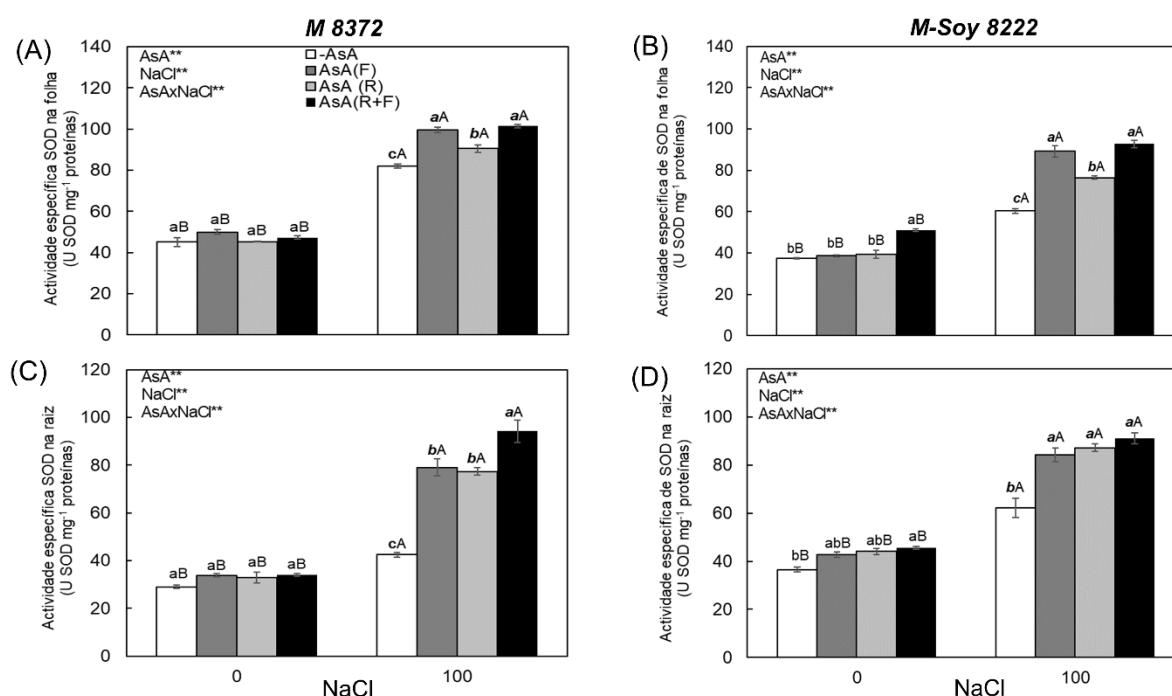


Figura 8. Atividade específica da SOD na folha de M 8372 (A), M-SOY 8222 (B) e raiz de M 8372 (C), M-SOY 8222 (D) cultivadas em dois níveis de NaCl (0 e 100 mmol L⁻¹) combinados com diferentes métodos de aplicação de ácido ascórbico (AsA): -AsA, controle; AsA(F), aplicação foliar de AsA; AsA(R), aplicação radicular de AsA; AsA(R+F), aplicação foliar e radicular combinada de AsA. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos sem NaCl e com NaCl no mesmo método de AsA, de acordo com o teste de Tukey. Os dados representam a média $\pm$ EPM (n=5); *(p $\leq$ 0,05), ** (p $\leq$ 0,01) de acordo com o teste F. Barras verticais representam o EPM.

A atividade da APX foi significativamente afetada pela interação de NaCl e AsA. As folhas e raízes das duas cultivares com aplicação de AsA exibiram aumento da atividade enzimática, com e sem estresse salino (Fig. 9). A atividade da APX foi maior com aplicação de AsA(R+F) nas folhas e raízes de M 8372 e raízes de M-SOY 8222, sob estresse salino (Fig. 9A,C,D).

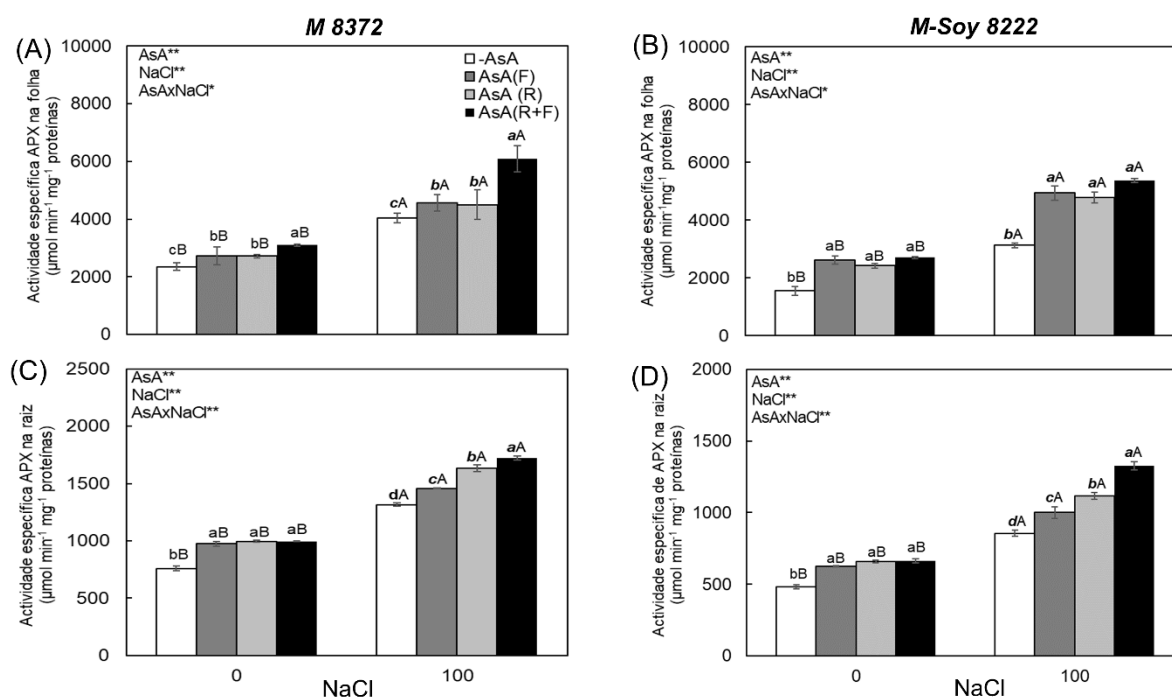


Figura 9. Atividade específica da APX na folha de M 8372 (A), M-SOY 8222 (B) e raiz de M 8372 (C), M-SOY 8222 (D) cultivadas em dois níveis de NaCl (0 e 100 mmol L⁻¹) combinados com diferentes métodos de aplicação de ácido ascórbico (AsA): -AsA, controle; AsA(F), aplicação foliar de AsA; AsA(R), aplicação radicular de AsA; AsA(R+F), aplicação foliar e radicular combinada de AsA. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos sem NaCl e com NaCl no mesmo método de AsA, de acordo com o teste de Tukey. Os dados representam a média ± EPM (n=5); *(p ≤ 0,05), **(p ≤ 0,01) de acordo com o teste F. Barras verticais representam o EPM.

Os diferentes métodos de aplicação de AsA aumentaram a atividade enzimática de GPOX nas folhas das duas cultivares sem salinidade; entretanto, houve maior atividade da GPOX com aplicação de AsA(R+F) sob estresse salino (Fig. 10A,B). A atividade da GPOX nas raízes de M 8372 e M-SOY 8222 submetidas a salinidade aumentou com o fornecimento de AsA (Fig. 10C,D).

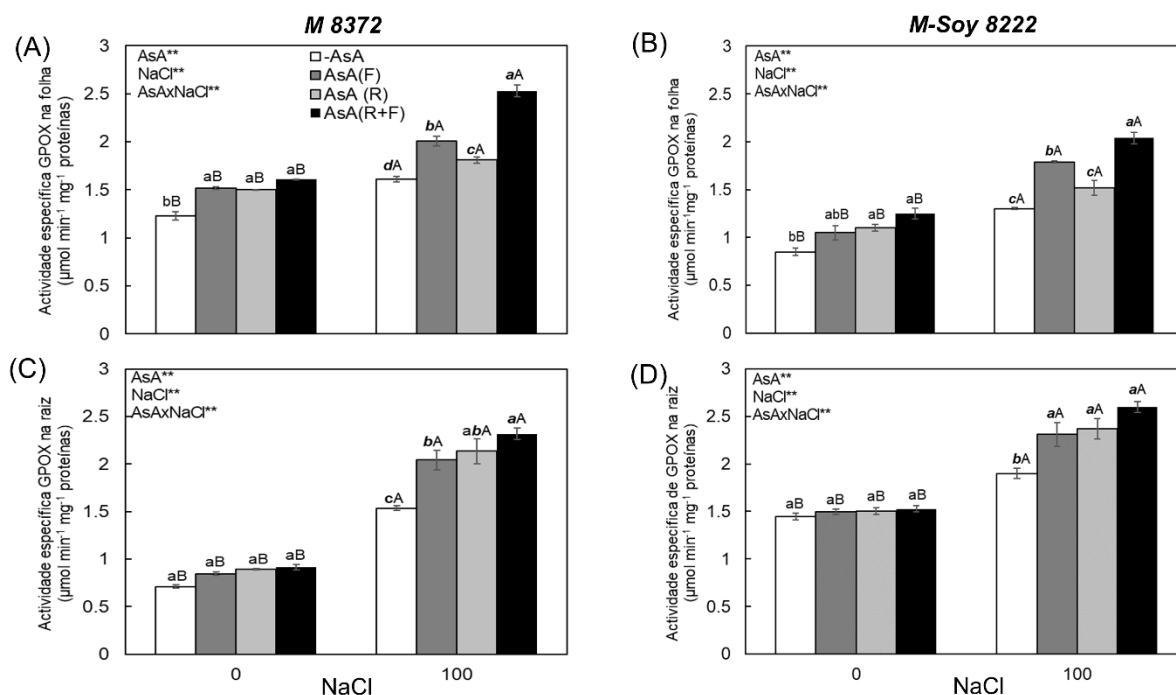


Figura 10. Atividade específica da GPOX na folha de M 8372 (A), M-SOY 8222 (B) e raiz de M 8372 (C), M-SOY 8222 (D) cultivadas em dois níveis de NaCl (0 e 100 mmol L⁻¹) combinados com diferentes métodos de aplicação de ácido ascórbico (AsA): -AsA, controle; AsA(F), aplicação foliar de AsA; AsA(R), aplicação radicular de AsA; AsA(R+F), aplicação foliar e radicular combinada de AsA. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos sem NaCl e com NaCl no mesmo método de AsA, de acordo com o teste de Tukey. Os dados representam a média, $\pm$ EPM (n=5); * (p $\leq$ 0,05), ** (p $\leq$ 0,01) de acordo com o teste F. Barras verticais representam o EPM.

4.7 Teor de prolina e ácido ascórbico

O teor de prolina e AsA nas folhas e raízes das duas cultivares, foi afetado pela interação entre AsA e NaCl (Fig11 e 12). Tanto na cultivar M 8372 como na M-SOY 8222, cultivadas sob estresse salino, a aplicação de AsA(R+F) promoveu o maior teor de prolina nas folhas e raízes (Fig. 11A,B). De forma geral, os resultados mostraram que as duas cultivares submetidas ao estresse salino exibiram maiores teores de prolina nas folhas e raízes, independentemente do método de aplicação de AsA.

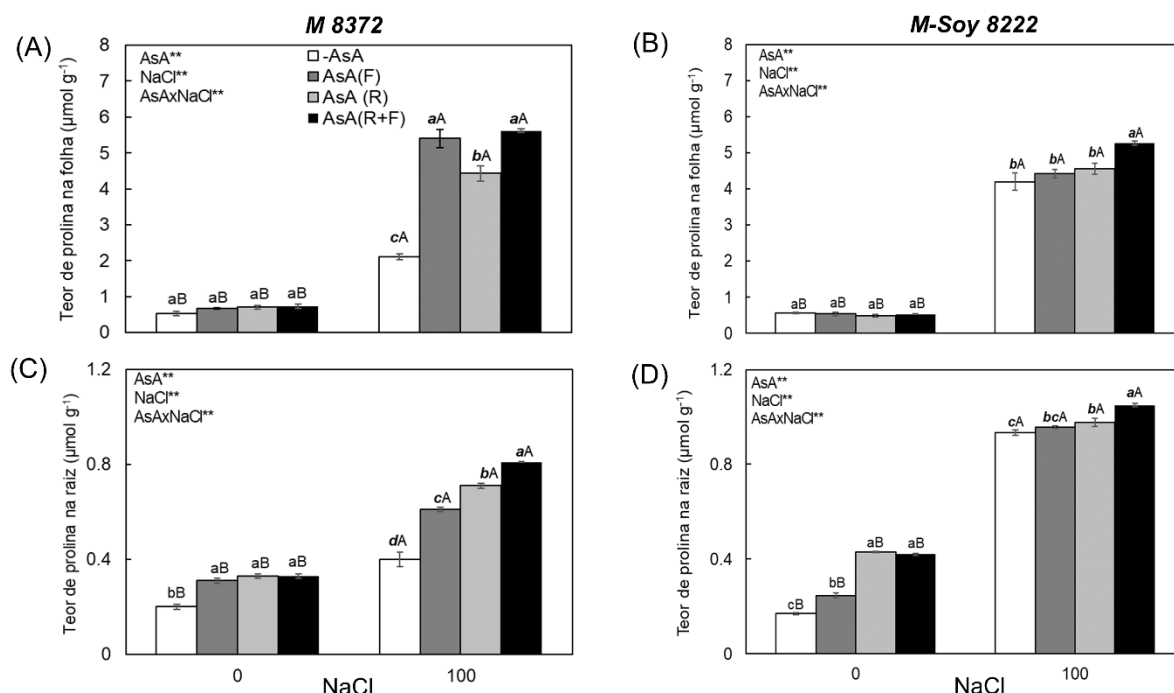


Figura 11. Teor de prolina na folha de M 8372 (A), M-SOY 8222 (B) e na raiz de M 8372 (C), M-SOY 8222 (D) cultivadas em dois níveis de NaCl (0 e 100 mmol L⁻¹) combinados com diferentes métodos de aplicação de ácido ascórbico (AsA): -AsA, controle; AsA(F), aplicação foliar de AsA; AsA(R), aplicação radicular de AsA; AsA(R+F), aplicação foliar e radicular combinada de AsA. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos sem NaCl e com NaCl no mesmo método de AsA, de acordo com o teste de Tukey. Os dados representam a média ± EPM (n=5); *(p ≤ 0,05), **(p ≤ 0,01) de acordo com o teste F. Barras verticais representam o EPM.

Os resultados do teor de AsA na planta evidenciaram em efeito de interação significativa entre AsA e NaCl. Na cultivar M 8372, sem estresse salino, todos os métodos de aplicação de AsA aumentaram significativamente o teor de AsA na folha, em relação ao controle (-AsA). No entanto, na cultivar M-SOY 8222, o tratamento de AsA (R+F) promoveu o maior teor de AsA na folha (Fig. 12A,B). Tanto na cultivar M 8372 como na M-SOY 8222, cultivadas sob estresse salino, a aplicação de AsA(R+F) promoveu o maior teor de AsA nas folhas (Fig. 12A,B). O teor de AsA foi promovido com a aplicação de AsA(R+F) nas raízes da cultivar M 8372 submetida a estresse salino. No entanto, na cultivar M-SOY 8222, os tratamentos AsA(R) e AsA(R+F) aumentaram significativamente o teor de AsA na raiz, sob condição de salinidade (Fig. 12C,D).

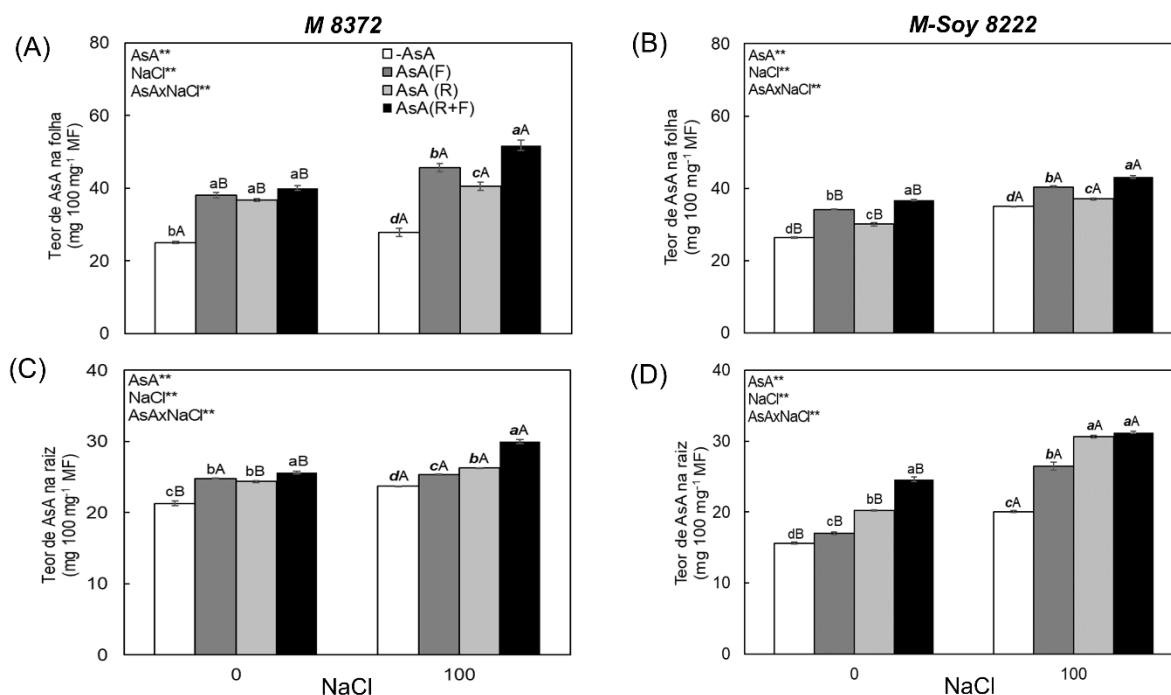


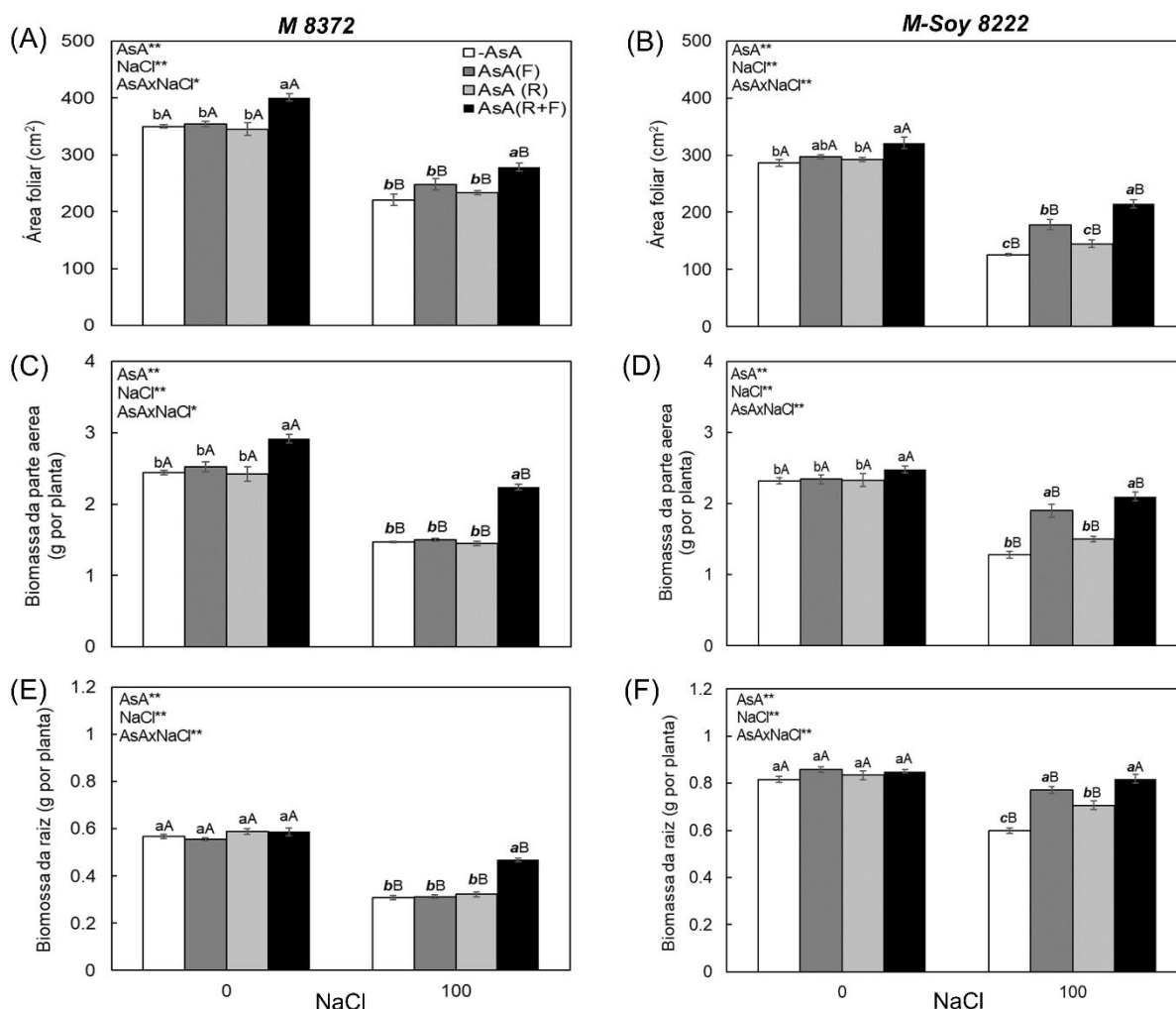
Figura 12. Teor de AsA na folha de M 8372 (A), M-SOY 8222 (B) e na raiz de M 8372 (C), M-SOY 8222 (D) cultivadas em dois níveis de NaCl (0 e 100 mmol L⁻¹) combinados com diferentes métodos de aplicação de ácido ascórbico (AsA): -AsA, controle; AsA(F), aplicação foliar de AsA; AsA(R), aplicação radicular de AsA; AsA(R+F), aplicação foliar e radicular combinada de AsA. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos sem NaCl e com NaCl no mesmo método de AsA, de acordo com o teste de Tukey. Os dados representam a média ± EPM (n=5); *(p ≤ 0,05), **(p ≤ 0,01) de acordo com o teste F. Barras verticais representam o EPM.

4.8 Área foliar e produção de biomassa

As plantas apresentaram redução na área foliar e biomassa da parte aérea e raiz na presença de 100 mmol L⁻¹ de NaCl, quando comparadas com o tratamento sem sal (Fig. 13). Na cultivar M 8372, a aplicação de AsA(R+F) aumentou significativamente a área foliar, tanto na condição de estresse salino e sem sal (Fig. 13A). Na cultivar M-SOY 8222, o tratamento AsA(R+F) aumentou a área foliar sob salinidade (Fig. 13A,B).

A biomassa da parte aérea e raiz foi significativamente afetada pela interação dos fatores AsA e NaCl (Fig. 13C,D,E,F). A cultivar M 8372 submetida a salinidade, exibiu maior biomassa da parte aérea e raiz quando foi aplicado o tratamento AsA(R+F) (Fig. 13C,E). Por outro lado, sob condição de estresse salino, os

tratamentos AsA(F) e AsA(R+F) promoveram a produção de biomassa da parte aérea e raiz de M-SOY 8222 (Fig. 13D,F). De forma geral, os resultados mostraram que as duas cultivares submetidas ao estresse salino exibiram redução da biomassa da planta, independentemente do método de aplicação de AsA.



5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo evidenciaram o efeito de diferentes métodos de aplicação de AsA na atenuação do estresse oxidativo causado pela salinidade em duas cultivares de soja com diferente grau de tolerância à salinidade, como M 8372 (cv. tolerante) e M-SOY 8222 (cv. sensível). Estudos anteriores indicaram o efeito do AsA em plantas de soja submetidas a estresse abiótico (El-Shafey, 2017; Rahmawati e Basyuni, 2014), no entanto, este é o primeiro trabalho em que o AsA atenuou os danos causados pelo estresse salino através da aplicação radicular e foliar combinada ou aplicação isolada em plantas de soja.

O conteúdo relativo de água (CRA) e a eficiência de uso da água (EUA) são componentes fisiológicos que podem ser afetados pelo estresse salino. O estresse osmótico gerado pela salinidade representa o estresse abiótico severo mais comum que limita o crescimento e desenvolvimento das plantas (Koyro, 2006). Nossos resultados indicaram que as cultivares de soja expostas ao estresse salino (100 mmol L⁻¹ NaCl) apresentaram CRA e EUA reduzido; entretanto, os diferentes métodos de aplicação de AsA tiveram um efeito positivo no aumento do CRA e EUA (Fig. 2). Sob condições sem salinidade, a aplicação de AsA teve efeito sobre o CRA e EUA apenas na cultivar M-SOY 8222. Um provável mecanismo sobre o efeito do AsA na manutenção do status hídrico na planta pode ser explicado pelo fato da melhoria do potencial de turgescência que favorece o equilíbrio de água nos tecidos da planta (El-Bially et al., 2018). Além disso, tem sido indicado que o AsA promove a resistência da parede celular e sua capacidade de suportar à perda de água sob condições de estresse abiótico (Naz et al., 2016).

Os dados ilustrados na Fig. 3 mostraram que o estresse salino, isto é, 100 mmol L⁻¹ NaCl, diminuiu os teores de pigmentos fotossintéticos. O estresse salino afeta a taxa fotossintética das plantas, devido à degradação dos pigmentos fotossintéticos, que por sua vez, afeta o crescimento das plantas (Gomes et al., 2017). Nossos resultados revelaram que, sob estresse salino, o fornecimento de AsA(R+F) aumentou o teor de clorofila e carotenoides na cultivar tolerante (M 8372); entretanto, na cultivar sensível (M-SOY 8222) tanto a aplicação de AsA(F) como AsA(R+F) favoreceram o aumento destes pigmentos. Esses resultados coincidem com achados anteriores (Hassan et al., 2021; Hussain et al., 2017; Kostopoulou et

al., 2015), e pode ser explicado pelo papel do AsA na proteção da integridade da membrana do cloroplasto e na degradação da clorofila (Gadallah, 1999). Além disso, o AsA é um cofator de várias reações enzimáticas fotossintéticas, que podem atuar no estímulo do crescimento das plantas (Wang et al., 2013; Alves et al., 2021).

Como consequência do dano causado pela salinidade sobre a produção de pigmentos fotossintéticos, o estresse salino também pode afetar o funcionamento dos centros de reação PSI e PSII no aparato fotossintético (Sayyad-Amin et al., 2016; Foyer, 2015). Os danos causados pelo estresse salino ao aparato fotossintético foram documentados anteriormente (Läuchli Lüttgel, 2014; Lu et al., 2003; Lu e Vonshak, 2002), e envolvem processos como a degradação e limitação da biossíntese de clorofila, devido ao excesso de energia que não pode ser convertido em fluxo de elétrons.

Com base em nossos resultados, podemos indicar que a aplicação de AsA(R+F) para M 8372, e AsA(F) mais AsA(R+F) para M-SOY 8222, foram eficientes em aumentar a eficiência fotoquímica do PSII (F_v/F_m) sob estresse salino (Fig. 4A,B). Além disso, a taxa de transporte de elétrons (F_v/F_0) foi maior com aplicação de AsA(R+F) nas duas cultivares (Fig. 4C,D). Sabemos que o estresse salino provoca o acúmulo de ERO que levam à inativação do centro de reação doador de elétrons PSII (Murata et al., 2007). Esse processo é conhecido também como fotoinibição. Diante disso, tem sido caracterizado ao AsA como um grande doador de elétrons alternativos para o PSII para sustentar atividades de transporte de elétrons nas folhas (Tóth et al., 2009, 2011). Essa doação alternativa de elétrons poderia ser entendida, em outras palavras, como um efeito benéfico do AsA em proteger os centros de reação da fotoxidação (Mano et al., 1997).

As respostas das plantas ao estresse abiótico geralmente são exploradas a nível das características funcionais do aparato fotossintético. Portanto, além do teor de pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila, medições a nível de trocas gasosas da folha fornecem um importante entendimento sobre o status fisiológico das plantas. Assim, o estresse salino afeta a capacidade de absorção de água pela planta (Yarami e Sepaskhah, 2015), diminui a taxa de assimilação de CO_2 , a condutância estomática e, consequentemente, o crescimento e desenvolvimento das plantas (Sperling et al., 2014; Naz et al., 2010). Isso pode ser devido ao estresse

oxidativo promovido e à degradação de pigmentos fotossintéticos e proteínas que participam no processo fotossintético (Flexas et al., 2004).

Nossos resultados mostraram que o impacto negativo do estresse salino sobre os parâmetros de trocas gasosas das folhas, pode ser superado pela aplicação de AsA. A aplicação de AsA(R+F) aumentou a taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*) para M 8372, e AsA(F) e AsA(R+F) para M-SOY 8222, sob estresse salino (Fig. 5A,B). Além disso, mesmo sem condições de estresse, a aplicação de AsA(R+F) teve efeito no aumento de *A* nas duas cultivares. Resultados semelhantes foram relatados em trigo e pepino (Naz et al., 2016; Athar et al., 2008), uma vez que as plantas que receberam aplicação de AsA aumentaram os valores de *A*. Isso é de notável importância para aliviar os efeitos negativos do estresse salino na redução da taxa fotossintética em cultivares de soja contrastantes à salinidade.

Paralelamente ao aumento de *A*, a aplicação de AsA(R+F) aumentou a condutância estomática (*g_s*) apenas na cultivar M-SOY 8222, sob salinidade. Esse fato é apoiado pelo papel do AsA na diminuição dos níveis de H₂O₂ que, por sua vez, poderia causar o fechamento estomático (Noctor e Foyer, 1998), e na manutenção da homeostase da água (Athar et al., 2008). Estudos anteriores também relataram que o fechamento estomático pode ser revertido pela aplicação exógena de AsA (Athar et al., 2008; Bastam et al., 2013). Por outro lado, o estresse salino é conhecido por causar uma redução significativa da taxa de transpiração (*E*) das plantas (Ali e Ashraf 2011). Neste estudo, o estresse salino causou uma redução acentuada na *E*, porém, a aplicação de AsA(R+F) em M 8372 e AsA(F) mais AsA(R+F) em M-SOY 8222, mitigaram os efeitos adversos da salinidade na transpiração (Fig. 5E,F). O papel benéfico do AsA sobre o processo transpiratório já foi indicado anteriormente (Miguel, 2006). Nosso estudo revelou que em M-Soy 8222, sob estresse salino, o aumento na *E* com a aplicação de AsA, foi associado a uma maior EUA (Fig. 1D), o que promoveu maior *A*. Contrariamente, a aplicação de AsA(R+F) ao promover maior *E* e *A*, não afetou a EUA de M 8372 (Fig. 2C). Isso concorda com outros estudos onde a aplicação de AsA aumentou a *E* (Penella et al., 2017; Biosci et al., 2014), mas discorda de estudos onde o aumento da EUA esteve associado a uma menor *E* causada pelo AsA (Beltagi, 2008; Ekmekçi, 2012).

As pesquisas têm demonstrado claramente que a salinidade leva à redução da biossíntese de clorofila e parâmetros de troca gasosas da folha, o que promove uma menor taxa fotossintética. Nesse sentido, as medições a nível de atividade fotossintética, até certo ponto, podem fornecer uma ideia sobre a tolerância que os genótipos de uma espécie têm contra o estresse salino. Valores maiores da fluorescência da clorofila (F_v/F_m , F_v/F_0) também têm sido indicados como uma razão para o aumento da tolerância do aparato fotossintético ao estresse salino (Huang et al., 2019; Umar et al., 2019). Os resultados deste estudo sugerem que as alterações na fotossíntese em M 8372 sob estresse salino, não foram decorrentes de limitações estomáticas, visto que, as mudanças induzidas por AsA em A não foram acompanhadas por alterações em g_s . De forma contrária, em M-SOY 8222 as alterações na fotossíntese foram decorrentes da g_s , F_v/F_m e F_v/F_0 , sob estresse salino.

Dessa forma, fica evidenciado que, mudanças a nível fotossintético na cultivar sensível (M-SOY 8222), devido aos efeitos interativos da salinidade e o AsA, dependem de melhorias a nível estomático e da fluorescência da clorofila (Fig. 4 e 5); entretanto, na cultivar tolerante (M 8372) esses efeitos podem ter ocorrido devido a fatores não estomáticos, como o nível de resposta do aparato fotossintético (Fig. 3). Por outro lado, a eficácia do efeito de proteção do AsA na fotossíntese depende também do método de fornecimento de AsA, visto que, na cultivar sensível (M-SOY 8222) tanto a aplicação de AsA(F) como AsA(R+F) aumentaram a F_v/F_m , o teor de pigmentos fotossintéticos, E e A , enquanto que, para a cultivar tolerante (M 8372) houve melhoria de F_v/F_m , maior teor de pigmentos, E e A com AsA (R+F). Juntos, esses resultados indicam uma maior capacidade de resposta a nível fisiológico à aplicação exógena de AsA na cultivar de soja sensível à salinidade.

A salinidade pode induzir estresse osmótico que promove o acúmulo de íons tóxicos na planta, como o Na^+ e Cl^- (Bonomelli et al., 2018; Marschner e Rengel, 2012). Um alto acúmulo de Na^+ nos tecidos, pode afetar a homeostase iônica de outros nutrientes como o K^+ , reduzindo seu acúmulo na planta (Alves et al., 2018). O acúmulo de sais nos tecidos pode causar efeitos tóxicos nas plantas e promover um desequilíbrio nutricional, afetando diretamente o metabolismo e crescimento das plantas (Parihar et al., 2015; Akram et al., 2017). Nosso trabalho revelou que, sob

condição de estresse salino houve maior acúmulo de Na^+ na parte aérea e raiz de ambas as cultivares; entretanto, os métodos de aplicação de AsA reduziram esses níveis de Na^+ (Fig. 6A,B,C,D), o que favoreceu simultaneamente o acúmulo de K^+ na planta (Fig. 6E,F,G,H). Além disso, o AsA está envolvido na regulação do sistema de defesa antioxidante, com capacidade de evitar altas concentrações de Na^+ (Gallie, 2013; Alves et al., 2021), consequentemente, como o Na^+ compete por locais de ligação com o K^+ (Dabravolski e Isayenkov, 2021), um fator de proteção seria o alto acúmulo de K^+ nos tecidos, como evidenciado neste estudo.

Além dos parâmetros fisiológicos, como a fluorescência da clorofila e trocas gasosas, a exclusão de íons de Na^+ nos tecidos é um dos principais mecanismos de tolerância à salinidade (Kostopoulou et al., 2015). Nosso estudo demonstrou que a tolerância das cultivares de soja induzida pelo AsA, foi relacionada ao baixo acúmulo de Na^+ na parte aérea. No entanto, respostas contrastantes entre as cultivares de soja indicam que, independentemente do método de aplicação de AsA, houve maior acúmulo de Na^+ nos tecidos da cultivar sensível em relação à tolerante. Isso pode ser indicativo de um mecanismo de tolerância próprio da cultivar M 8372 (Vasconcellos, 2016). Essas respostas diferenciais de ambas as cultivares de soja à aplicação de AsA sob estresse salino, dependeram também do método de aplicação de AsA. Tanto a aplicação de AsA(F) como AsA(R+F) tiveram o mesmo efeito em promover a maioria dos parâmetros fisiológicos, reduzir os níveis de Na^+ de M-SOY 8222; entretanto, esses mesmos mecanismos foram melhorados principalmente com a aplicação de AsA(R+F) em M 8372.

A redução da atividade fotossintética causada pelo estresse salino expõe os cloroplastos a energia de excitação excessiva, o que induz o estresse oxidativo devido à superprodução de ERO que promovem a peroxidação lipídica (Penella et al., 2017). De acordo com nosso estudo, os métodos de aplicação de AsA reduziram a peroxidação lipídica, representada pelos teores de MDA, na parte aérea e raiz das cultivares de soja (Fig. 7). Esses resultados estão de acordo com outros (Weisany et al., 2012; Hameed et al., 2015; Penella et al., 2017), que concordam que o AsA por ser o antioxidante mais abundante nas plantas possui um poderoso potencial no controle da formação e eliminação de ERO. Além disso, o papel antioxidante do AsA

nas células vegetais é devido a sua grande capacidade de doar elétrons para as reações enzimáticas e não enzimáticas (Racchi, 2013).

Os efeitos das ERO induzidas pelo estresse salino são atenuados pela atividade de componentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Entre os antioxidantes enzimáticos que estão na primeira linha para proteger as plantas de condições de estresse abiótico estão a SOD, POD, CAT e APX (Wang et al., 2013; Bose et al., 2014). Nosso estudo demonstrou que o estresse salino aumentou significativamente a atividade das enzimas SOD (Fig. 8), APX (Fig. 9) e GPOX (Fig. 10) nas duas cultivares, que são um mecanismo de proteção das plantas sob estresse (Park, 2005). No entanto, a aplicação de AsA(F) e AsA(R+F) aumentaram significativamente a atividade da SOD nas duas cultivares de soja sob estresse salino (Fig. 8). O aumento da atividade da SOD com aplicação de AsA sob condições de estresse foi indicado anteriormente em outras culturas (Alamri et al., 2018; Noreen et al., 2020). Esse efeito do AsA sobre a SOD evidencia a eficiência das aplicações foliares de AsA no funcionamento do sistema primário de defesa das plantas contra o estresse salino, visto que, o AsA pode converter radicais livres como superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em formas mais estáveis como H_2O_2 (Akram et al., 2017; Farooq et al., 2020).

A atividade da APX (Fig. 9) e GPOX (Fig. 10) aumentou significativamente quando foi fornecido AsA(R+F) nas duas cultivares sob estresse salino. O aumento na atividade destas enzimas indicou uma melhoria no sistema de defesa da planta contra o estresse oxidativo gerado pela salinidade (Roy et al., 2016). Além disso, a APX é muito eficiente na desintoxicação do H_2O_2 e oxigênio molecular utilizando o AsA como fonte de elétrons (Shigeoka et al., 2002). Pesquisas recentes destacaram principalmente o efeito das aplicações foliares de AsA e sua influência na ativação da APX e GPOX (Hassan et al., 2021; Khazaei e Estaji, 2020; Desoky et al., 2020). Nossos resultados mostram que as aplicações de AsA podem ter modificado a capacidade antioxidante da soja, uma vez que, independentemente da cultivar, as plantas tratadas com AsA resultaram em níveis baixos de MDA, portanto, sistemas antioxidantes enzimáticos foram estimulados com aplicação de AsA sob estresse salino.

Outro papel importante do AsA na redução da peroxidação lipídica é o aumento da atividade do metabolismo antioxidante não enzimático, que também diminui a geração de ERO (Hayat, 2012). A prolina é um dos osmoprotetores mais importantes produzidos nas plantas em resposta ao estresse. Seu papel benéfico está relacionado à sua função como soluto compatível e fonte de energia para as plantas durante condições de estresse (Ashrafe Foolad, 2007; Ashraf et al., 2012). O teor de prolina geralmente aumenta em resposta ao estresse salino (Malik et al., 2015), fato observado no presente estudo (Fig. 11). No entanto, o fornecimento de AsA promoveu o teor de prolina nas plantas sob condição de estresse salino. Esses achados concordam com outras pesquisas (Hussain et al., 2017; Penella et al., 2017), que corroboraram o efeito benéfico das aplicações foliares de AsA no acúmulo de prolina durante o estresse oxidativo. Além disso, nosso estudo evidenciou que a cultivar M 8372 apresentou aproximadamente o dobro de teor de prolina na folha ($4,2 \text{ umol g}^{-1}$) em relação a M-SOY 8222 ($2,1 \text{ umol g}^{-1}$), sob estresse salino e sem aplicação de AsA. Estudos anteriores também relataram que o teor de prolina foi maior em genótipos tolerantes em comparação com os sensíveis, sob condições de estresse abiótico (Dolatabadian et al., 2008; Sairam e Saxena, 2000).

Uma atividade simultânea de antioxidantes é indicada como necessária para uma resposta rápida das plantas contra o estresse salino (Pentella, 2017). Nosso experimento mostrou que todos os métodos de aplicação de AsA efetivamente aumentaram o teor de AsA na folha e raiz das cultivares de soja em relação ao controle (-AsA) (Fig. 12). No entanto, o teor de AsA nestes tecidos foi superior quando as plantas receberam aplicação de AsA(R+F) e sob condições de salinidade. O ascorbato é denominado como a forma fisiologicamente ativa do AsA (Akram et al., 2017), e o cloroplasto é provavelmente o local mais abundante deste composto (Castro et al., 2018). Portanto, o teor de ácido ascórbico nos cloroplastos pode ser aumentado devido à aplicação exógena de AsA que, por sua vez, pode resultar como determinante na sinalização do estresse oxidativo (Gallie, 2013). Além disso, o AsA está envolvido na regulação dos processos de desenvolvimento da planta através da modulação do metabolismo antioxidante mantendo os níveis de ROS dentro da capacidade tolerável pelas plantas (Pignocchi et al., 2006; Shao et al., 2008).

Finalmente, nosso estudo demonstrou que a aplicação de AsA promoveu a produção de biomassa e crescimento das plantas de soja sob estresse salino (Fig. 13). Esse fato poderia ter relação como o papel do AsA na divisão e expansão celular através da regulação dos níveis de auxinas nas plantas (Arrigoni e Tullio 2000; Akram et al., 2017). Sob outra perspectiva, baseado na hipótese deste estudo, o efeito do AsA sobre o crescimento das plantas de soja crescendo sob salinidade poderia ser explicado, principalmente, pelo seu efeito em modular as mudanças induzidas pelo estresse salino, por meio do aumento de pigmentos fotossintéticos que pode evitar danos do aparato fotossintético e pela regulação a nível de trocas gasosas que finalmente promoveu maior taxa fotossintética e, portanto, o crescimento da soja (Fig. 14). Esses resultados também podem estar associados à redução do acúmulo de Na^+ nos tecidos e ao aumento da atividade enzimática e não enzimática promovida pelo AsA, que levaram à redução da peroxidação lipídica e dano oxidativo. Nossos resultados indicam que esses efeitos benéficos do AsA na atenuação do estresse por salinidade foram maiores quando o AsA foi fornecido via aplicação foliar e radicular combinada na cultivar tolerante (M 8372); entretanto, apenas aplicações foliares de AsA poderiam ser suficientes para promover os mecanismos de resposta fisiológicos e bioquímicos na cultivar sensível (M-SOY 8222). Portanto, um longo caminho para explorar novas abordagens além do fisiológico e bioquímico, ou seja, o impacto do AsA à nível molecular, metabólico, genômico ou interação com outros compostos antioxidantes é necessário para compreender melhor o efeito do AsA como atenuador de estresses abióticos nos sistemas biológicos.

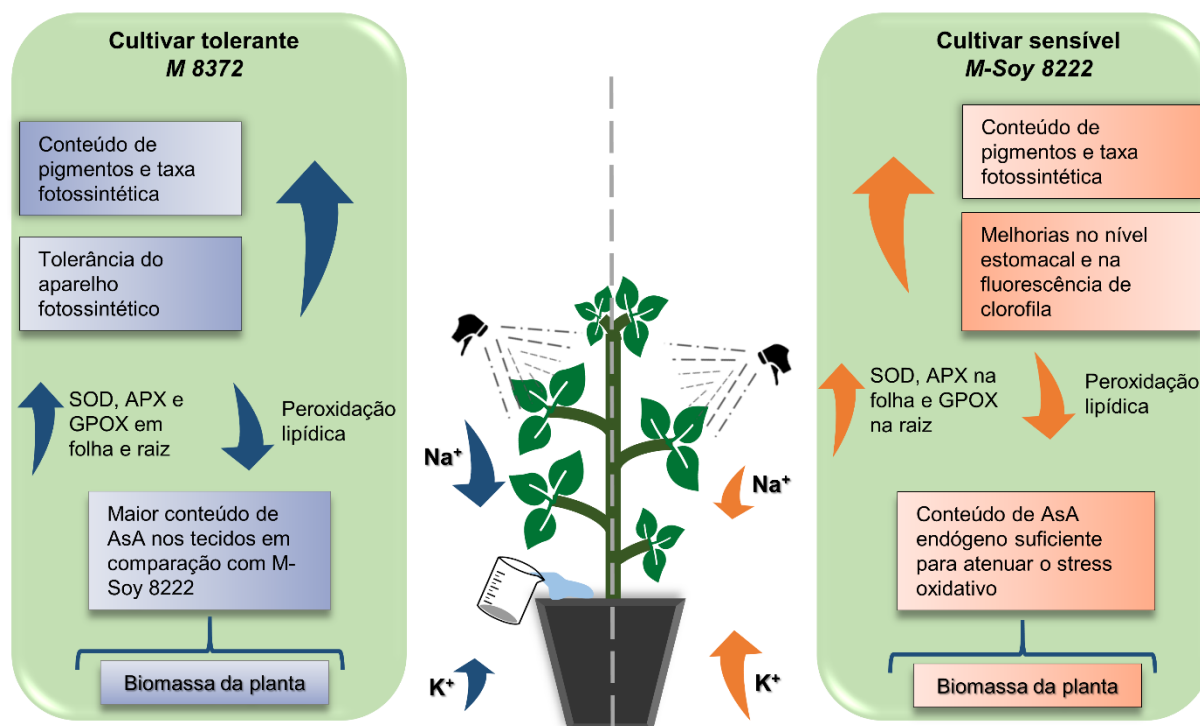


Figura 14. Desempenho do AsA em atenuar o estresse causado pelo NaCl em duas cultivares de soja contrastantes à salinidade.

6 CONCLUSÃO

O AsA regula as respostas fisiológicas e bioquímicas de cultivares de soja ao estresse salino. Os efeitos deletérios do estresse salino foram atenuados quando o AsA foi aplicado via foliar na cultivar sensível (M-SOY 8222), e via foliar e radicular combinada na cultivar tolerante (M 8372), através da modulação dos mecanismos antioxidantes, maior EUA e pigmentos fotossintéticos que, conseqüentemente, promoveram o crescimento das plantas. Isso sugere que o método de aplicação de AsA desempenha um papel importante na redução da peroxidação lipídica e acúmulo de Na^+ , modificando o sistema de defesa antioxidante de cultivares de soja tolerante e sensível.

7 REFERÊNCIAS

- Abdel, L.; hamend, L. et al., 2020. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* or *Azotobacter chroococcum* Reinforces maize growth by improving physiological activities under saline conditions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 3, p. 1293–1306.
- Abdelrahman, M. et al., 2020. Heat stress effects on source-sink relationships and metabolome dynamics in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 2, p. 543–554.
- Adhikari, B.; Dhungana, S. K.; Kim, L. D.; Shin, D. H. 2020. Effect of foliar application of potassium fertilizers on soybean plants under salinity stress. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 19, n. 4, p. 261–269.
- Agami, R. A. 2014. Applications of ascorbic acid or proline increase resistance to salt stress in barley seedlings. **Biologia Plantarum**, v. 58, n. 2, p. 341–347.
- Ahmad, P.; Ahanger, M. A.; Alam, P.; Alyemeni, M. N.; Wijaya, L.; Ali, S.; Ashraf, M. 2019. Silicon (Si) supplementation alleviates nacl toxicity in mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] through the modifications of physio- biochemical attributes and key antioxidant enzymes. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 38, n. 1, p. 70–82.
- Akond, M. et al., 2018. Detection of QTL underlying seed quality components in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 98, n. 4, p. 881–888.
- Akram, N. A.; Shafiq, F.; Ashraf, M. 2017. Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 613.
- Alamri, S. A., et al., 2018. Ascorbic acid improves the tolerance of wheat plants to lead toxicity. **Journal of Plant Interactions**, v. 13, n. 1, p. 409–419.
- Alhasnawi, A. N. et al., 2016. Enhancement of antioxidant enzyme activities in rice callus by ascorbic acid under salinity stress. **Biologia Plantarum**, v. 60, n. 4, p. 783–787.
- Ali, Q.; Ashraf, M. 2011. Induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: Growth, photosynthesis, water relations and oxidative defence mechanism. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 197, n. 4, p. 258–271.

Alves, R. DE C. et al., 2018. Influence of partial root-zone saline irrigation management on tomato yield and fruit quality from a potted-plant study. **HortScience**, v. 53, n. 9, p. 1326–1331.

Alves, R. DE C. et al., 2021. Seed priming with ascorbic acid enhances salt tolerance in micro-tom tomato plants by modifying the antioxidant defense system components. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, n. 2021, p. 101927.

Arrigoni, O.; De Tullio, M. C. 2000. The role of ascorbic acid in cell metabolism: Between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, n. 5, p. 481–488.

Ashraf, M. A.; Ashraf, M.; Shahbaz, M. 2012. Growth stage-based modulation in antioxidant defense system and proline accumulation in two hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars differing in salinity tolerance. **Flora: Morphology, Distribution Functional Ecology of Plants**, v. 207, n. 5, p. 388–397.

Ashraf, M.; Foolad, M. R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 206–216.

Athar, H. Ur R.; Khan, A.; Ashraf, M. 2008. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, n. 1–3, p. 224–231.

Barbosa, J.; Maldonado, W. 2015. AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos. **Gráfica Multipress Ltda**. Jaboticabal.

Barrs, H.; Weatherley, P. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. **Australian Journal of Biological Sciences**, n. 15, p. 413–428.

Bastam, N.; Baninasab, B.; Ghobadi, C. 2013. Interactive effects of ascorbic acid and salinity stress on the growth and photosynthetic capacity of pistachio (*Pistacia vera* L.) seedlings. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 88, n. 5, p. 610–616.

Beltagi, M. 2008. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) induced anabolic changes for salt tolerance in chick pea (*Cicer arietinum* L.) plants. **African Journal of Plant Science**, v. 2, n. 10, p. 118–123.

Billah, M. et al., 2017. Exogenous ascorbic acid improved tolerance in maize (*Zea mays* L.) by increasing antioxidant activity under salinity stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 17, p. 1437–1446.

Bilska, K. et al., 2019. Ascorbic acid — The little-known antioxidant in woody plants. **Antioxidants**, v. 8, n. 645, p. 1–23.

Biosci, I. J. et al., 2014. Influences of ascorbic acid and gibberellin on alleviation of salt stress in summer savory (*Satureja hortensis* L.). **International Journal of Biosciences** (IJB), v. 5, n. 4, p. 245–255.

Boaretto, L. F. et al., 2014. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 74, p. 165–175.

Bonomelli, C. et al., 2018. Salt stress effects on avocado (*Persea americana* mill.) plants with and without seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) application. **Agronomy**, v. 8, n. 5, p. 64.

Bose, J.; Rodrigo-Moreno, A.; Shabala, S. 2014. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 5, p. 1241–1257.

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**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254.

Bustingorri, C.; Lavado, R. S. 2011. Soybean growth under stable versus peak salinity. *Scientia Agricola*, v. 68, n. 1, p. 102–108.

Carillo, P. et al., 2019. Morpho-anatomical, physiological and biochemical adaptive responses to saline water of *Bougainvillea spectabilis* Willd. trained to different canopy shapes. **Agricultural Water Management**, v. 212, p. 12–22.

Carmo, C. A. F. De S. Do et al., Métodos de Análises de Tecidos Vegetais Utilizados na Embrapa Solos. **Embrapa solos-Circular Técnica** (INFOTECA-E).

Castro, J. L. S. et al., 2018. Ascorbic acid toxicity is related to oxidative stress and enhanced by high light and knockdown of chloroplast ascorbate peroxidases in rice plants. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 30, n. 1, p. 41–55.

Cattelan, A. J.; Dall'agnol, A. 2018. The rapid soybean growth in Brazil. **OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids**, v. 25, n. 1, p. 1–12.

Checchio, M. V. et al., 2021. Enhancement of salt tolerance in corn using *Azospirillum brasilense*: an approach on antioxidant systems. **Journal of Plant Research**, p. 1–11.

Choudhury, F. K. et al., 2017. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 856–867.

CONAB. Décimo levantamento da safra de grãos 2019/2020. **Reporte**.

Dabravolski, S. A.; Isayenkov, S. V. 2021. Evolution of plant Na⁺-p-type atpases: From saline environments to land colonization. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 1–18.

Dehnadl, N. et al., 2020. Roles of ascorbic acid on physiological, biochemical, and molecular system of *Lycopersicon esculentum* Mill. against salt stress. **Iranian Journal of Plant Physiology**, v. 11, n. 1, p. 3457–3464.

Desoky, E. S. M. et al., 2020a Plant growth-promoting rhizobacteria: Potential improvement in antioxidant defense system and suppression of oxidative stress for alleviating salinity stress in *Triticum aestivum* (L.) plants. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 30, n. September, p. 101878.

Desoky, E. S. M. et al., 2020b. Improvement of drought tolerance in five different cultivars of *Vicia faba* foliar application of ascorbic acid or silicon. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 18, n. 2, p. 1–20.

Dolatabadian, A.; Sanavy, S. A. M. M.; Chashmi, N. A. 2008. The effects of foliar application of ascorbic acid (vitamin C) on antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and proline accumulation of canola (*Brassica napus* L.) under conditions of salt stress. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 194, n. 3, p. 206–213.

Dumanović, J. et al., 2021. The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: a concise overview. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. January.

Ekmekçi, B. 2012. Exogenous ascorbic acid increases resistance to salt of *Silybum marianum* (L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 42, p. 9932–9940.

El-bially, M. et al., 2018. Efficacy of ascorbic acid as a cofactor for alleviating water deficit impacts and enhancing sunflower yield and irrigation water–use efficiency. **Agricultural Water Management**, v. 208, p. 132–139.

El-shafey, A. 2017. Response of soybean to water stress conditions and foliar application with salicylic and ascorbic acids. **Zagazig Journal of Agricultural Research**, v. 44, n. 1, p. 1–22.

Ebrahimian, E. 2012. Effect of salinity, salicylic acid, silicium and ascorbic acid on lipid peroxidation, antioxidant enzyme activity and fatty acid content of sunflower. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 25, p. 3685–3694.

EMBRAPA. 2019. História da soja. **Resporte**.

Etesami, H.; Beattie, G. A. 2018. Mining halophytes for plant growth-promoting halotolerant bacteria to enhance the salinity tolerance of non-halophytic crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1–20.

Farooq, A. et al., 2020. Exogenously applied ascorbic acid-mediated changes in osmoprotection and oxidative defense system enhanced water stress tolerance in different cultivars of safflower (*Carthamus tinctorious* L.). **Plants**, v. 9, n. 1, p. 1–15.

Farouk, S. 2011. Ascorbic acid and α -tocopherol minimize salt-induced wheat leaf senescence. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 7, n. 3, p. 58–79.

Feng, Z. et al., 2020. Applications of metabolomics in the research of soybean plant under abiotic stress. **Food Chemistry**, v. 310, p. 125914.

Fernadéz, V.; Sotiropoulus, T.; Brown, P. 2013. Foliar Fertilization: Scientific Principles and Field Practices. **Statewide Agricultural Land Use Baseline**, p.212.

Flexas, J. et al., 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. **Plant Biology**, v. 6, n. 3, p. 269–279.

Foyer, C. H. 2015. Redox homeostasis: Opening up ascorbate transport. **Nature Plants**, v. 1, p. 1–2.

Gadallah, M. A. A. 1999. Effects of acid mist and ascorbic acid treatment on. **Water, air, and soil pollution**., v. 118, n. 3, p. 311–327.

Gallie, D. 2013. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 2, p. 433–443.

García-Caparrós, P. et al., 2021. Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: A Review. **Botanical Review**, v. 87, n. 4, p. 421–466.

Giannopolitis, C.; Ries, S. 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309–314.

Gomes, M. A. DA C. et al., 2017. Salinity effects on photosynthetic pigments, proline, biomass and nitric oxide in *Salvinia auriculata* Aubl. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 29, p. 1–13.

Gomma, M. et al., 2020. Response of soybean plants to mitigation of irrigation water salinity by salicylic and ascorbic acids. **Egypt. Acad. J. Biolog. Sci**, v. 11, n. 1, p. 51–59.

Gratão, P. et al., Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, n. 6, p. 481–494, 2005.

Gratão, P. L. et al. 2012. Biochemical dissection of diageotropica and never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 56, p. 79–96.

Hamada, A. M.; Al-Hakimi, A. B. M. 2009. Hydroponic treatment with ascorbic acid decreases the effects of salinity injury in two soybean cultivars. **Phyton - Annales Rei Botanicae**, v. 49, n. 1, p. 43–62.

Hameed, A. et al., 2015. Effects of salinity and ascorbic acid on growth, water status and antioxidant system in a perennial halophyte. **AoB PLANTS**, v. 7, n. 1.

Hasanuzzaman, M. et al., 2020. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 1–5.

Hassan, A. et al., 2021. Foliar application of ascorbic acid enhances salinity stress tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) through modulation of morpho-physio-biochemical attributes, ions uptake, osmo-protectants and stress response genes expression. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 28, n. 8, p. 4276–4290.

Hinojosa, L. et al., 2018. Quinoa Abiotic Stress Responses: A Review. **Plants**. vol. 7, n. 4, p. 106.

Hoagland, D.; Arnon, D. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley: California: **Agricultural Experiment Station**. p. 232.

Huang, L. et al., 1950. Research on the adaptive mechanism of photosynthetic apparatus under salt stress: New directions to increase crop yield in saline soils. **Annals of Applied Biology**, v. 175, n. 1, p. 1–17.

Hurtado, A. et al., 2020 Different methods of silicon application attenuate salt stress in sorghum and sunflower by modifying the antioxidative defense mechanism. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, p. 110-964.

Hussain, I. et al., 2017. Does exogenous application of ascorbic acid modulate growth, photosynthetic pigments and oxidative defense in okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) under lead stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 6, p. 1–13.

Janku, M.; Luhová, L.; Petrivalský, M. 2019. On the Origin and Fate of Reactive Oxygen Species in Plant Cell Compartments. **Antioxidants**, v. 8, n. 105, p. 1–15.

Khan, T. A.; Mazid, M.; Mohammad, F. 2012. A review of ascorbic acid potentialities against oxidative stress induced in plants. **Journal of Agrobiology J**, v. 28, n. 2, p. 97–111.

Khazaei, Z.; Estaji, A. 2020. Effect of foliar application of ascorbic acid on sweet pepper (*Capsicum annuum*) plants under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 42, n. 7, p. 1–12.

Kostopoulou, Z. et al., 2015. Melatonin combined with ascorbic acid provides salt adaptation in *Citrus aurantium* L. seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 86, p. 155–165.

Koyro, H. W. 2006. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, n. 2, p. 136–146, 2006.

Latif, M.; Akram, N. A.; Ashraf, M. 2016. Regulation of some biochemical attributes in drought-stressed cauliflower (*Brassica oleracea* L.) by seed pre-treatment with ascorbic acid. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 91, n. 2, p. 129–137.

Läuchli, A.; Lüttgel, U. 2014. Salinity: Environment-Plants-Molecules. **Kluwer Academic Publishers**, p. 1- 524.

Laxa, M. et al., 2019. The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. **Antioxidants**, v. 8, n. 4, p. 1- 31.

Lazzarotto, J. J.; Hirakurl, M. H. 2010. Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro. **Embrapa soja-documentos** (INFOTECA-E) p. 46.

Li, B. et al., 2021. The emerging role of GSNOR in oxidative stress regulation. **Trends in Plant Science**, v. 26, n. 2, p. 156–168.

Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350–382.

Loutfy, N.; Azooz, M. M.; Abou Alhamd, M. F. 2020. Exogenously-applied salicylic acid and ascorbic acid modulate some physiological traits and antioxidative defense system in *Zea mays* L. seedlings under drought stress. **Egyptian Journal of Botany**, v. 60, n. 1, p. 313–324.

Lu, C. et al., 2003. Salinity treatment shows no effects on photosystem II photochemistry, but increases the resistance of photosystem II to heat stress in *Halophyte suaeda salsa*. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 383, p. 851–860.

Lu, C.; Vonshak, A. 2002. Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. **Physiologia Plantarum**, v. 114, n. 3, p. 405–413.

Malik, S. et al., 2015. Effect of ascorbic acid application on physiology of wheat under drought stress. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 52, n. 1, p. 209–217.

Mano, J.; Ushimaru, T.; Asada, K. 1997. Ascorbate in thylakoid lumen as an endogenous electron donor to Photosystem II: Protection of thylakoids from photoinhibition and regeneration of ascorbate in stroma by dehydroascorbate reductase. **Photosynthesis Research**, v. 53, n. 1, p. 197–204.

Marschner, P.; Rengel, Z. 2012. Nutrient availability in soils. In Marschner's mineral nutrition of higher plants. **In: Academic press**, p. 315–330.

Mukherjee, S.; Choudhuri, M. A. 1983. Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. **Physiol. Plant**, v. 58, p. 166–170.

Mukhopadhyay, R. et al., 2021. Soil salinity under climate change: Challenges for sustainable agriculture and food security. **Journal of Environmental Management**, v. 280, p. 111736.

Murata, N. et al., 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1767, n. 6, p. 414–421.

Nahar, K. et al., 2015. Glutathione-induced drought stress tolerance in mung bean: Coordinated roles of the antioxidant defence and methylglyoxal detoxification systems. **AoB PLANTS**, v. 7, n. 1, p. 1–18.

Nahar, K. et al. 2017. Polyamines-induced aluminum tolerance in mung bean: A study on antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. **Ecotoxicology**, v. 26, n. 1, p. 58–73.

Naz, H.; Akram, N. A.; Ashraf, M. 2016. Impact of ascorbic acid on growth and some physiological attributes of cucumber (*Cucumis sativus*) plants under water-deficit conditions. **Pak. J. Bot**, v. 3, n. 48, p. 877–883.

Naz, N. et al., 2010. Relationships between gas-exchange characteristics and stomatal structural modifications in some desert grasses under high salinity. **Photosynthetica**, v. 48, n. 3, p. 446–456.

Noctor, G.; Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Biology**, v. 49, p. 249–279.

Noreen, S. et al., 2020. Plant Physiology and Biochemistry Foliar fertigation of ascorbic acid and zinc improves growth, antioxidant enzyme activity and harvest index in barley (*Hordeum vulgare* L.) grown under salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, p. 1–11.

Parihar, P. et al., 2015. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4056–4075.

Penella, C.; Calatayud, Á.; Melgar, J. C. 2017. Ascorbic acid alleviates water stress in young peach trees and improves their performance after rewatering. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–9.

Pignocchi, C. et al., 2006. Ascorbate oxidase-dependent changes in the redox state of the apoplast modulate gene transcript accumulation leading to modified hormone signaling and orchestration of defense processes in tobacco. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 423–435.

Racchi, M. L. 2013. Antioxidant defenses in plants with attention to prunus and citrus spp. **Antioxidants**, v. 2, n. 4, p. 340–369.

Rahmawati, N.; Basyuni, M. 2014. Chlorophyll content of soybean as affected by foliar application of ascorbic acid and inoculation of arbuscular Mycorrhizal fungi in saline soil. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 3, n. 7, p. 127–131.

Roy, P. R. et al., 2016. Exogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide alleviates salt-induced oxidative stress in rice (*Oryza sativa* L.) by enhancing antioxidant enzyme activities and proline content. **Advances in Environmental Biology**, v. 10, n. 10, p. 148–154.

Sairam, R. K.; Saxena, D. C. 2000. Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: Possible mechanism of water stress tolerance. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 184, n. 1, p. 55–61.

Sayyad-Amin, P. et al., 2016. Changes in photosynthetic pigments and chlorophyll-a fluorescence attributes of sweet-forage and grain sorghum cultivars under salt stress. **Journal of Biological Physics**, v. 42, n. 4, p. 601–620.

Shahbazi Zadeh, E.; Movahhedi Dehnavi, M.; Balouchi, H. 2015. Effects of foliar application of salicylic and ascorbic acids on some physiological characteristics of soybean (cv. Williams) under salt stress. **Journal of Plant Process and Function.**, v. 4, n. 11, p. 13–22.

Shao, H. B. et al., 2008. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 8–14.

Shigeoka, S. et al., 2002 Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of experimental botany.**, v. 53, n. 372, p. 1305–1319.

Shimizu, N. et al., 2006. Reactive oxygen species (ROS) generation and ROS-induced lipid peroxidation are associated with plasma membrane modifications in host cells in response to AK-toxin I from *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. **Journal of General Plant Pathology**, v. 72, n. 1, p. 6–15.

Silva, V. M. et al., 2020. Selenate and selenite affect photosynthetic pigments and ROS scavenging through distinct mechanisms in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) walp) plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 201, p. 110-777.

Sperling, O. et al., 2014. Effects of high salinity irrigation on growth, gas-exchange, and photoprotection in date palms (*Phoenix dactylifera* L., cv. Medjool). **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p. 100–109.

Suekawa, M. et al., 2018. Regulation of ascorbic acid biosynthesis in plants. in: Ascorbic acid in plant growth, development and stress tolerance. **Springer Cham**, p. 157–176.

Talaat, N. B. et al., 2015. Effective microorganisms improve growth performance, alter nutrients acquisition and induce compatible solutes accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants subjected to salinity stress. **Plant Growth Regulation**, v. 75, n. 1, p. 281–295.

Tóth, S.; Schankker, G.; Garab, G. 2013. The physiological roles and metabolism of ascorbate in chloroplasts. **Physiologia Plantarum**, v. 148, n. 2, p. 161–175.

Tóth, S. Z. et al., 2009. Experimental evidence for ascorbate-dependent electron transport in leaves with inactive oxygen-evolving complexes. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1568–1578.

Tóth, S. Z. et al., 2011. The physiological role of ascorbate as photosystem II electron donor: Protection against photoinactivation in heat-stressed leaves. **Plant Physiology**, v. 156, n. 1, p. 382–392.

Umar, M.; Uddin, Z.; Siddiqui, Z. S. 2019. Responses of photosynthetic apparatus in sunflower cultivars to combined drought and salt stress. **Photosynthetica**, v. 57, n. 2, p. 627–639.

Vasconcellos, L. 2016. Caracterização fisiológica de genótipos de soja submetidos ao estresse salino. **Tese**, p. 9-67

Wang, Q. et al., 2013. Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on physiological characteristics of Perennial ryegrass under cadmium stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 4, p. 721–731.

Wang, Y. H. et al., 2019. Exogenous application of gibberellic acid and ascorbic acid improved tolerance of okra seedlings to NaCl stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 6, p. 1–10.

Weisany, W. et al., 2012. Changes in antioxidant enzymes activity and plant performance by salinity stress and zinc application in soybean (*Glycine max* L.). **Plant OMICS**, v. 5, n. 2, p. 60–67.

White, A. J.; Critchley, C. 1999. Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. **Photosynthesis Research**, v. 59, n. 1, p. 63–72.

Willadino, L. et al., 2016. Capítulo 14. Cultura de tecidos e priming in vitro como estratégias de redução dos efeitos da salinidade e aplicados. In: Manejo da Salinidade na Agricultura: Estudos Básicos e Aplicados. **2da Edição**, p. 199–200.

Wu, H. et al., 2015. K⁺ retention in leaf mesophyll, an overlooked component of salinity tolerance mechanism: A case study for barley. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 57, n. 2, p. 171–185.

Yadav, N. S. et al., 2012. The SbSOS1 gene from the extreme halophyte *Salicornia brachiata* enhances Na⁺ loading in xylem and confers salt tolerance in transgenic tobacco. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 1–18.

Yarami, N.; Sepaskhah, A. R. 2015. Physiological growth and gas exchange response of saffron (*Crocus sativus* L.) to irrigation water salinity, manure application and planting method. **Agricultural Water Management**, v. 154, p. 43–51.

Yasmin, H. et al., 2020. Halotolerant rhizobacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Bacillus subtilis* mediate systemic tolerance in hydroponically grown soybean (*Glycine max* L.) against salinity stress. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, p. 1–26.

Yoshimura, K.; Ishikawa, T. 2017. Chemistry and metabolism of ascorbic acid in plants. In: Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance. **Springer Cham**, p. 1–23.

Zaman, M.; Shahid, S. A.; Heng, L. 2018. Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques. **Springer Nature**, p. 164.

Zhang, K. et al., 2019. Exogenous application of ascorbic acid mitigates cadmium toxicity and uptake in Maize (*Zea mays* L.). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 19, p. 19261–19271.