

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ÁCIDO ASCÓRBICO COMO REGULADOR DA RESPOSTA
ANTIOXIDANTE EM TOMATEIRO SOB ESTRESSE SALINO**

Rita de Cássia Alves
Engenheira Agrônoma

2019

**T
E
S
E
/
A
L
V
E
S**

**R.
C.**

**2
0
1
9**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ÁCIDO ASCÓRBICO COMO REGULADOR DA RESPOSTA
ANTIOXIDANTE EM TOMATEIRO SOB ESTRESSE SALINO**

Rita de Cássia Alves

Orientadora: Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão

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

2019

A474a ALVES, Rita de Cássia
Ácido ascórbico como regulador da resposta antioxidante em
tomateiro sob estresse salino / Rita de Cássia ALVES. --
Jaboticabal, 2019
66 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Priscila Lupino Gratão

1. Solanum lycopersicum L.. 2. Estresse oxidativo. 3. .
Pré-tratamento. 4. Salinidade. 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).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ÁCIDO ASCÓRBICO COMO REGULADOR DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE EM TOMATEIRO SOB ESTRESSE SALINO

AUTORA: RITA DE CÁSSIA ALVES

ORIENTADORA: PRISCILA LUPINO GRATÃO

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

Profa. Dra. PRISCILA LUPINO GRATÃO

Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. ANDRESSA PERES BINI

Departamento de Genética-ESALQ/USP / Piracicaba/SP

Profa. Dra. LEILA TREVISAN BRAZ

Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. ALEXSON FILGUEIRAS DUTRA

Victório Cardassi / Instituto Municipal de Ensino Superior Bebedouro

Prof. Dr. DAVI RODRIGO ROSSATTO

Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 18 de janeiro de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Rita de Cássia Alves, nasceu na cidade de Frutuoso Gomes, Rio Grande do Norte, em 13 de Março de 1989. Em Agosto de 2009 ingressou na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, graduando-se em Engenharia Agrônômica em Março de 2014. Em Março de 2014 iniciou o curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal na Universidade Estadual Paulista – UNESP, *Campus* de Jaboticabal – SP, submetendo-se a defesa da dissertação em 25 de fevereiro de 2016. Em março de 2016 iniciou o curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal na Universidade Estadual Paulista – UNESP, *Campus* de Jaboticabal – SP, submetendo-se a defesa da tese em 18 de Janeiro de 2019.

“Mas aqueles que esperam no Senhor
renovam as suas forças. Voam alto
como águias; correm e não ficam
exaustos, andam e não se cansam.”

(Isaías 40:31)

DEDICO

A Deus, por ser o meu fortalecedor maior, por sempre iluminar a minha caminhada, não deixando desistir mesmo diante das dificuldades encontradas ao longo de toda essa minha trajetória. Aos meus pais Margarida Maria e Agostinho Alves por se fazerem sempre presente em todos os momentos da minha vida, por toda base que me deram para que eu pudesse chegar até aqui, e mais que tudo isso o amor incondicional que sempre me transmitiram. A minha orientadora Priscila Lupino Gratão, por ter feito com que eu pudesse crescer não apenas como profissional, mas também como ser humano, e por todo companheirismo durante todos esses anos de pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

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

Ao programa de Pós-graduação em Agronomia (Produção vegetal) da faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, ao qual faço parte, e ao Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária pela parte da infraestrutura disponibilizada.

A UNESP, campus de Jaboticabal, por ter me proporcionado a oportunidade de me aperfeiçoar cada vez mais na minha carreira acadêmica.

A Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão, pela orientação, por todo aprendizado durante todos esses anos e pela amizade.

A Minha família por sempre se fazerem presente em minha vida, por serem minha base e o meu alicerce.

A Técnica Sônia M. R. Carregari, por ter me acolhido e ter feito me sentir como membro de sua família, dedicando amor e carinho e por ter sido um grande apoio técnico durante todos esses anos de UNESP.

Ao Professor Francisco de Assis de Oliveira, por sempre ter contribuído para minha formação profissional.

Aos meus amigos (as) Ana Medeiros, Ayanne Cavalcante, Carolina Franco Clebson Lúcio, Jeferson Silva, Juliana Geseira, Kevein Ruas, Luan Alves, Maria Fernanda, Mayara Nicolau, Mirela Vantini, Nayara Abrão, Renan Silva, Samira Furtado, e Willians Carrega por toda amizade dedicada e por sempre se fazerem presente tanto em momentos bons quanto em momentos não tão bons nessa minha trajetória.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia Vegetal por todo esse tempo de convívio e divisão de conhecimentos.

A todos, mesmo que não estejam aqui citados que, direta ou indiretamente, colaboraram com este trabalho e com minha formação

SUMÁRIO

Páginas

1	RESUMO.....	xii
2	ABSTRACT	xiii
3	1. INTRODUÇÃO	1
4	2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
5	2.1 Micro-tomateiro como modelo de estudo fisiológico e bioquímico	3
6	2.2 Estresse salino	4
7	2.3 Estresse oxidativo e sistemas de defesa antioxidante	5
8	2.4 Ácido ascórbico como atenuante do estresse salino	7
9	3. MATERIAL E MÉTODOS	9
10	3.1 Localização	9
11	3.2 Condução do experimento	9
12	3.3 Análises	11
13	3.3.1 Potencial hídrico foliar e eficiência no uso da água	11
14	3.3.2 Teor de clorofila e carotenóides	11
15	3.3.3 Fluorescência da clorofila-a	11
16	3.3.4 Acúmulo de Na ⁺	12
17	3.3.5 Crescimento de plantas e produção de frutos	12
18	3.3.6 Peroxidação lipídica	13
19	3.3.7 Concentração de peróxido de hidrogênio	13
20	3.3.8 Antioxidantes enzimáticos	13
21	3.3.8.1 Extração enzimática e determinação de proteínas	13
22	3.3.8.2 Superóxido dismutase – SOD (EC 1.15.1.1)	14
23	3.3.8.3 Catalase - CAT (EC 1.11.1.6)	14
24	3.3.8.4 Ascorbato peroxidase - APX (EC 1.11.1.11)	15
25	3.3.8.5 Peroxidases - POX (EC 1.11.1.7)	15
26	3.3.8.6 Glutathiona peroxidase - GPX (EC 1.11.1.9)	15
27	3.3.8.7 Glutathiona redutase - GR (EC 1.6.4.2)	16

30	3.3.9 Antioxidantes não-enzimáticos	16
31	3.3.9.1 Glutathione (GSH)	16
32	3.4 Análise estatística	16
33	4. RESULTADOS	17
34	4.1 Potencial hídrico foliar e eficiência no uso da água	17
35	4.2 Pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila-a	18
36	4.3 Peroxidação lipídica e concentração de H ₂ O ₂	20
37	4.4 Atividade antioxidante enzimática	21
38	4.5 Antioxidante não enzimático	28
39	4.5.1 Conteúdo GSH.....	28
40	4.6 Acúmulo de Na ⁺	29
41	4.7 Crescimento de plantas e produção de frutos.....	31
42	5. DISCUSSÃO	33
43	6. CONCLUSÕES	39
44	7. REFERÊNCIAS	39
45		
46		
47		
48		
49		
50		
51		
52		
53		
54		
55		
56		
57		
58		

ÁCIDO ASCÓRBICO COMO REGULADOR DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE EM TOMATEIRO SOB ESTRESSE SALINO

RESUMO - Embora o ácido ascórbico (AsA) possa estar envolvido na atenuação dos efeitos do estresse salino, pouco se sabe sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos, além da melhor estratégia de aplicação. O objetivo deste trabalho foi, portanto, explorar o papel do AsA via pré-tratamento de sementes; na regulação de respostas antioxidantes e no crescimento do micro-tomateiro (MT) sob estresse salino. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2 x 2, inteiramente casualizado, com quatro repetições. O pré-tratamento de sementes com AsA (0 e 100 mM AsA) foi realizado em sementes de MT com exposição subsequente ao estresse salino (0 e 100 mM de NaCl). Os resultados indicaram que o AsA desempenha papel na atenuação dos efeitos negativos do estresse salino através da redução do acúmulo de Na^+ , da peroxidação lipídica (MDA) e da concentração de H_2O_2 , assim como, o aumento do potencial hídrico foliar, conteúdo relativo de água, clorofila total e carotenóides, atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peroxidases totais (POX), glutathione peroxidase (GPX), glutathione redutase (GR), e conteúdo de glutathione (GSH), culminando com melhor crescimento e produtividade. Assim, os resultados indicam que o pré-tratamento de sementes com AsA é uma técnica de manejo eficiente que pode ser utilizada para aliviar os efeitos deletérios e aumentar a tolerância das plantas de MT em condições de estresse salino.

Palavras chave: *Solanum lycopersicum* L., estresse oxidativo, pré-tratamento, salinidade.

ASCORBIC ACID AS A REGULATOR OF ANTIOXIDANT RESPONSE IN TOMATOES UNDER SALT STRESS

ABSTRACT- Although ascorbic acid (AsA) has been known to improve plant defense systems against salt stressful-conditions, little is known about physiological and biochemistry mechanisms of AsA-mediated alleviation of salt stress, and the best management technique. The main objective of this work was, therefore, to explain the role of ascorbic acid via seed priming on antioxidant defense responses and growth regulation in tomato Micro-Tom under salt stress. The experiment was carried out using a 2 x 2 factorial completely randomized design with four replicates. In this way, seed priming with AsA (0 and 100 mM AsA) was used in Micro-Tom seeds to improve the tolerance of subsequent salt-stress exposure (0 and 100 mM NaCl). The effect of AsA priming was assessed on subsequent exposure to salt stress conditions with a physiological and biochemical approach involving antioxidant responses. Overall results indicated that AsA plays a role in alleviating the negative effects of salt stress by reduction of Na⁺ content, lipidic peroxidation and H₂O₂ content, increased leaf water potential (LWP), water-use efficiency (WUE), total chlorophyll, carotenoids, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POX), glutathione peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR) activities and GSH content, leading to better plant growth and higher yields. Thus, the results indicated that the seed priming with AsA is an efficient management technique that can be used to alleviate the deleterious effects of salt stress conditions and enhance salt tolerance of Micro-Tom plants.

Key words: *Solanum lycopersicum* L., seed priming, salinity, oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

As plantas estão sujeitas as adversidades do meio durante todo seu ciclo, estresses abióticos como seca, salinidade, temperaturas extremas, toxicidade química e estresse oxidativo são ameaças sérias à agricultura e ao estado natural do meio ambiente (Ahmed et al., 2016). O estresse salino, por exemplo, é um dos estresses abióticos que afeta a produção mundialmente, onde cerca de quase 6,5% do solo tem problemas de salinização e 20% do total da área cultivada é afetada pela salinidade, tornando-se um dos maiores obstáculos da atualidade para a agricultura (Billah et al., 2017, Alves et al., 2018a, Kaur e Gupta, 2018).

O excesso de sal no solo e na água pode causar vários efeitos deletérios nas plantas, induzindo mudanças nas respostas fisiológicas e vias bioquímicas (Alves et al., 2018). Os efeitos negativos do estresse salino incluem redução no potencial hídrico do solo, na transpiração foliar, inibição da fotossíntese, desequilíbrio na relação iônica Na/K, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e consequentemente, redução de crescimento e produtividade (Alhasnawi et al., 2015, Yasar et al., 2016, Alves et al., 2018b).

O estresse salino pode levar a um aumento das ERO em plantas devido à desestabilização da homeostase celular, causando danos às proteínas, DNA e lipídios (Elhamid et al., 2014, Yasar et al., 2016, Alves et al., 2018b). A redução das ERO ocorre pela ação do sistema de defesa antioxidante composto por enzimas e compostos não enzimáticos que mantêm o status redox celular (Elhamid et al., 2014, Gratão et al., 2015). A resposta de defesa primária compreende a atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2), glutathione peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9), ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) catalase (CAT, 1.11.1.6) e outras peroxidases (Foyer e Noctor, 2013, Ismail et al., 2014, Nawaz et al., 2015, Noctor e Foyer, 2016, Pompeu et al., 2016). Mecanismos não enzimáticos como ascorbate (AsA), flavonóides, carotenóides,

glutathiona (GSH) e metabólito de prolina podem ser responsáveis pela eliminação do excesso de ERO (Gratão et al., 2005, Foyer e Noctor, 2013, Zouari et al., 2016a; b).

No entanto, quando as plantas são submetidas a altos níveis de estresse o sistema de defesa pode não ser suficiente para manter os níveis de ERO baixos, podendo acarretar sérios danos oxidativos que podem reduzir o crescimento. A redução do crescimento está relacionada à toxicidade iônica, redução do potencial osmótico e desequilíbrio de nutrientes, pois além de causar o acúmulo de sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-), o estresse salino afeta a absorção de nutrientes essenciais como o potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) em contraste com Na^+ e Cl^- . Os cátions como K^+ e Na^+ são os principais elementos inorgânicos, que disponibilizam o potencial osmótico necessário para a absorção de água (Asada, 2000, Elhamid et al., 2014, Alves et al., 2018a).

Por outro lado, os estudos com estratégias de melhoramento convencional em plantas para superar os efeitos negativos da salinidade ainda apresenta sucesso limitado (Krupa-Mańkiewicz et al., 2015). Em vista disso, a maioria dos estudos vem empregando estratégias de gerenciamento custo-benefício que possam minimizar a perda de produtividade ou o rendimento em condições desfavoráveis.

Umas destas estratégias é a aplicação de atenuantes de estresse, como por exemplo, o ácido ascórbico (AsA), pois este pode diminuir ou neutralizar os efeitos adversos do estresse salino no crescimento das plantas, regulando a síntese protéica (Khan et al., 2011, Rafique et al., 2011, Alhasnawi et al., 2016, Roy et al., 2016, Sayed et al., 2016). A aplicação de AsA exógeno pode neutralizar os efeitos adversos da salinidade em plantas cultivadas (Said-Sar et al., 2013, Agami, 2014). Por estas razões, o AsA pode ser usado como potente atenuador desses efeitos e estar relacionado com a tolerância da planta sob condições de estresse salino (Ahmed et al., 2016).

Entretanto, pouco se conhece sobre a melhor e mais econômica forma de aplicação deste atenuante. Umas das possíveis estratégias seria o manejo já nas sementes, otimizando tempo e reduzindo custos. O pré-tratamento de sementes é um método potencialmente capaz de reduzir os efeitos negativos associados a condições estressantes. Durante o início da germinação, ocorrem várias alterações físico-químicas

que modificam os caracteres protoplasmáticos, aumentando a atividade fisiológica do embrião e todas as estruturas associadas da semente, levando a maior absorção de água, o que pode implicar no sistema radicular mais eficiente (Singh et al., 2018). Além disso, o pré-tratamento de sementes implica em maior custo-benefício para o produtor, pois trata-se de uma técnica simples que não exige demanda de mão de obra e reduz o custo com o uso do produto.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi, explorar o papel do AsA via pré-tratamento de sementes, na regulação de respostas antioxidantes e no crescimento do micro-tomateiro (MT), como alternativa para atenuar o efeito da salinidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micro-tomateiro como modelo de estudo fisiológico e bioquímico

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pertencente a família Solanaceae é uma das principais oleráceas cultivada em todo o mundo, rica em minerais, vitaminas, açúcares, fibra alimentar e aminoácidos essenciais (Palop et al., 2010).

Sua arquitetura apresenta-se de duas formas, podendo ser classificada com hábito de crescimento determinado e indeterminado, com ciclo variável que depende das condições climáticas. No caso das cultivares de crescimento indeterminado, seu ciclo pode prolongar-se por vários meses. Já o hábito de crescimento determinado se restringe a um ciclo menor, no máximo de duas colheitas, pois o amadurecimento de frutos ocorre na mesma época (Alvarenga et al., 2013).

O tomateiro é considerado excelente modelo para fins de estudos fisiológicos e bioquímicos, levando vantagens sobre a principal planta modelo (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh), pois apresenta uma diversidade de metabolitos secundários, além do padrão morfogenético com um genoma relativamente pequeno ($7,1 \times 10^8$ pb) e um amplo germoplasma (Stevens e Rick, 1986, Pratt et al., 1997). No entanto, devido ao seu grande porte e longo ciclo, seu uso torna-se desvantajoso para algumas finalidades de estudos quando comparada a *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Entretanto, Meissner et al. (1997) propuseram o uso da cultivar em miniatura de tomateiro, o Micro-tom (MT) (*Solanum lycopersicum* L.), pois esta possibilita estudos fisiológicos e bioquímicos com vantagens em relação a cultivares comerciais. O MT é uma planta de fácil manejo, com produção de frutos com sementes viáveis, e ciclo completo entre 70-90 dias, superando assim as desvantagens em relação a *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. e as cultivares comerciais para fins de pesquisa.

2.2 Estresse salino

A salinidade é um problema que pode ocorrer por várias razões, seja de forma natural (intemperismo de material rochoso, deposição de sal marinho levado pelo vento ou chuva, inundações marítimas) ou pelas atividades antrópicas (uso excessivo de fertilizantes, irrigação com águas salobras, sistema de drenagem ineficiente, aumento do lençol freático devido ao excesso de irrigação com águas subterrâneas, entre outras) (Hasanuzzaman et al., 2013).

Nas regiões áridas e semi-áridas do mundo a salinidade torna-se comum devido principalmente a baixa precipitação de chuvas, ou o uso de água com altas concentrações de sódio. Em todo o mundo, estima-se que aproximadamente 33-40% da área é coberta de ecossistemas áridos e que a tendência é aumentar cada vez mais, devido às alterações climáticas e de desertificação (Oliveira et al., 2014, Ouhaddach et al., 2018) o que pode levar as plantas a condições indesejáveis para o seu ciclo de vida, pois, o estresse salino é um dos fatores abióticos mais severos que limita o crescimento e a produtividade das plantas (Khanbabalo et al., 2018). Cerca de quase 6,5% do solo em todo o mundo tem problemas de salinização e 20% do total da área cultivada é afetada pela salinidade, tornando-se um dos maiores obstáculos da atualidade para a agricultura, pois afeta negativamente o crescimento, desenvolvimento e produção das culturas (Billah et al., 2017, Alves et al., 2018a, Kaur e Gupta, 2018).

O estresse salino pode causar efeitos de diferentes maneiras nas plantas glicófitas, pois ao contrário das halófitas que podem crescer em ambientes salinizados,

estas quando expostas a salinidade podem apresentar mudanças em seu comportamento fisiológico e bioquímico dependendo do nível de salinidade (Ouhaddach et al., 2018). Os principais danos ocasionados por este estresse estão relacionados aos efeitos osmóticos e iônicos. Uma vez que a planta se encontra em condições de salinidade, a disponibilidade de água fica limitada e os íons se acumulam causando toxicidade iônica, principalmente pelo aumento das concentrações de íons Na^+ e Cl^- ocasionando desbalanço nutricional (Munns e Tester, 2008, Ahmed et al., 2016).

Vários são os sintomas que as plantas podem apresentar sob condições de estresse salino, entre os principais estão, estresse oxidativo, menor eficiência fotossintética, redução na condutância estomática, maior taxa de transpiração, crescimento reduzido e perda de produção (Maskri et al., 2010, Silva et al., 2013, Alves et al., 2018a,b).

A salinidade é um processo contínuo que é dispendioso e trabalhoso, pois trata-se de um problema global complexo a ser resolvido. No entanto, deve-se levar em consideração que a extensão dos danos causados pela salinidade depende de muitos fatores, como a espécie, o genótipo, o estágio de desenvolvimento da cultura, nível da salinidade e fatores ambientais (Ahmed et al., 2016).

No caso da cultura do tomateiro, esta é considerada moderadamente sensível a salinidade, onde para alguns genótipos o limiar é de $2,5 \text{ dS m}^{-1}$, uma vez que quando os níveis estão acima do limiar, isto pode provocar um desajuste osmótico nas plantas, impossibilitando a absorção de água e nutrientes, o que leva a redução do crescimento, além de perdas de produtividade (Zhang et al., 2017, Alves et al., 2018a).

2.3 Estresse oxidativo e sistemas de defesa antioxidante

O estresse salino além de causar desequilíbrio nutricional, afetar a expansão e divisão celular, alterações hormonal, danos ao DNA, RNA e proteínas, geralmente induz o estresse oxidativo nas plantas, causando superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que pode implicar na degradação da clorofila e na peroxidação

lipídica, afetando assim a fluidez e permeabilidade da membrana devido a alterações na composição dos lipídeos (Alves et al., 2018b, Kaya et al., 2018).

Dentre as ERO estão o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroxila ($\text{OH}^{\bullet}$) e oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), que surgem através da excitação ou redução incompleta de oxigênio molecular (Shieber e Chandel, 2014). Em condições fisiológicas normais, elas são indispensáveis para o bom funcionamento do metabolismo, onde regulam processos de multiplicação e diferenciação celular, respiração e a fotossíntese, além de serem moléculas sinalizadoras que regulam o desenvolvimento vegetal em resposta a estresses bióticos e abióticos (Noctor et al., 2014, Czarnocka e Karpiński, 2018). Nesses processos, o oxigênio molecular pode seguir duas rotas, a das oxidases, a qual consiste na formação de água pela transferência de quatro elétrons para o oxigênio na cadeia respiratória (redução tetravalente); e a rota das oxigenases, culminando na formação das ERO através da transferência de um elétron de cada vez para o oxigênio (redução univalente) (Soares e Machado, 2007). Nestas condições, as ERO são excelentes moléculas sinalizadoras que regulam o metabolismo das plantas, no entanto, sua produção e acúmulo devem ser rigorosamente controlados, pois são altamente reativas e tóxicas em altas concentrações (Czarnocka e Karpiński, 2018).

Consequentemente, estas respostas desencadeiam os mecanismos de resposta ao estresse. Devido aos possíveis danos causados pelas ERO, ocorre a indução ou o estímulo de sistemas capazes de prevenir a oxidação descontrolada, aos quais incluem os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Gratão et al., 2005, Gratão et al., 2008, Yadav et al., 2014). O sistema antioxidante enzimático é composto por enzimas como superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutatona peroxidase (GPX), glutatona redutase (GR). Mecanismos não enzimáticos também podem operar nesta defesa, incluindo antioxidantes como ascorbato, glutatona, compostos fenólicos, flavonóides e metabolitos lipossolúveis (α -tocoferol, β -caroteno, licopeno) (Foyer e Noctor, 2013, Yadav et al., 2014, Caverzan et al., 2016, Zouari et al., 2016a, b).

A primeira linha de defesa de antioxidantes se caracteriza por uma neutralização rápida de moléculas que tenham potencial de se desenvolver como ERO ou com

capacidade de induzir a produção de outras ERO, destacando-se três enzimas: a superóxido dismutase, catalase e a glutathione peroxidase (Gill e Tuteja, 2010, Ighodaro e Akinloye, 2017). A superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) é responsável pela dismutação do superóxido à O_2 e espécies menos reativas, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 liberado pode ser reduzido à água pela catalase (CAT, EC 1.11.1.6) ou glutathione peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) (Gratão et al., 2005, Hippler et al., 2015, Liu et al., 2015).

Os antioxidantes não enzimáticos que apresentam grande importância na linha de defesa secundária correspondem ao ascorbato (AsA) e a glutathione (GSH), ao qual participam constantemente na regulação e eliminação das ERO (Kapoor et al., 2015, Alves et al., 2018). O AsA é um antioxidante que reage diretamente com o H_2O_2 , enquanto o GSH está associado com a regeneração do AsA, crucial para a rápida oxidação do excesso de H_2O_2 (Krifka et al., 2012, Niu e Liao, 2016).

No entanto, vale ressaltar que o H_2O_2 também está envolvido na regulação de expressão de genes, e na proteção contra danos oxidativo, uma vez que pode induzir o aumento da atividade de antioxidante (Azevedo et al., 2005, Roy et al., 2016). Entretanto, estes mecanismos que permitem a função múltipla do H_2O_2 ainda são poucos elucidados (Liu et al., 2013, Niu e Liu, 2016).

Assim, o complexo caminho bioquímico dentro da célula concomitantemente com a regulação transcricional é desencadeado como uma indução do sistema antioxidante que têm o potencial de controlar cascatas descontroladas de oxidação nas células sob condições normais, ou quando estimuladas por alguma situação de estresse (Gratão et al., 2015).

2.4 Ácido ascórbico como atenuante do estresse salino

No decorrer dos últimos anos, devido a escassez de água, o uso de água salina na irrigação vem se intensificando cada vez mais na agricultura, tornando-se um desafio para os pesquisadores em encontrar estratégias de manejo que garantam a boa

produção das culturas. O uso desta água de forma inadequada pode causar acúmulos de sais e reduzir o potencial hídrico do solo, além de causar distúrbios funcionais e injúrias no metabolismo das plantas (Silva et al., 2009).

A procura por estratégias que possam vir a reduzir os efeitos negativos do estresse salino sobre as plantas vem se intensificando cada vez mais, principalmente com uso de atenuantes de estresses, como o ácido ascórbico (AsA) (Billah et al., 2017, Kaur e Gupta, 2018). Na literatura, o AsA caracteriza-se como agente antioxidante não enzimático, uma vitamina solúvel em água de fácil absorção e acúmulo preferencialmente nas folhas, modulando uma série de fatores fundamentais em plantas sob condições de estresse e não-estresse (Krupa-Matkiewicz et al., 2015, Akram et al., 2017, Kaur e Gupta, 2018).

Dentre estes fatores estão, a reciclagem de antioxidantes lipossolúveis como o α -tocoferol, manutenção da fotossíntese, desenvolvimento celular, expansão da parede celular, expressão de genes, atuação na síntese de alguns hormônios e flavonóides (Gest et al., 2013, Hameed et al., 2015). Além disso, o AsA é rapidamente absorvido após sua aplicação, e pode se mover facilmente dentro da planta, sendo um dos antioxidantes mais potentes na redução da síntese das ERRO (Younis et al., 2010, Rafique et al., 2011, Hameed et al., 2012, Alhasnawi et al., 2016), o que o faz melhorar a tolerância das plantas ao estresse quando cultivadas em condição de salinidade (Farahat et al., 2013, Saidi-Sar et al., 2013).

Entretanto, para que o uso deste atenuante seja viável, alguns fatores devem ser levados em consideração, como a cultura em estudo, o limiar que a cultura tolera, além do custo benefício da estratégia de aplicação. Um meio de aplicação que pode ser eficiente para o uso do AsA, é o pré-tratamento de sementes, que possibilita várias alterações físico-químicas podendo melhorar a atividade fisiológica do embrião, respaldando em crescimento melhor das plantas (Singh et al., 2018).

O pré-tratamento de sementes proporciona alterações fisiológicas onde as plantas se tornam capazes de ativar as respostas de defesas de forma mais rápida e eficiente (Beckers e Conrath, 2007). Os estresses ambientais ativam vias de sinalização e respostas celulares similares, e o pré-tratamento de sementes pode ativar essas vias

de sinalização nos estádios iniciais de crescimento e resultar em respostas mais rápidas de defesa da planta. No entanto, os mecanismos desencadeados pelo pré-tratamento de sementes ainda não são claramente conhecidos, podendo estes mecanismos estar relacionados com o acúmulo de proteínas sinalizadoras inativas em células pré-tratadas (Jisha et al., 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização

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 classificação do clima é Aw (tropical) segundo a Köppen e Geiger. A temperatura média anual é 21.7 °C e a pluviosidade média anual é de 1340 mm.

3.2 Condução do experimento

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2, com quatro repetições, desenvolvido no sistema hidropônico em ambiente controlado. Os tratamentos foram formados pela combinação de duas concentrações de cloreto de sódio (0 e 100 mM de NaCl) e duas concentrações de ácido ascórbico (AsA) (0 e 100 mM de AsA). Sendo estas concentrações determinadas em ensaios pré-elimin角度res, onde a partir dos resultados obtidos, chegou-se a escolha destas concentrações.

Sementes da cultivar de tomate Micro-Tom (MT) (*Solanum lycopersicum* L.) foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio (5%), lavadas três vezes, em seguida fez-se o pré-tratamento das sementes colocando-as nas concentrações de AsA 0 e 100 mM) durante o período de uma hora, após o pré-tratamento das sementes,

estas foram colocadas para germinar em bandejas de poliestireno expandido com capacidade de 200 células suplementadas com pó da fibra de coco. O pó da fibra de coco é um substrato inerte com propriedades de retenção de umidade, podendo promover aeração no meio de cultura e baixa condutividade elétrica ($1,1 \text{ dS m}^{-1}$) (Nunes, 2000, Amafibra®). As bandejas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura média de $23,2^\circ \text{C}$, umidade relativa de 77,6% e fotoperíodo de 11,8 horas (outono). Quando as sementes germinaram, a solução nutritiva foi aplicada a 25% da solução padrão (Castellane e Araújo, 1995) para a aclimatização das plantas, durante o período de quatro dias.

Após cinco dias de germinação, as plantas receberam solução nutritiva a 100% e, quando duas folhas verdadeiras foram completamente formadas, aos 29 dias após a semeadura as plântulas foram transplantadas para vasos de Leonard 0,350 L (Vincent, 1975) contendo uma planta por vaso, suplementada com uma mistura de 3:1 (por volume) de pó de coco e areia, respectivamente, e 250 mL de solução nutritiva padrão (Castellane e Araújo, 1995), onde esta era trocada a cada três dias, mantendo sempre o pH entre 5,5 e 6,0. Durante os primeiros 10 dias após o transplante (DAT), todas as plantas receberam apenas solução nutritiva, a fim de promover um desenvolvimento uniforme das plântulas. A partir dos 11 DAT, as concentrações salinas foram aplicadas em conjunto com a solução nutritiva.

Aos 70 dias após a germinação, correspondendo a 30 dias de exposição ao NaCl, foram determinados o potencial hídrico foliar, eficiência do uso da água, teor de clorofila total e carotenóides, fluorescência da clorofila-a, acúmulo de Na^+ , crescimento de plantas, número e produção de frutos. Amostras frescas de raízes, folhas (excluindo pecíolos) e frutos também foram coletadas, lavadas e imediatamente imersas em N_2 líquido e armazenadas a -80°C para posteriores análises de: peroxidação lipídica, teor de peróxido de hidrogênio, extração enzimática e determinação de proteínas totais e análises de sistemas antioxidantes.

3.3 Análises

3.3.1 Potencial hídrico foliar e eficiência no uso da água

O potencial da água na folha foi avaliado como um indicador do status hídrico na planta. O potencial hídrico foliar foi medido imediatamente após a coleta das folhas com uma câmara de pressão (modelo 1505F-EXP; Soil Moisture, Santa Barbara, Califórnia) (Scholander et al., 1965).

Uma folha por planta foi selecionada e a partir do terceiro nó, o parâmetro de eficiência intrínseca do uso da água (EUA) foi mensurado. Para as trocas gasosas, a assimilação máxima de CO₂ em área base (A_{max}) e condutância estomática (g_s) foram avaliadas sob condições ambientais (412,17 ± 2,13 µl l⁻¹) de umidade relativa (65%), temperatura (26 ± 1,6 °C) com um sistema fotossintético portátil aberto (LcProSD, ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, Reino Unido) acoplado a uma fonte de luz led que fornece intensidade de luz entre 1.200-1.300 µmol.m⁻².s⁻¹ Após as medições, a eficiência intrínseca do uso da água (EUA) foi calculada dividindo o A_{max} por g_s.

3.3.2 Teor de clorofila e carotenóides

Para a quantificação dos teores de clorofila e carotenóides, os discos foliares foram removidos e mensurados. Sob condições de pouca luz, os discos foram colocados em tubos eppendorf contendo 2 mL de acetona (80%) mantida por 48 h sob refrigeração. Após este período as soluções foram lidas em triplicata em espectrofotômetro nos seguintes comprimentos de onda: Clorofila α a 663 nm; Clorofila β a 647 nm e Carotenóides (caroteno [c] + xantofilas [x]) a 470 nm (Lichtenthaler, 1987).

3.3.3 Fluorescência da clorofila-a

Uma folha por planta foi selecionada a partir do terceiro nó, para a medição dos parâmetros de fluorescência e troca gasosa. Para fluorescência, as folhas 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 ($f_v:f_m$) foi determinada seguindo os procedimentos padrão (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 em uma folha por planta e por tratamento entre 11:00 e 12:00 hrs. Foram utilizados 12 níveis de intensidade luminosa ($0-1600 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), sendo as folhas aclimatadas em cada nível por 30 s, após o pulso de saturação de luz e os dados de taxa de transporte de elétrons (ETR) armazenados. Usando o ajuste automático da curva do software MINI-PAM II (WinControl 3.0) o ETR_{max} = taxa máxima de transporte de elétrons foi obtido.

3.3.4 Acúmulo de Na^+

Para a determinação do teor de Na^+ dos tecidos vegetais (raiz, folha e fruto) foram realizados após digestão com uma mistura de ácidos nítrico e perclórico, segundo Carmo et al. (2000). As concentrações de Na^+ foram determinadas pelo método de espectrometria de emissão de chama usando um fotômetro de chama (Micronal - B462). As concentrações de Na^+ foram expressas em mg kg^{-1} de tecido seco. A acumulação foi obtida pela seguinte expressão:

$$\text{Acumulação } \text{Na}^+ = \frac{\text{massa seca (g)} \times \text{concentração (mg kg}^{-1}\text{)}}{1000} = \text{mg planta}^{-1}$$

3.3.5 Crescimento de plantas e produção de frutos

O crescimento de plantas foi determinado através da mensuração da massa seca de raízes, caules e folhas, coletadas e mantidas em estufa por 72 ha 70 °C, utilizando-se uma balança analítica com precisão de 0,0001 g. Os resultados foram expressos em g planta⁻¹.

O número de frutos foi determinado através da contagem de frutos por planta e a produção de frutos foi determinada através da massa fresca de frutos por plantas, determinada utilizando uma balança analítica com precisão de 0,0001 g e os resultados expressos em g planta⁻¹.

3.3.6 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A concentração dos equivalentes de malondialdeído (MDA) foi calculada usando um coeficiente de extinção de $1,55 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, com leituras entre 535 e 600 nm (Gratão et al., 2012). Os resultados são expressos em $\mu\text{mol mg}^{-1}$ de massa fresca (Shimizu et al., 2006).

3.3.7 Concentração de peróxido de hidrogênio

A concentração de H_2O_2 foi determinado pela reação com iodeto de potássio, com leitura a 390 nm (Alexieva et al., 2001). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol mg}^{-1}$ de massa fresca.

3.3.8 Antioxidantes enzimáticos

3.3.8.1 Extração enzimática e determinação de proteínas

As amostras de material vegetal previamente coletadas e estocadas em freezer - 80°C foram maceradas em N₂ líquido e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM EDTA, 3 mM DTT e 4% PVPP (Boaretto et al., 2014). A mistura foi centrifugada a 10.000 g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi cuidadosamente separado e armazenado a -80 °C para posterior análises de SOD, CAT, APX, POX, GPX e GR. A quantificação das proteínas solúveis totais foi realizada conforme Bradford (1976).

3.3.8.2 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 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 50 mM de metionina, 10 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 1 mM de cloreto de nitrotetrazólio azul (NBT) e 0,1 mM 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.

3.3.8.3 Catalase - CAT (EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase (CAT) foi determinada em uma mistura contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 25 mL de H₂O₂ (solução a 30%). A atividade foi determinada monitorando o declínio de H₂O₂ na absorbância a 240 nm ao longo de 1 min (Cia et al., 2012). A atividade da CAT foi expressa como µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3.3.8.4 Ascorbato peroxidase - APX (EC 1.11.1.11)

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7,0), 0,5 mM de ascorbato, 0,1 mM de EDTA e 0,1 mM de H_2O_2 (Gratão et al., 2012). 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 $\mu\text{mol ascorbato min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.3.8.5 Peroxidases - POX (EC 1.11.1.7)

A atividade das peroxidases (POX) nos tecidos foi determinada pelo método de Kar e Mishra (1976). Neste método, as enzimas contidas no extrato oxidam a guaiacol para produzir purpurogallina e reduzir o H_2O_2 fornecido ao meio. O meio reacional consistiu no extrato vegetal, 25 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8), 20 mM de ácido pirogálico, 20 mM de H_2O_2 e H_2SO_4 a 0,5%. A mistura foi incubada a 25°C durante 5 minutos. Em seguida, a reação foi neutralizada pela adição de H_2SO_4 a 0,5% e a absorbância da mistura foi monitorizada durante 3 minutos e determinada a 420 nm. A atividade do POX foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (ácido pirogálico) (Chance e Maehley, 1955), e considerando o aumento de 1 unidade (UA) de absorbância, os dados foram expressos em $\text{AU g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$.

3.3.8.6 Glutathione peroxidase - GPX (EC 1.11.1.9)

A atividade de GPX foi determinada adicionando o extrato vegetal a um meio reacional consistindo de 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 3 mM de EDTA, 0,24 U GR/mL, 10 mM de GSH, e 1 mM de azida sódica. Esta mistura foi

incubada a 37 °C durante 10 min. A reação foi catalisada pela adição de 1,5 mM de NADPH e 1,5 mM H₂O₂. A oxidação de NADPH foi monitorada durante 5 minutos a 340 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Anderson e Davis, 2004) e os resultados expressos em μmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3.3.8.7 Glutathione redutase - GR (EC 1.6.4.2)

A glutathione redutase (GR) foi determinada em uma mistura consistindo em 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) 1 mM de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico), 1,0 mM de GSSG e 0,1 mM NADPH. A taxa de redução de GSSG foi calculada por meio do monitoramento do aumento da absorbância a 412 nm durante 1 min a 30 °C (Carvalho et al., 2013). A atividade da GR foi expressa como μmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3.3.9 Antioxidantes não-enzimáticos

3.3.9.1 Glutathione (GSH)

O teor de glutathione (GSH) foi estimado utilizando o procedimento 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico). O teor de GSH foi determinado numa mistura contendo 0,1 M de tampão fosfato de sódio (pH 7,0), 0,5 mM de EDTA e 3 mM de ácido 5,5-ditiobis- (2-nitrobenzóico) (DTNB). Após 5 min, a absorbância foi lida a 412 nm, ao mesmo tubo, adicionou-se 0,4 mM de NADPH e 2 μl de glutathione (GR) para a determinação da glutathione total (Israr et al., 2006).

3.4 Análise estatística

Os parâmetros avaliados foram submetidos a um teste de normalidade utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para verificar a ausência de normalidade. Foi realizada comparação múltipla entre as médias pelo teste de Tukey seguindo uma ANOVA fatorial para cada parâmetro a um nível de significância de 0,05. A análise estatística foi realizada no software Sisvar 5.3 (Ferreira, 2011).

4. RESULTADOS

A análise estatística dos dados mostrou que, exceto para fluorescência da clorofila-a (fv:fm) ($F > 0,025$, $P < 0,87$), houve efeito significativo da interação entre os fatores concentração de NaCl e pré-tratamento de sementes com AsA ($F = 4,98$, $P = 0,045$). Quanto o efeito isolado dos fatores, houve efeito significativo do NaCl ($F > 8,05$, $P < 0,011$) e do AsA ($F > 5,54$, $P < 0,036$) para todas as variáveis analisadas.

4.1 Potencial hídrico foliar e eficiência no uso da água

Com relação ao potencial hídrico da folha (PHF), observou-se efeito significativo da interação entre NaCl e AsA dentro e entre as concentrações de NaCl (Figura 1A). Na ausência de NaCl, as plantas exibiram menor PHF com o uso de pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM). No entanto, houve maior PHF com pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) quando as plantas estavam na presença de NaCl. Este efeito significativo da interação entre os fatores AsA e NaCl também foi observado para eficiência no uso da água (EUA). As plantas que receberam pré-tratamento de sementes com AsA submetidas a ambas as concentrações de NaCl (0 e 100 mM) apresentaram aumento significativo no EUA. Com relação ao efeito NaCl, as plantas sem o pré-tratamento de sementes exibiram maior EUA (Figura 1B).

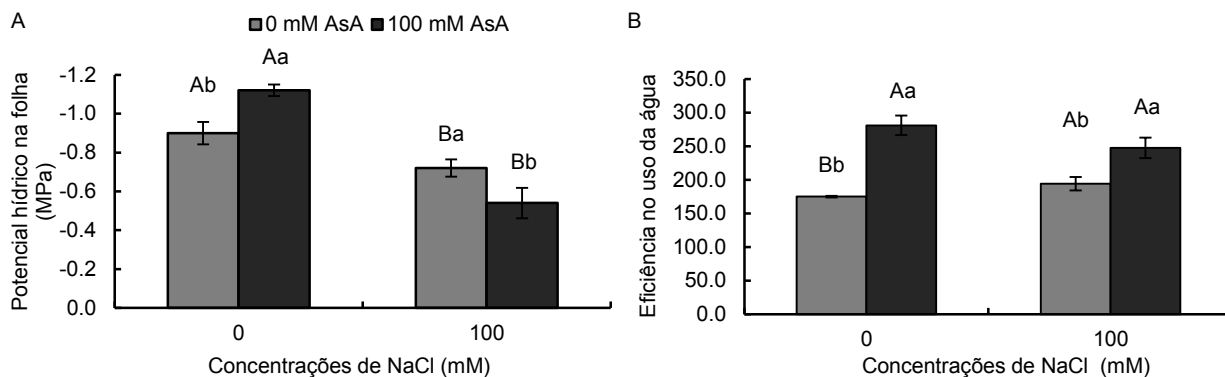


Figura 1: Potencial hídrico foliar (A) e eficiência de uso de água (B) em plantas de Micro-Tom. Letras minúsculas diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre as concentrações de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas nas concentrações de AsA entre as concentrações de NaCl, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

4.2 Pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila-a

Para o teor de clorofila total e carotenóides, houve efeito significativo de NaCl e AsA (Figura 2A e B). A clorofila total foi significativamente afetada pela interação entre os fatores AsA e NaCl. As plantas com pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) e submetidas a NaCl (0 e 100 mM) apresentaram maior teor de clorofila total. No entanto, a presença de NaCl (100 mM) proporcionou um aumento pronunciado no teor total de clorofila apenas nas plantas sem o pré-tratamento de sementes com AsA (Figura 2A). Assim como observado para a clorofila total, foi demonstrado efeito significativo da interação entre AsA e NaCl no conteúdo de carotenóides. As plantas com pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) apresentaram maior teor de carotenóides quando submetidas as concentrações de NaCl (0 e 100 mM). No entanto, as plantas com pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) e submetidas a 100 mM de NaCl exibiram menor teor de carotenóides em comparação com plantas controle (0 mM NaCl) (Figura 2B).

Para a análise fv:fm, não foi observado efeito significativo da interação entre os fatores AsA e NaCl, mesmo com o fator AsA. As plantas crescidas em 100 NaCl exibiram diminuição da fluorescência da clorofila-a, independentemente do pré-tratamento de sementes com AsA (Figura 2C). Em contraste com a fluorescência da clorofila-a, foi observado efeito significativo da interação NaCl e AsA para a taxa de transporte eletrônico (TTE); a taxa foi reduzida em plantas condicionadas com AsA (100 mM) sob condições normais e de estresse (0 e NaCl 100 mM). Além disso, plantas crescidas em 100 NaCl exibiram diminuição da TTE, independentemente do pré-tratamento de sementes com AsA (Figura 2D).

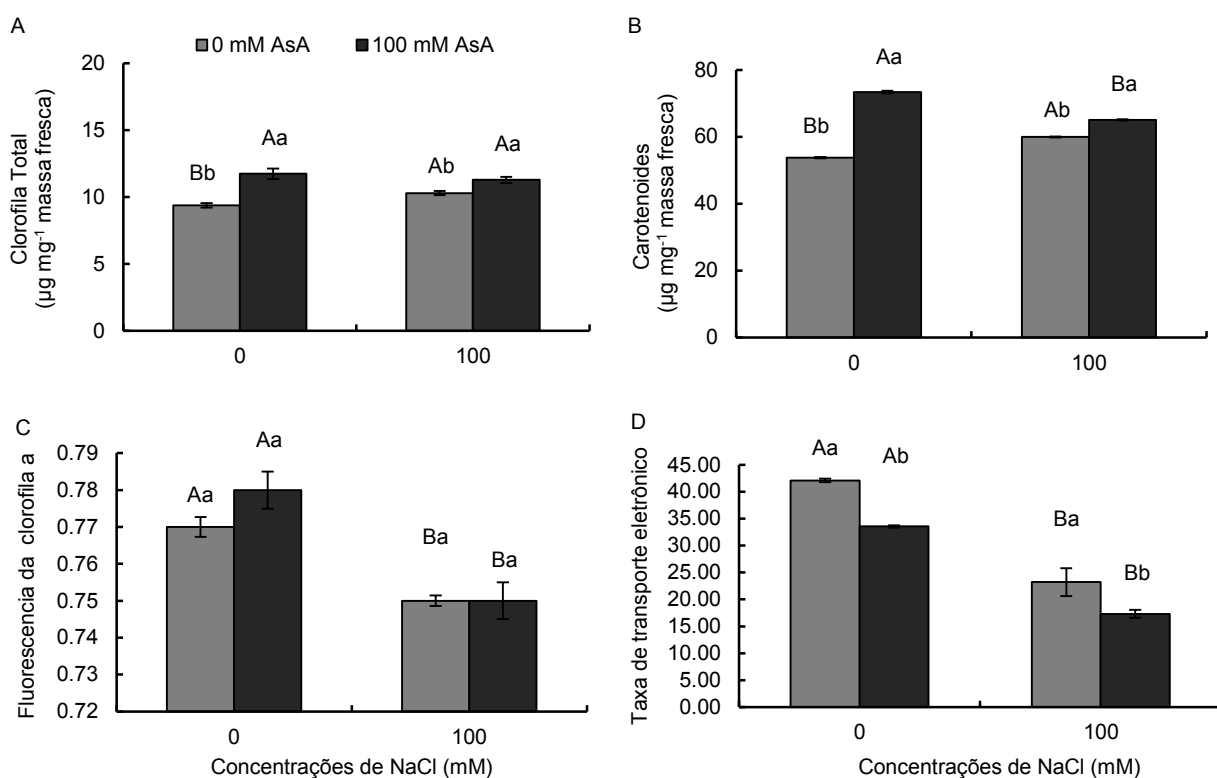


Figura 2: Teor de clorofila total (A) e carotenóides (B), fv:m (C), taxa de transporte eletrônico (D) de Micro-Tom. Letras minúsculas diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre as concentrações de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas nas concentrações de AsA entre as concentrações de NaCl, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

4.3 Peroxidação lipídica e concentração de H_2O_2

A peroxidação lipídica, expressa como o teor de MDA, foi semelhante nas raízes, folhas e frutos das plantas onde foi observado efeito significativo da interação NaCl e AsA (Figura 3A, B e C). Nas raízes, o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) reduziu o teor de MDA tanto em 0 quanto em 100 mM de NaCl. Por outro lado, não foi observado efeito significativo do NaCl sobre o teor de MDA, seja na presença ou ausência de AsA (Figura 5A). Para as folhas e frutos, assim como nas raízes, o teor de MDA foi reduzido quando o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) foi utilizado, tanto em 0 quanto em 100 mM de NaCl. Além disso, independente do pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM), as plantas expostas a concentração 100 mM de NaCl apresentaram maior teor de MDA nestes tecidos quando comparadas as plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM) (Figura 5B e C).

Para a concentração de H_2O_2 , foi observado efeito significativo da interação NaCl e AsA nos tecidos analisados (Figura 3D, E e F). Nas raízes, o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) reduziu a concentração de H_2O_2 em ambas as concentrações de NaCl (0 e 100 mM). Além disso, pode-se verificar que houve resposta significativa ao NaCl (100 mM) apenas com o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM), com redução da concentração de H_2O_2 em 100 mM de NaCl (Figura 3D).

Já nas folhas, a concentração de H_2O_2 aumentou nas plantas com o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) em ambas as concentrações de NaCl (0 e 100 mM), sendo que as plantas expostas a 100 mM de NaCl apresentaram a maior concentração de H_2O_2 com o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) (Figura 3E). Nos frutos, o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) reduziu a concentração de H_2O_2 nas plantas expostas apenas em 100 mM de NaCl. No entanto, a ausência de NaCl não alterou esta variável. A concentração de H_2O_2 foi maior na ausência de NaCl (0 mM) independentemente do pré-tratamento com AsA (100 mM) (Figura 3F).

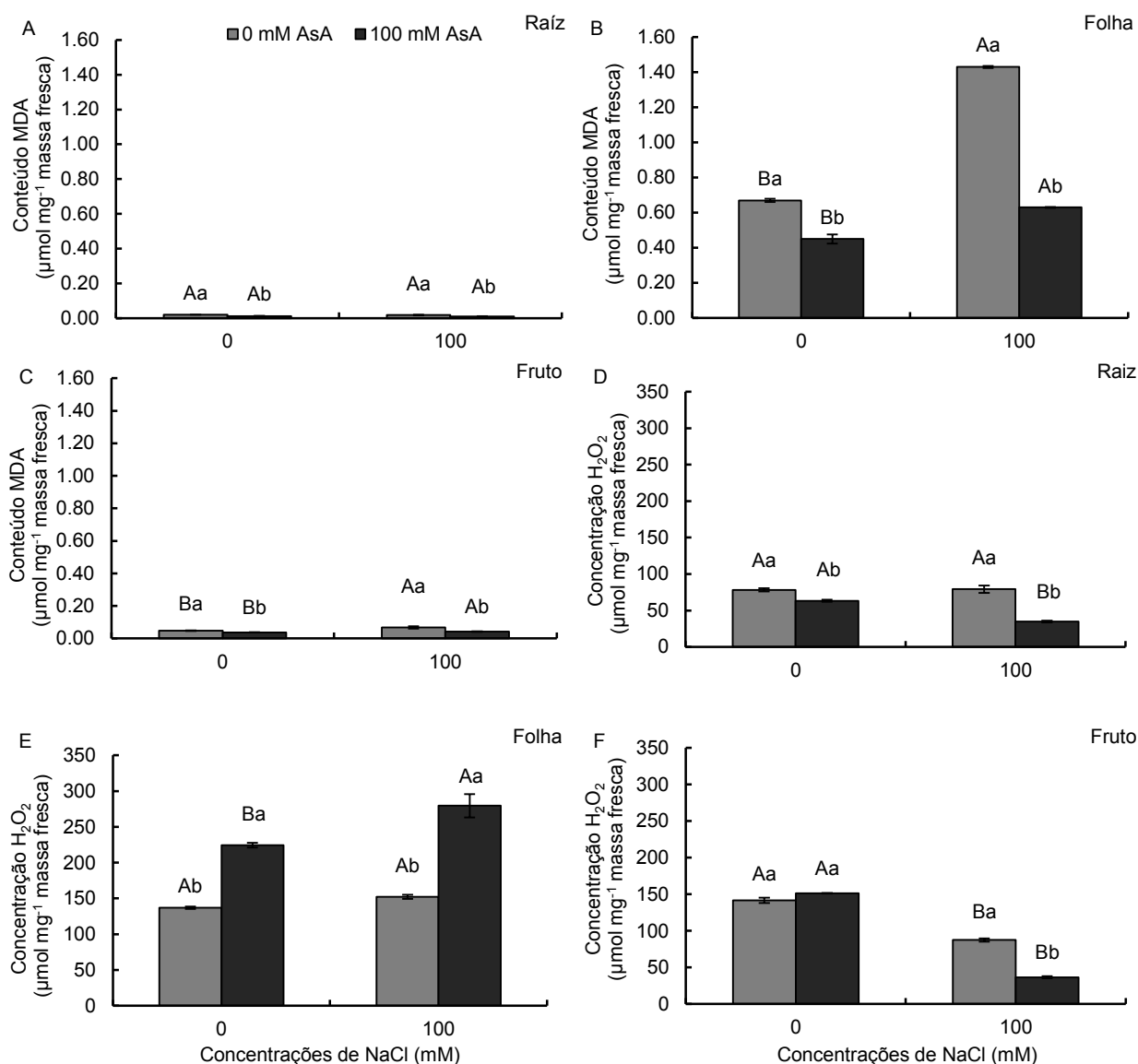


Figura 3: Teor de MDA nas raízes (A), folhas (B) e frutos (C), concentração de H₂O₂ nas raízes (D), folhas (E) e frutos (F) de Micro-Tom. Letras minúsculas diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre as concentrações de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas nas concentrações de AsA entre as concentrações de NaCl, de acordo com o teste de Tukey (α = 0,05).

4.4 Atividade antioxidante enzimática

As atividades da CAT (Figura 4D, E e F), APX (Figura 5A, B e C), POX (Figura 5D, E e F), GPX (Figura 6A, B e C) e GR (Figura 6D, E e F) são fundamentais para a desintoxicação de qualquer excesso de H_2O_2 produzido pela SOD (Figura 4A, B e C) e/ou outros processos metabólicos.

A atividade da SOD apresentou resposta significativa para a interação NaCl e AsA em raiz, folha e fruto (Figura 4A, B e C). Na raiz foi observado que a atividade da SOD foi reduzida com o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) quando as plantas foram expostas a 100 mM de NaCl. Além disso, independentemente do pré-tratamento de sementes com AsA, a maior atividade da SOD ocorreu nas raízes das plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM) (Figura 4A). Já nas folhas e frutos, a atividade da SOD ocorreu de forma semelhante, onde o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) aumentou a atividade da SOD nos tecidos, independentemente da concentração de NaCl. A maior atividade de SOD ocorreu em folhas e frutos das plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM) independente do pré-tratamento de sementes com AsA (0 e 100 mM), quando comparadas as plantas expostas a salinidade (100 mM de NaCl) (Figura 4B e C).

A atividade da CAT apresentou resposta significativa à interação entre os fatores NaCl e AsA para todos os tecidos analisados (raízes, folhas e frutos), observando-se uma tendência do aumento de atividade com o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) (Figura 4D, E e F). No entanto, a atividade da CAT nas raízes foi maior quando as plantas foram cultivadas na ausência de NaCl independente do pré-tratamento com AsA (0 e 100 mM). Já nas folhas, a atividade foi maior quando as plantas foram cultivadas na presença de NaCl (100 mM) independente do pré-tratamento com AsA (0 e 100 mM) em comparação com as plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM). Em frutos também foi observado que a atividade da CAT foi maior nas plantas expostas a 100 mM de NaCl com o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) em comparação com as plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM).

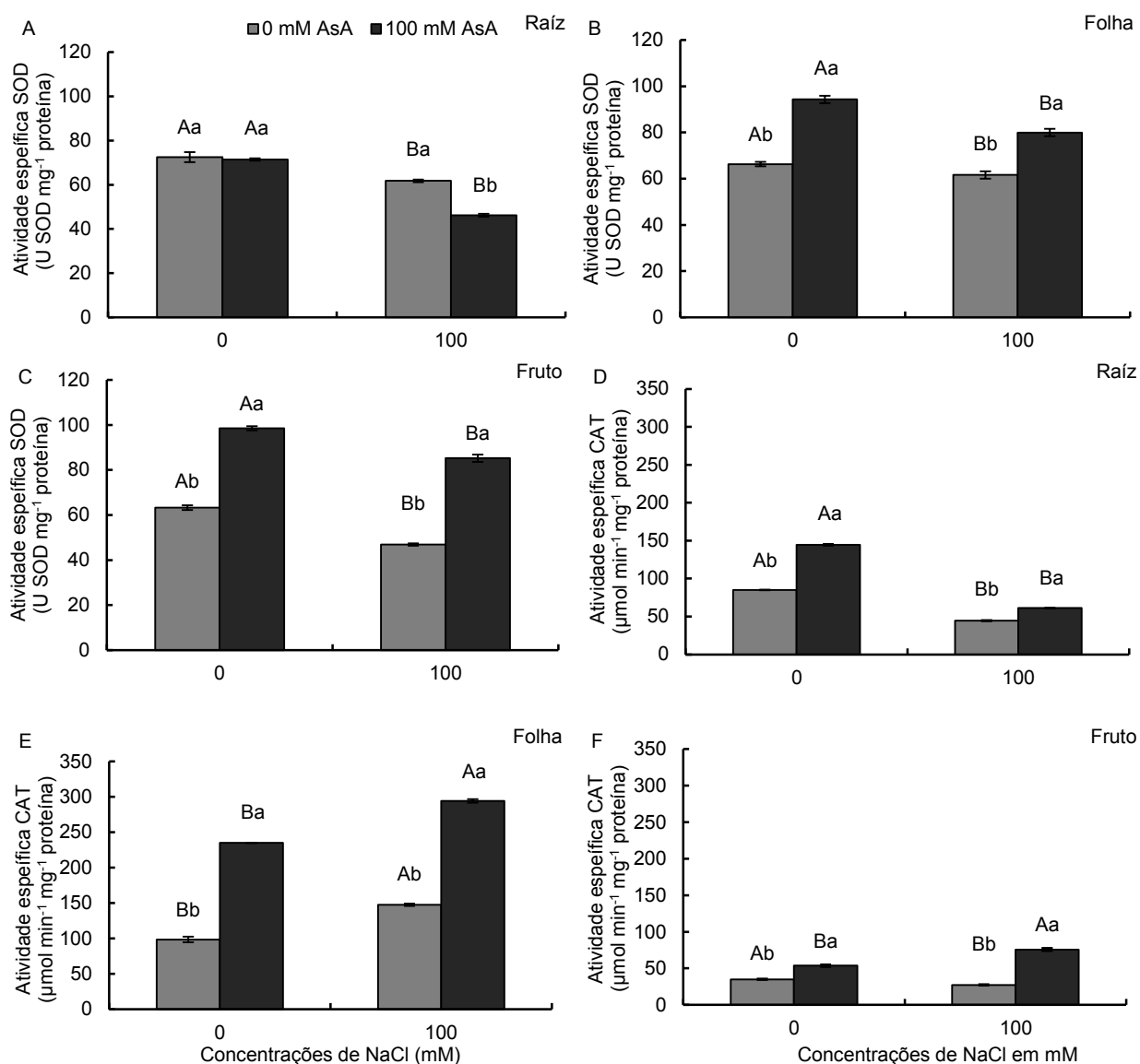


Figura 4: Atividade específica da SOD nas raízes (A), folhas (B) e frutos (C), atividade específica da CAT nas raízes (D), folhas (E) e frutos (F) de Micro-Tom. Letras minúsculas diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre as concentrações de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas nas concentrações de AsA entre as concentrações de NaCl, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

A atividade da APX foi afetada pela interação entre os fatores NaCl e AsA em todos os tecidos analisados (raiz, folha e fruto), onde o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) desencadeou aumento na atividade enzimática nos tecidos das plantas, exibindo atividade da APX superior em relação as plantas que não tiveram pré-tratamento de sementes com AsA (0 mM), quando expostas em ambas as concentrações de NaCl (0 e 100 mM) (Figura 5A, B e C).

No entanto, quando se compara a atividade da APX nas plantas entre as concentrações de NaCl (0 e 100 mM), observa-se que nas raízes, a atividade foi maior quando as plantas foram cultivadas na presença de NaCl (100 mM) com o pré-tratamento com AsA (100 mM) (Figura 5A). Já nas folhas, a atividade só foi maior nas plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM) e do pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) (Figura 5B). Nos frutos, a atividade da APX foi maior nas plantas expostas a 100 mM de NaCl, independente do pré-tratamento de sementes com AsA (0 e 100 mM) em comparação com as plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM) (Figura 5C).

A atividade da POX apresentou efeito significativo da interação NaCl e AsA em todos os tecidos analisados, raízes, folhas e frutos, onde o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) aumentou a atividade da POX nos tecidos das plantas independente da salinidade (0 e 100 mM de NaCl), exceto para os frutos, onde o pré-tratamento de sementes com AsA reduziu a atividade da POX nas plantas cultivadas em 100 mM de NaCl (Figuras 5D, E e F). No entanto, nas raízes e frutos, a atividade foi maior na presença de NaCl (100 mM) independente do pré-tratamento de sementes com AsA (0 e 100 mM) em comparação com as plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM). Nas folhas, a atividade foi maior nas plantas cultivadas na presença de NaCl (100 mM), apenas com o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM).

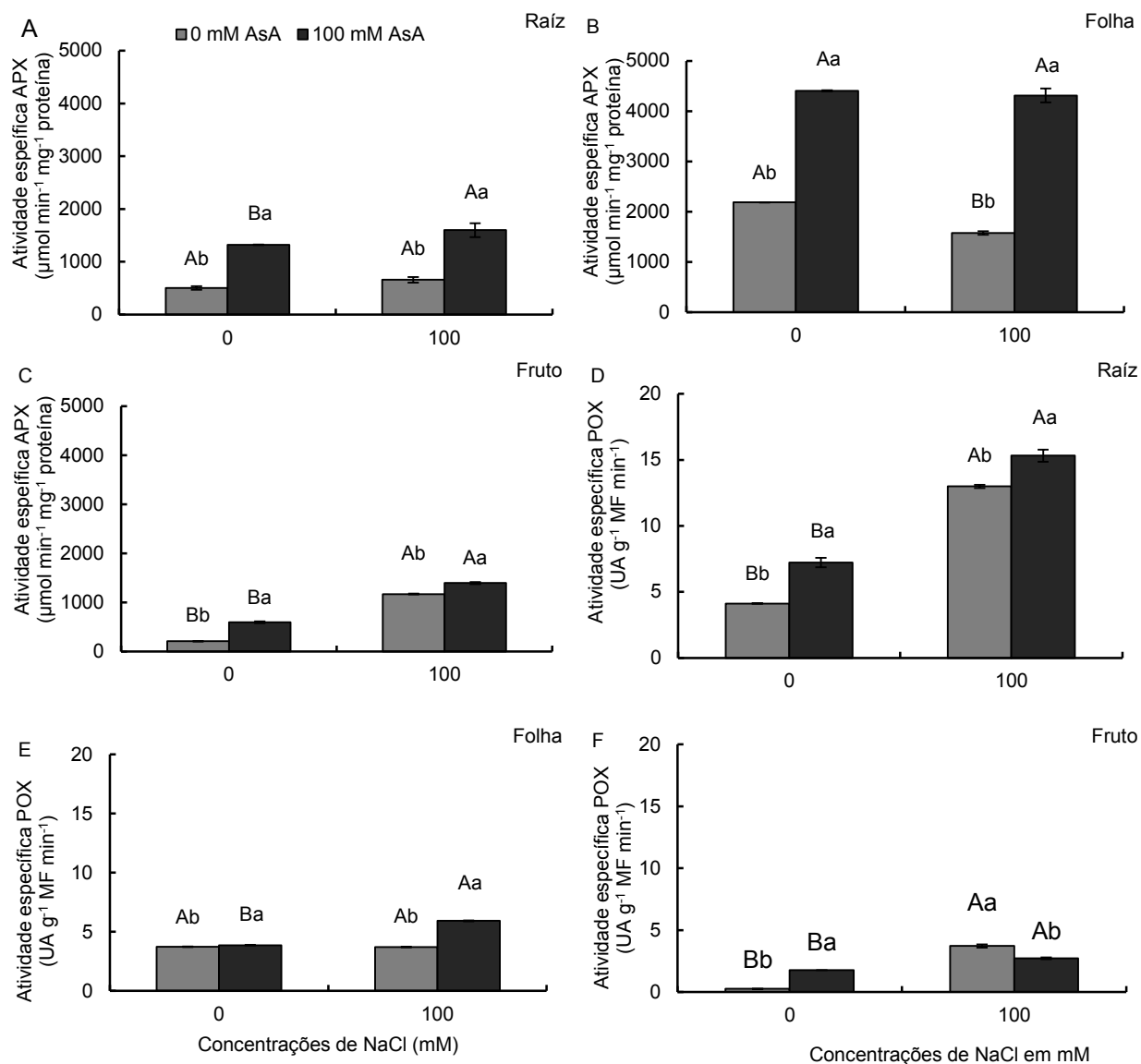


Figura 5: Atividade específica da APX nas raízes (A), folhas (B) e frutos (C), atividade específica da POX nas raízes (D), folhas (E) e frutos (F) de Micro-Tom. Letras minúsculas diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre as concentrações de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas nas concentrações de AsA entre as concentrações de NaCl, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

A atividade da GPX apresentou resposta significativa à interação entre os fatores NaCl e AsA em todos os tecidos analisados (raízes, folhas e frutos), onde o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) aumentou a atividade da GPX nos tecidos das plantas independente da salinidade (0 e 100 mM de NaCl) (Figuras 6A, B e C). No entanto, quando se compara a atividade da GPX nas plantas entre as concentrações de NaCl (0 e 100 mM), observa-se que nas raízes, a atividade foi maior nas plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM) e pré-tratadas com AsA (100 mM). Nas folhas e frutos, a atividade foi maior nas plantas cultivadas na presença de NaCl (100 mM), independente do pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) em comparação com as plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM).

A atividade da GR apresentou efeito significativo da interação NaCl e AsA em todos os tecidos analisados, raízes, folhas e frutos, onde o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) aumentou a atividade da GR nos tecidos das plantas independente da salinidade (0 e 100 mM de NaCl), exceto para as raízes, onde o pré-tratamento de sementes com AsA reduziu a atividade da GR nas plantas cultivadas em 100 mM de NaCl (Figuras 6D, E e F). No entanto, quando se compara a atividade da GR nas plantas entre as concentrações de NaCl (0 e 100 mM), observa-se que nas raízes a atividade foi maior quando as plantas foram cultivadas na ausência de NaCl (0 mM) independente do pré-tratamento de sementes com AsA (0 e 100 mM). Nas folhas, a atividade foi maior nas plantas cultivadas na presença de NaCl (100 mM) independente do pré-tratamento de sementes com AsA (0 e 100 mM) em comparação com as plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM). Em frutos, a atividade da GR só foi maior nas plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM) quando o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) não foi utilizado.

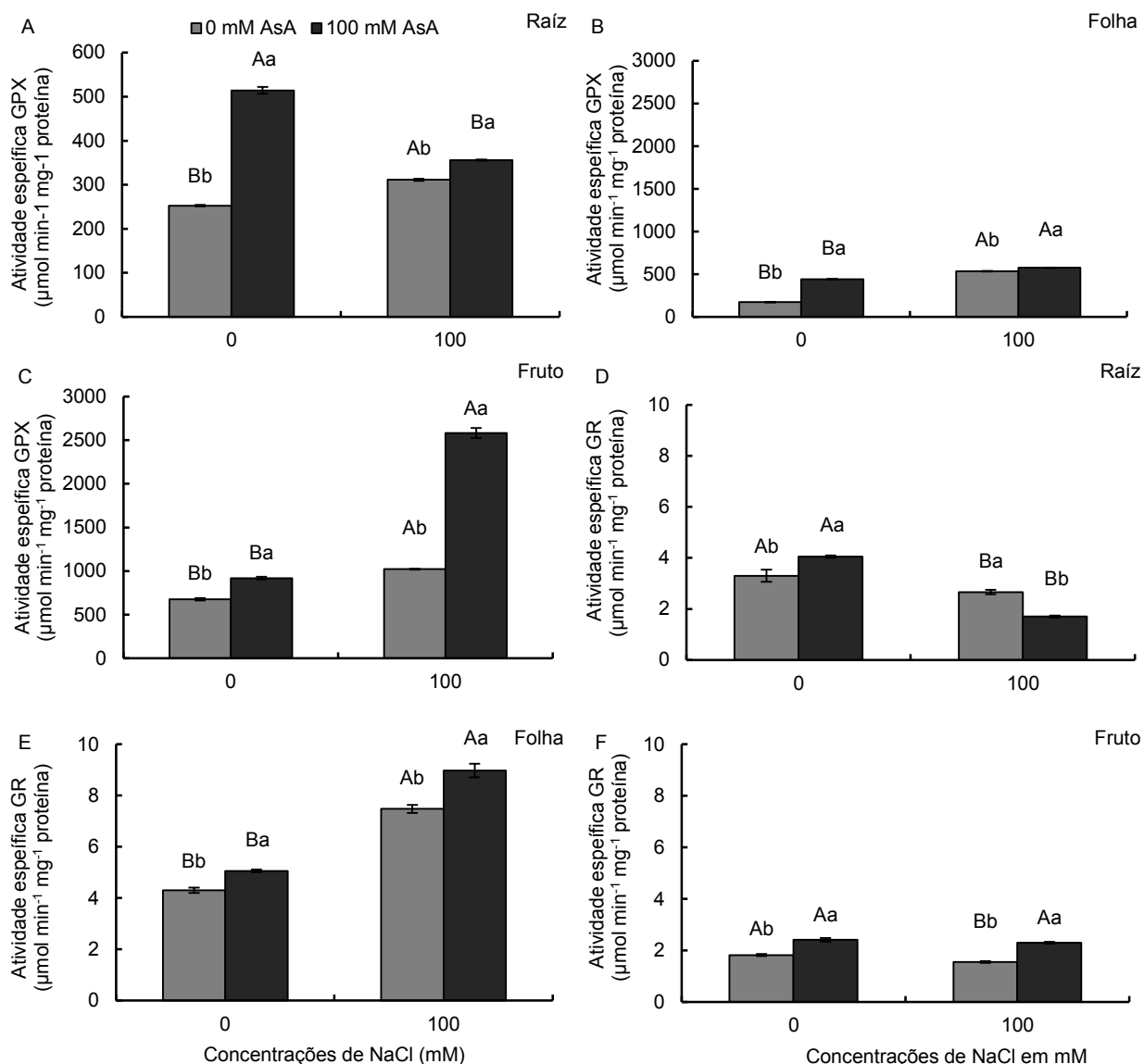


Figura 6: Atividade específica de GPX nas raízes (A), folhas (B) e frutos (C), atividade específica de GR nas raízes (D), folhas (E) e frutos (F) de Micro-Tom. Letras minúsculas diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre as concentrações de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas nas concentrações de AsA entre as concentrações de NaCl, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

4.5 Antioxidante não enzimático

4.5.1 Conteúdo GSH

Para o composto GSH foi observado efeito significativo da interação NaCl e AsA em todos os tecidos analisados, raízes, folhas e frutos, onde o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) aumentou o conteúdo GSH nos tecidos das plantas independente da salinidade (0 e 100 mM de NaCl), exceto para os frutos, onde o pré-tratamento de sementes com AsA reduziu o conteúdo GSH nas plantas cultivadas em 100 mM de NaCl (Figuras 7A, B e C). No entanto, o conteúdo GSH nas raízes foi maior quando as plantas foram cultivadas na ausência de NaCl (0 mM) e pré-tratadas com AsA (100 mM) em comparação com as plantas cultivadas na presença de NaCl (100 mM). Nas folhas, o conteúdo de GSH foi maior nas plantas cultivadas na presença de NaCl (100 mM) com o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM). A salinidade (100 mM) sem o pré-tratamento de sementes com AsA, reduziu o conteúdo GSH em comparação com as plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM). Nos frutos, o conteúdo GSH foi reduzido nas plantas expostas a salinidade (100 mM de NaCl) e pré-tratadas com AsA (100 mM) em comparação as plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM).

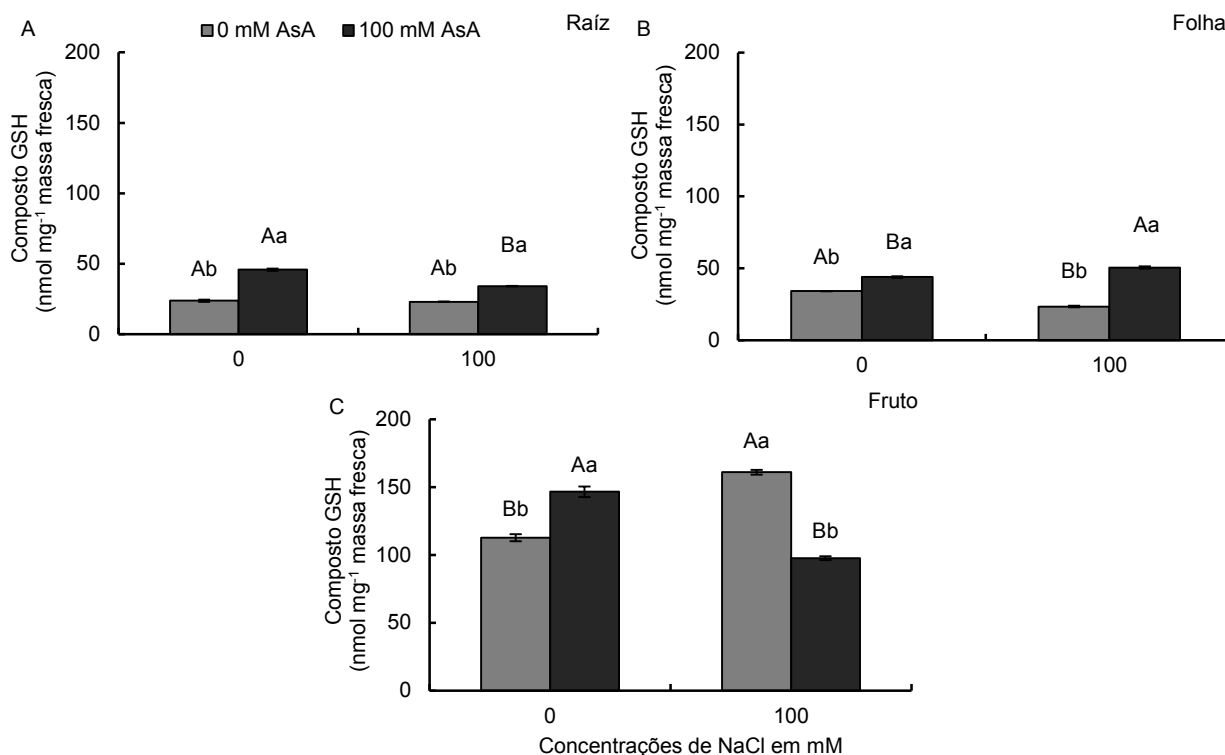


Figura 7: Teor de GSH nas raízes (A), folhas (B) e frutos (C) de Micro-Tom. Letras minúsculas diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre as concentrações de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas nas concentrações de AsA entre as concentrações de NaCl, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

4.6 Acúmulo de Na⁺

Para o acúmulo de Na⁺ em raízes, folhas e frutos, houve interação entre as concentrações de NaCl e AsA (Figura 8). Nas raízes, ocorreu o acúmulo de Na⁺ apenas nas plantas que foram expostas a 100 mM de NaCl com o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) (Figura 8A). Por outro lado, ocorreu maior acúmulo de Na⁺ nas raízes das plantas expostas a 100 mM de NaCl, independente do pré-tratamento com AsA (0 e 100 mM). Nas folhas, houve aumento no acúmulo de Na⁺ nas plantas controle (sem sal) com o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM), enquanto as plantas

submetidas a salinidade e pré-tratadas com AsA, apresentaram redução no acúmulo de Na^+ (Figura 8B). As plantas expostas a concentração 100 mM de NaCl sem o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) apresentaram maior acúmulo de Na^+ nas suas folhas (Figura 8B). Nos frutos, o maior acúmulo de Na^+ ocorreu nas plantas sem o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) independente da concentração de NaCl (0 e 100 mM) (Figura 8C). E quando se compara o acúmulo de Na^+ nos frutos das plantas entre as concentrações de NaCl, o maior acúmulo de Na^+ ocorreu nos frutos das plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM) independente do pré-tratamento de sementes com AsA (0 e 100 mM).

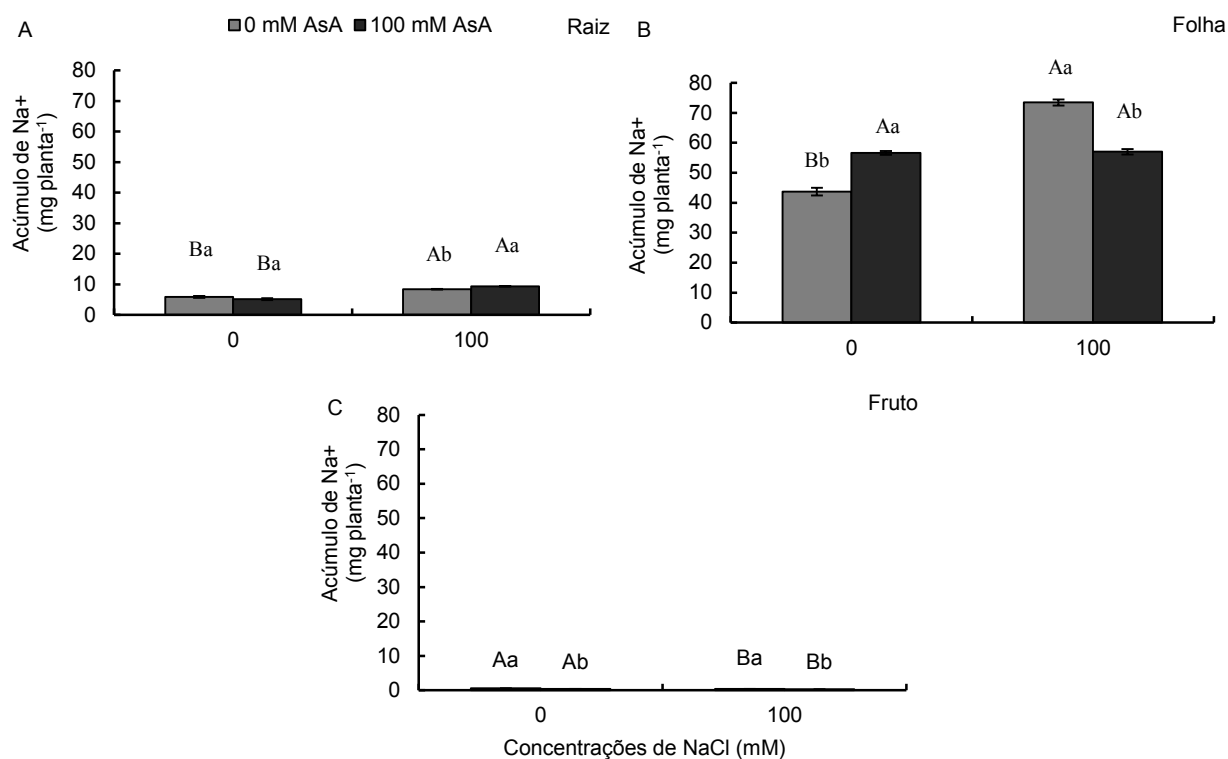


Figura 8: Acúmulo de Na^+ em raiz (A), folha (B) e fruto (C) em plantas de Micro-Tom. Letras minúsculas diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre as concentrações de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas nas concentrações de AsA entre as concentrações de NaCl, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

4.7 Crescimento de plantas e produção de frutos

Para a massa seca nos tecidos raiz, folha e fruto foi observado interação do AsA com NaCl (Figura 9). A massa seca das raízes foi reduzida em plantas com o pré-tratamento com AsA e cultivadas na ausência de NaCl (0 mM) (Figura 9A). Entretanto, a massa seca das raízes das plantas submetidas a 100 mM de NaCl foi reduzida, independente do pré-tratamento de sementes com AsA (0 e 100 mM). Nas folhas e frutos, o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) aumentou a massa seca de ambos os tecidos nas plantas, independente da concentração de NaCl (0 e 100 mM) (Figura 9B e C). Na concentração de 100 mM de NaCl, houve redução da massa seca de folhas e frutos, independente do pré-tratamento com AsA (0 e 100 mM).

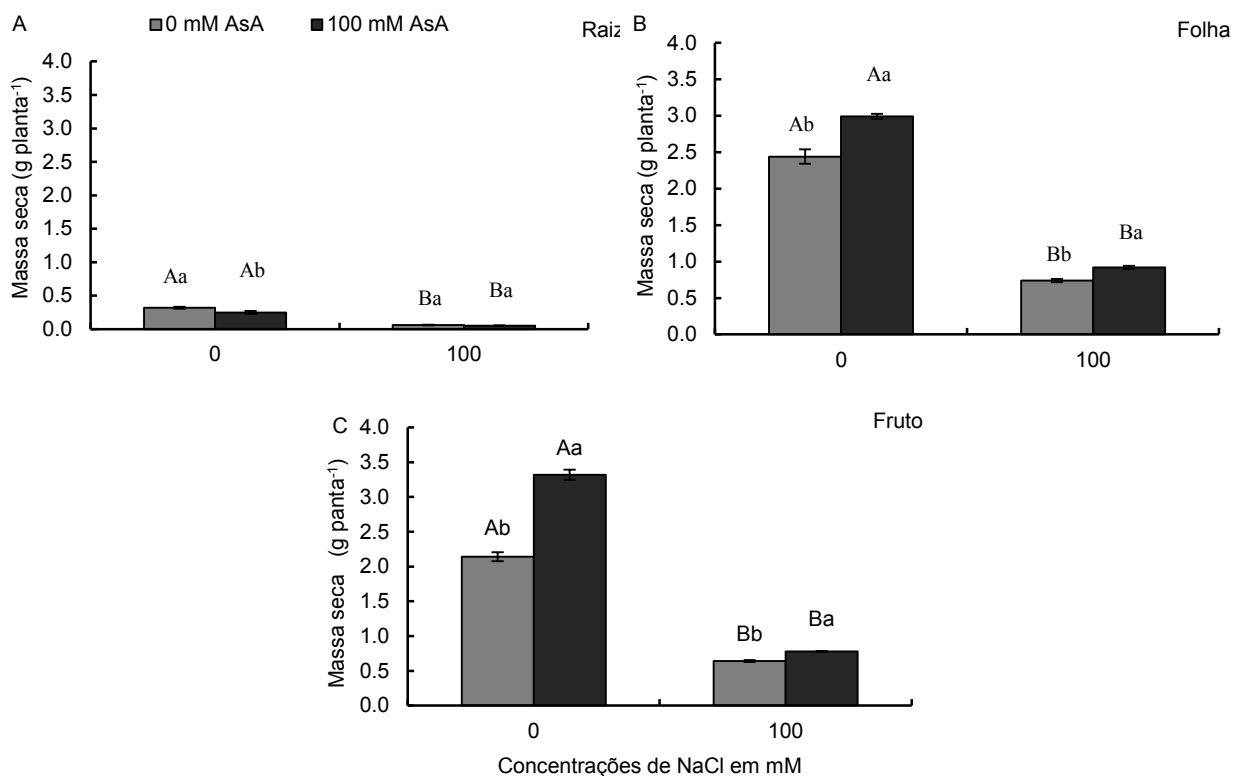


Figura 9: Massa seca de raiz (A), folha (B) e fruto (C) de plantas de Micro-Tom. Letras minúsculas diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre as concentrações de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas

diferentes indicam diferenças significativas nas concentrações de AsA entre as concentrações de NaCl, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Assim como para o crescimento de plantas, foi observado efeito significativo da interação NaCl e AsA para o número de frutos (NFR) e produção (Figure 10A e B). O maior número de frutos obtido ocorreu quando o pré-tratamento com AsA (100 mM) foi realizado na ausência ou presença do sal. O aumento de NFR foi de 29 e 24% nas concentrações 0 e 100 mM de NaCl, respectivamente (Figure 10A). No entanto, a salinidade (100 mM de NaCl) reduziu o NFR, independente do pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM). Por outro lado, a maior produção de frutos ocorreu quando o pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) foi utilizado nas plantas, tanto na ausência (39%) quanto na presença de NaCl (0 e 100 mM) (22%). Dessa forma, independente do pré-tratamento de AsA, a salinidade (100 mM de NaCl) reduziu a produção em comparação as plantas cultivadas na ausência de NaCl (0 mM) (Figura 10B).

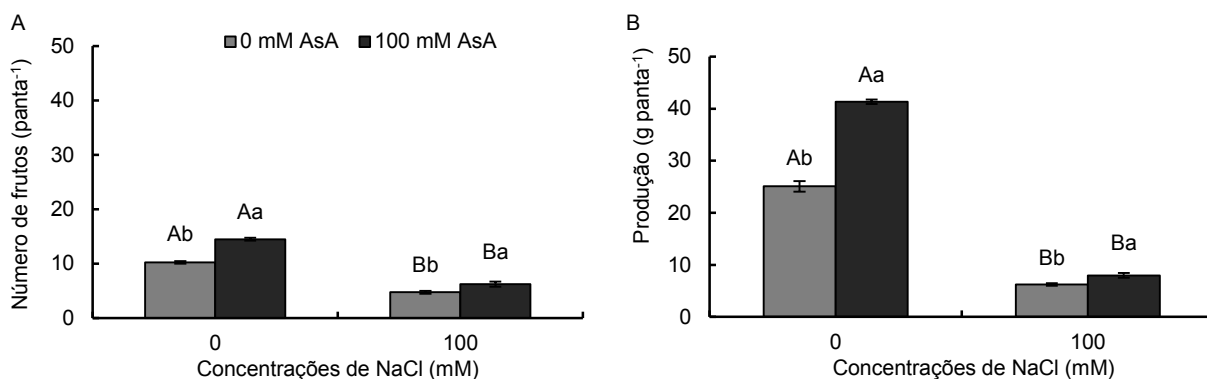


Figura 10: Número de frutos (A) e produção (B) em plantas de Micro-Tom. Letras minúsculas diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre as concentrações de AsA dentro de cada concentração de NaCl, e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas nas concentrações de AsA entre as concentrações de NaCl, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A redução no potencial hídrico foliar e na eficiência do uso da água nas plantas são efeitos comuns causados pela salinidade e são seguidos por uma redução na área foliar e baixa transpiração, que por sua vez afeta o crescimento e desenvolvimento das plantas (Al-Omran et al., 2012, Zhang et al., 2016). Os resultados gerais mostraram que quando as plantas foram expostas a condições de alta salinidade (100 mM de NaCl), PHF e EUA foram reduzidos (Figura 1A e B); no entanto, o uso de AsA mostrou um efeito positivo, aumentando o LWP e WUE quando as plantas foram expostas a 100 mM de NaCl. O PHF é caracterizado pelo equilíbrio entre a perda de vapor de água das folhas para a atmosfera e a absorção de água pelas raízes, onde ele tem uma relação direta com a EUA, uma vez que a disponibilidade de água afeta a abertura dos estômatos e pode comprometer o acúmulo de fotoassimilados em plantas (Akram et al., 2009, Jabeen e Ahmad, 2012, Kaya et al., 2017).

Nosso trabalho mostra que o AsA pode ser efetivo em melhorar o desempenho das plantas sob condições estressantes, e este efeito benéfico do AsA pode estar relacionado às suas múltiplas funções nas plantas, como o controle da divisão e expansão celular, uso como cofator de muitas enzimas, biossíntese de hormônios, envolvimento na fotossíntese e a regeneração de antioxidantes (Gallie, 2012).

O estresse salino afeta diretamente a taxa fotossintética das plantas, o que pode estar relacionado à redução dos pigmentos fotossintéticos, como a clorofila total e os carotenóides, que, por sua vez, quando reduzidos, podem refletir em crescimento reduzido das plantas (Gomes et al., 2017). Os resultados mostraram que a salinidade diminuiu o teor de clorofila total e carotenóides; no entanto, o pré-tratamento de sementes com AsA foi benéfico, já que o conteúdo desses pigmentos foi maior (Figura 2A e B). A função e estrutura de diferentes componentes fotossintéticos influenciam diretamente na eficiência de alguns pigmentos fotossintéticos, como a clorofila-a, que atua nos centros de reação tanto do fotossistema I como do fotossistema II (PSI e PSII) e desempenha um papel crucial entre outros pigmentos fotossintéticos (Xing et al.,

2013, Sayyad-Amin et al., 2016). Por exemplo, os carotenóides são pigmentos importantes que podem atuar como antioxidantes, protegendo os lipídios da membrana plasmática do estresse oxidativo gerado nas plantas sob estresse salino (Falk e Munné-Bosch, 2010, Gomes et al., 2017).

Nesse sentido, a resposta da fluorescência da clorofila-a aos fatores ambientais tornou-se uma variável muito importante na pesquisa, pois permite acompanhar o comportamento dos fotossistemas I e II (Sayyad-Amin et al., 2016). A fotossíntese, incluindo suas reações fotoquímicas, pode ser danificada pelo estresse salino. Este dano é atribuído à degradação das moléculas de clorofila, além da limitação da síntese de clorofila, que é devido ao excesso de energia que não pode ser convertido em fluxo de elétrons e que pode causar danos ao aparelho fotossintético (Florina et al., 2013, xing et al., 2013, Memom et al., 2013).

No entanto, para evitar esse dano, esse excesso de energia deve ser rapidamente dissipado, e a maneira mais fácil e rápida é através da fluorescência (Stirbet e Govindjee, 2011). Sabemos que os rendimentos e a absorção da eficiência quântica das reações fotoquímicas da fotossíntese são parâmetros que mostram a influência do estresse na absorção e conversão da energia solar durante a fotossíntese (Van-Heerden et al., 2004, Stirbet e Govindjee, 2011, Sayyad-Amin et al., 2016). De acordo com nossos resultados, a salinidade na verdade reduziu a $f_v:f_m$ e a TTE, embora o AsA tenha influenciado apenas a TTE reduzindo-a (Figura 2C e D). Esses resultados podem estar relacionados a um sinal de RuBP (ribulose-1,5-bifosfato) causado pela salinidade, que é dependente da transmissão de elétrons do PSII para os receptores de elétrons (Kafi, 2009, Sayyad-Amin et al., 2016).

A salinidade pode causar estresse osmótico, limitando a disponibilidade de água às plantas, reduzindo a abertura dos estômatos e a condutância estomática, e causando um alto acúmulo de íons tóxicos, principalmente Na^+ e Cl^- , nas plantas (Bonomelli et al., 2018, Rady e Mohamed, 2018). Quando os íons Na^+ estão presentes em altas concentrações no citoplasma, eles podem perturbar a captação de outros íons pelas células vegetais, o que pode causar efeitos adversos em muitas vias metabólicas (Yang e Guo, 2018). Um alto acúmulo de sais em diferentes tecidos das plantas, como

nas raízes e folhas pode alterar o metabolismo e o crescimento normal das plantas (Akram et al., 2017, Alves et al., 2018a,b). Além disso, o Na^+ é transportado das raízes para as folhas na corrente de transpiração, onde se acumula até causar efeitos tóxicos nas plantas e interfere diretamente no crescimento das plantas (Bonomelli et al., 2018, Alves et al., 2018a, Zhou et al., 2018).

Os resultados mostraram que apesar do alto acúmulo de Na^+ nas plantas sob 100 mM de NaCl, o AsA reduziu os níveis de Na^+ (Figura 8), e as plantas que tiveram pré-tratamento com AsA (100 mM) apresentaram maior crescimento e produção quando comparadas com as plantas cultivadas somente na presença de NaCl (Figuras 9). A aplicação exógena de AsA é benéfica na melhoria do crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas sob estresse salino (Hussein e Alva, 2014; Barus et al., 2015, Ahmed et al., 2016). Desta forma, nosso estudo mostra que, além da aplicação exógena de AsA, o uso do pré-tratamento de sementes com AsA também alivia os efeitos tóxicos da salinidade.

Além disso, a aplicação de AsA pode diminuir os níveis de ERO, evitando a peroxidação lipídica (Azzedine et al., 2011), e pode ser eficaz na regulação da atividade de muitas enzimas chave no sistema de defesa antioxidante em plantas sob estresse salino (Hameed et al., 2015). De acordo com os resultados, o pré-tratamento de sementes com AsA reduziu o teor de MDA nas raízes, folhas e frutos (Figura 3A, B e C). A peroxidação lipídica é um processo de auto-oxidação não enzimática que é usado como medida do dano oxidativo ou da sensibilidade da planta à salinidade (Ozgun et al., 2013) e, geralmente, o conteúdo de MDA (subproduto final da peroxidação lipídica) é o indicativo de medida do dano oxidativo (Hameed et al., 2015).

Outro indicador de dano oxidativo é o H_2O_2 , que, apesar de ser considerado uma das mais estáveis ERO e que em baixas concentrações, atua como um sinal de defesa nas plantas; quando em excesso implica na formação do estresse oxidativo, podendo ocasionar a morte celular programada (Dat et al., 2000, Roy et al., 2016). Os resultados do presente estudo mostraram que o AsA reduziu o conteúdo de H_2O_2 nas raízes e frutos (Figura 3D e F), no entanto, nas folhas ocorreu resposta inversa onde o pré-tratamento de sementes com AsA incrementou o conteúdo de H_2O_2 (Figura 3E). Este

resultado pode ser atribuído devido o H_2O_2 assim como o ABA ser um dos sinalizadores que ativa o fechamento estomático (Suhita et al., 2004, Deuner et al., 2008). De fato, nossos resultados mostraram maior WUE nas plantas com pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) sob condições normais e de estresse (0 e 100 mM NaCl), que apresentaram maiores teores de H_2O_2 e consequentemente maior PHF (Figura 1A e B).

Além disso, o H_2O_2 pode ser sintetizado por vários meios, incluindo vias enzimáticas e não enzimáticas em plantas, e também pode estar envolvido em vias de transdução de sinalização celular e mudanças na expressão de genes em plantas (Niu e Liu, 2016). Portanto, esse aumento pode ter sido uma resposta positiva do H_2O_2 , pois embora as plantas submetidas ao estresse salino tivessem crescimento reduzido, elas permaneceram vivas até o final do experimento.

Curiosamente, a aplicação de AsA também poderia reduzir o conteúdo de H_2O_2 , como foi observado em alguns estudos (Korkmaz et al., 2010, Liu et al., 2011, Zhen et al., 2012). Estes resultados mostram que o AsA pode regular o sistema de defesa da planta e regular diretamente o H_2O_2 porque o AsA é um antioxidante chave para a eliminação do H_2O_2 . O AsA também pode extrair diretamente $O_2^{\cdot-}$ e $OH^{\cdot}$ e regenerar carotenóides oxidados ou α -tocoferol (Gill e Tuteja, 2010, Niu e Liu, 2016) e reduzir o dano oxidativo devido à sua ação sinérgica com outros antioxidantes. O poder antioxidante do AsA nas células vegetais ocorre devido à sua grande capacidade de doar elétrons para reações enzimáticas e não enzimáticas (Racchi, 2013).

A atividade de enzimas como SOD (Figura 4B e C), CAT (Figura 4D, E e F), APX (Figura 5A, B e C), POX (Figura 5D, E e F), GPX (Figura 6A, B e C) e GR (Figura 6E e F) aumentou significativamente nas raízes, folhas e frutos com o uso pré-tratamento de sementes com AsA (100 mM) sob estresse salino (100 mM NaCl). No entanto, a SOD nas raízes (Figura 4A) e a GR (Figura 6D) exibiram baixa atividade nas plantas com pré-tratamento de sementes com AsA quando estas foram expostas a 100 mM de NaCl. A maior atividade das enzimas antioxidantes pode indicar uma intensificação na defesa da planta contra o dano oxidativo (Roy et al., 2016).

Alguns pesquisadores utilizando o AsA como atenuador de estresse salino obtiveram respostas satisfatórias na ativação do sistema de defesa antioxidante com

aumento na atividade de algumas enzimas, mas também, redução na atividade de outras (Athar et al., 2008, Roy et al., 2016). O aumento da atividade da SOD nas folhas com o uso de AsA sob condições de estresse salino (100 mM de NaCl) mostra o desempenho efetivo do mecanismo de defesa primário da planta contra o estresse salino, que tem a capacidade de converter ERO como superóxido (O_2^-) para formas mais estáveis como H_2O_2 (Afzal et al., 2014).

Entretanto, o excesso de água gerado pela decomposição de H_2O_2 pode diluir o gradiente de concentração dentro da planta, levando à perda de água nos casos em que as plantas estão em condições de alta salinidade e implicando em maior absorção de íons altamente tóxicos, que podem causar a morte da planta (Mittler, 2002, Jenks et al., 2007). Portanto, é necessário que outras enzimas que eliminem ou reduzam especificamente o H_2O_2 atuem como uma barreira de defesa. Por exemplo, CAT e APX agem diretamente na quebra de H_2O_2 (Chaudhary et al., 2015, Ma et al., 2018).

O aumento da atividade da CAT (Figura 4D, E e F) e APX (Figura 5A, B e C) pode reduzir o possível dano oxidativo causado pelo estresse salino (Roy et al., 2016). Além disso, a APX participa diretamente do ciclo ascorbato-glutationa, onde o H_2O_2 formado pela SOD é reduzido pelo ascorbato (Mittler 2002, Alves et al., 2018). Os resultados observados para CAT e APX podem estar diretamente relacionados à influência que o AsA exerce sobre a ativação do sistema de defesa enzimático (Athar et al., 2008, Tuna et al., 2013).

Outras peroxidases, como POX e GPX, também são enzimas chave na degradação de H_2O_2 (Passardi et al., 2004). A POX atua na remoção do H_2O_2 através do seu ciclo catalítico, que geralmente ocorre simultaneamente com a biossíntese da lignina nos apoplastos e resulta no espessamento da parede celular. No entanto, o aumento na atividade da POX nas raízes e folhas com o pré-tratamento de sementes com AsA (Figura 5D e E) pode ter ocorrido como uma forma de evitar o estresse oxidativo induzido por salinidade através da restrição do crescimento celular, uma vez que há indícios da indução do metabolismo fenólico em plantas como resposta ao estresse (Michalak, 2004).

A GPX está envolvida em vários papéis importantes nas plantas, como cascatas salinas e sinalização de ABA, na homeostase redox e catalisação da redução de H_2O_2 ou hidroperóxidos orgânicos em água (Zhai et al., 2013, Passaia et al., 2014). A GPX pode também estar envolvida em outras partes do metabolismo antioxidante, incluindo a remoção de peróxidos lipídicos (Racchi, 2013). Isso mostra que o aumento na atividade da GPX com o pré-tratamento de sementes com AsA pode reduzir as cascatas salinas, evitando o dano oxidativo que pode ser causado pelo estresse salino (Figura 6A, B e C).

Assim como as demais enzimas que fazem parte do sistema antioxidante de defesa nas plantas, a GR foi fundamental para evitar maiores danos oxidativos provocados pelo estresse salino (Figure 6E e F). A GR tem um papel chave contra os danos oxidativo causados pela salinidade, onde além de fazer parte do ciclo ascorbato-glutationa, ajuda na manutenção e equilíbrio do metabolismo entre a GSH, ascorbato (AsA) e degradação do H_2O_2 (Alves et al., 2017, Alves et al., 2018). Possivelmente, a redução da atividade da GR em raízes com o pré-tratamento de sementes com AsA tenha ocorrido pela ação efetiva destes compostos que atuam em conjunto com a GR. A GSH apresentou aumento do seu conteúdo em raízes e folhas com o pré-tratamento com AsA em condições de salinidade (Figure 7A e B), mostrando a estreita relação que tem com a GR, pois o composto GSH é regenerado a partir da glutatona (GSSG), onde esta é catalisada pela GR, tendo como agente redutor o NADPH (Gratão et al., 2012, Nogueirol et al., 2015). Portanto, assim como as enzimas antioxidantes, o composto não enzimático GSH tem fundamental importância nas plantas, onde atua nas células protegendo contra os danos oxidativo através da eliminação das ERO, regeneração e degradação de enzimas como a GR e GPX (Guo et al., 2016).

Embora a técnica de pré-tratamento de sementes ainda apresente várias questões sobre as alterações que ela causa no metabolismo vegetal; muitos estudos têm enfatizado sua importância e viabilidade de uso. O uso desta técnica pode conduzir à hidratação das sementes que ativa processos metabólicos, vias de reparo de DNA e mecanismos antioxidantes; todos esses processos ocorrem nos estágios iniciais de embebimentos sem emissão de radícula (Paul e Roychoudhury, 2016, Castañares e

Bouzo, 2017, Singh et al., 2018). No entanto, pouco se sabe sobre plantas com pré-tratamento de sementes com AsA na atenuação dos efeitos adversos da salinidade em relação ao metabolismo de defesa antioxidante e ao crescimento. Estudos têm se restringido a explicar a aplicação exógena e a geração de transgênicos com superexpressão de genes relacionados ao AsA, e os trabalhos com o uso de pré-tratamento de sementes somente mostram o efeito benéfico do AsA sem maiores explicações (Munir et al., 2013, Agami, 2014, Roy et al., 2016, Akram et al., 2017).

De maneira geral, os resultados demonstram que a salinidade provoca alterações e danos no metabolismo das plantas. No entanto, o uso do AsA possibilitou que estas alterações e danos fossem reduzidos. Quando as plantas pré-tratadas com AsA foram expostas a salinidade, houve aumento do LWP, fazendo com que as plantas fossem mais eficientes na WUE. Além disso, a concentração dos pigmentos fotossintéticos foram maiores, possibilitando que o FSI e FSII não fossem danificados, além da eficiência do sistema antioxidante de defesa, levando assim a redução da peroxidação lipídica e danos oxidativos, culminando com o melhor crescimento das plantas de Micro-Tom.

6. CONCLUSÕES

O pré-tratamento de sementes com AsA regula as respostas antioxidantes de defesa nas plantas de Micro-Tom expostas ao estresse salino. O pré-tratamento de sementes com AsA é uma técnica de manejo eficiente e econômica que pode ser usada para aliviar os efeitos deletérios e aumentar a tolerância das plantas de micro-tom em condições de estresse salino.

7. REFERÊNCIAS

Afzal F, Khurshid R, Ashraf M, Kazi AG (2014) Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Response to Pathogens and Wounding. **Oxidative Stress and Antioxidant Defense** 13:397-424.

Agami RA (2014) Applications of ascorbic acid or proline increase resistance to salt stress in barley seedlings. **Biologia Plantarum** 58:341-347.

Ahmed ESH, Baziad ES, Salih AM, Reem BAAS (2016) Alleviated Effect of Salinity Stress by Exogenous Application of Ascorbic Acid on the Antioxidant Catalase Enzymes and Inorganic Mineral Nutrient Elements Contents on Tomato Plant. **International Journal of Life Sciences** 4:467-490.

Akram MS, Ashraf M, Akram NA (2009) Effectiveness of potassium sulfate in mitigating salt-induced adverse effects on different physio-biochemical attributes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Flora** 204:471-483.

Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environmental** 24:1337-1344.

Alhasnawi AN, Radziah CMZ, Kadhimi AA, Isahak A, Mohamad A, Yusoff WMW (2016) Enhancement of antioxidant enzymes activities in rice callus by ascorbic acid under salinity stress. **Biologia Plantarum** 13:1-5.

Al-Omran AM, Al-Harbi AR, Wahb-Allah MA, Alwabel MA, Nadeem M, Eleter A (2012) Management of Irrigation water salinity in greenhouse tomato production under calcareous sandy soil and drip Irrigation. **Journal of Agricultural Science and Technology** 14:939-950.

Alvarenga MAR, Melo PCT, Shirahige FH (2013) Cultivares. In: Alvarenga, M.A.R. **Produção em campo, casa de vegetação e hidroponia**. 2ª Ed. Lavras: UFLA, p. 49-59.

Alves LR, Monteiro CC, Carvalho RF, Ribeiro PC, Tezotto T, Azevedo RA, Gratão PL (2017) Cadmium stress related to root-to-shoot communication depends on ethylene and auxin in tomato plants. **Environmental Experimental Botany** 134:102-115.

Alves RC, Medeiros AS, Nicolau MCM, Oliveira FA, Lima LW, Aroucha EMM, Gratão PL (2018a) Influence of partial root-zone saline irrigation management on tomato yield and fruit quality from a potted-plant study. **Hort Science** 53:1326-1331.

Alves RC, Medeiros AS, Nicolau MCM, Pizolato Neto A, Oliveira FA, Lima LW, Tezoto T, Gratão PL (2018b) The partial root-zone saline irrigation system and antioxidant responses in tomato plants. **Plant Physiology and Biochemistry** 127:366-379.

Anderson JV, Davis DG (2004) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. **Physiologia Plantarum** 120:421-433.

Asada K (2000) The Water-Water Cycle as Alternative Photon and Electron Sinks. **Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences** 355:1419-1431.

Athar HR, Khan A, Ashraf M (2008) Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. **Environmental Experimental Botany** 63:224-231.

Azevedo D, Neto AD, Prisco JT, Eneas-Filho J, Medeiros JVR, Gomes-Filho, E (2005) Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. **Journal of Plant Physiology** 162:1114-1122.

Azzedine F, Gherroucha H, Baka M (2011) Improvement of salt tolerance in durum wheat by ascorbic acid application. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry** 7:27-37.

Barus WA, Rauf A, Rosmayati, Hanum C (2015) Improvement of salt tolerance in some varieties of rice by ascorbic acid application. **International Journal of Science and Research** 4:2277-8616.

Beckers GJM, Conrath U (2007) Priming for stress resistance: from the lab to the field. **Current Opinion in Plant Biology** 10:425-431.

Billah M, Rohman MM, Hossain N, Shalim UM (2017) Exogenous ascorbic acid improved tolerance in maize (*Zea mays* L.) by increasing antioxidant activity under salinity stress. **African Journal of Agricultural Research** 12:1437-1446.

Boaretto LF, Carvalho G, Borgo L, Creste S, Landell MGA, Mazzafera P, Azevedo RA (2014) Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry** 74:165-75.

Bonomelli C, Celis V, Lombardi G, Mártiz J (2018) Salt Stress Effects on Avocado (*Persea americana* Mill.) Plants with and without Seaweed Extract (*Ascophyllum nodosum*) Application. **Agronomy** 8:1-13.

Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 71:248-254.

Carmo CAFS, Araújo WS, Bernardi ACC, Saldanha MFC (2000) **Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na embrapa solos**. Embrapa Solos, (Circular técnica 6), 46 p.

Carvalho RF, Monteiro CC, Caetano AC, Dourado MN, Gratão PL, Haddad CKB, Peres LEP, Azevedo RA (2013) Leaf senescence in tomato mutants as affected by irradiance and phytohormones. **Biologia Plantarum** 57:749-757.

Castañares JL, Bouzo CA (2017) Effect of priming on germination and initial growth of melon plants under salt stress. **Revista de Ciências Agrárias** 16:1-10.

Castellane PD, Araújo JAC (1995) Cultivo sem solo - Hidroponia. 4^a ed. Jaboticabal: FUNEP 43 p.

Caverzan A, Casassola A, Brammer SP (2016) Antioxidant responses of wheat plants under stress. Review Article. **Genetics and Molecular Biology** 39:1-6.

Chance B, Maehley AC (1955) Assay of catalase and peroxidase. **Methods Enzymology** 2:764-77.

Chaudhary A, Singh A, Sengar RS (2015) Antioxidant activity in rice under salinity stress: an overview. **Plant Archives** 15:7-13.

Cia MC, Guimarães ACR, Medici LO, Chabregas SM, Azevedo RA (2012) Antioxidant response to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology** 161:313-324.

Czarnocka C, Karpiński S (2018) Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. **Free Radical Biology and Medicine** 122:4-20.

Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Montagu MV, Inzé D, Breusegem FV (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences** 57:779-795.

Deuner S, Alves JD, Fries DD, Zanandrea I, Lima AA, Henrique PC, Goulart PFP (2008) Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Revista Ceres** 55:135-140.

Elhamid EMA, Sadak, MS, Tawfik MM (2014) Alleviation of Adverse Effects of Salt Stress in Wheat Cultivars by Foliar Treatment with Antioxidant 2—Changes in Some Biochemical Aspects, Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes and Amino Acid Contents. **Agricultural Sciences** 2014:1269-1280.

Falk J, Munné-Bosch S (2010) Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. **Journal of Experimental Botany** 61:1549-1566.

Farahat MM, Mazha AAM, Mahgoub MH, Zaghloul SM (2013) Salt tolerance in *Grevillea robusta* seedlings via foliar application of ascorbic acid. **Middle-East Journal of Scientific Research** 14:9-15.

Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** 35:1039-1042.

Florina F, Giancarla V, Cerasela P, Sofia P (2013) The effect of salt stress on chlorophyll content in several Romanian tomato varieties. **Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology** 17:363-367.

Foyer CH, Noctor G (2013) Redox signaling in plants. **Antioxidants & Redox Signaling** 18:2087-2090.

Gallie DR (2012) The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. **Journal of Experimental Botany** 64:433-443.

Gest N, Gautier H, Stevens R (2013) Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule. **Journal of Experimental Botany** 64:33-53.

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology** 59:309-314.

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

Gomes MAC, Pestana IA, Santa-Catarina C, Hauser-Davis RA, Suzuki MS (2017) Salinity effects on photosynthetic pigments, proline, biomass and nitric oxide in *Salvinia auriculata* Aubl. **Acta Limnologica Brasiliensia** 29:1-13.

Gratão PL, Monteiro CC, Tezotto T, Carvalho RF, Alves LR, Peters LJ, Azevedo RA (2015) Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. **BioMetals** 28:803-816.

Gratão PL, Monteiro CC, Carvalho RF, Tezotto T, Piotto FA, Peres LEP, Azevedo RA (2012) Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry** 56:79-96.

Gratão PL, Monteiro CC, Antunes AM, Peres LEP, Azevedo RA (2008) Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. **Annals of Applied Biology** 153:321-333.

Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, p. 481-494, 2005.

Guo B, Liu C, Li H, Yi K, Ding N, Li N, Fu Q (2016) Endogenous salicylic acid is required for promoting cadmium tolerance of Arabidopsis by modulating glutathione metabolisms. **Journal of Hazardous Materials** 316:77-86.

Hameed A, Gulzar S, Aziz I, Hussain T, Gul B, Khan MA (2015) Effects of salinity and ascorbic acid on growth, water status and antioxidant system in a perennial halophyte. **AoB Plants** 7:1-11.

Hameed A, Hussain T, Gulzar S, Aziz I, Gul B, Khan MA (2012) Salt tolerance of a cash crop halophyte Suaeda fruticosa: biochemical responses to salt and exogenous chemical treatments. **Acta Physiologiae Plantarum** 34:2331-2340.

Hasanuzzaman M, Nahar K, Fujita M, Ahmad P, Chandna R, Prasad MNV, Ozturk M (2013) “**Enhancing plant productivity under salt stress-relevance of poly-omics**,” in Salt Stress in Plants: Omics, Signaling and Responses, Ahmad, P, Azooz MM, Prasad MNV, Eds. 113-156.

Hippler FWR, Boaretto RM, Quaggio JA, Azevedo RA, Mattos Junior D (2015) Towards soil management with Zn and Mn: estimates of fertilisation efficacy of Citrus trees. **Annals of Applied Biology** 166:484-495.

Hussein MM, Alva AK (2014) Effects of zinc and ascorbic acid application on the growth and photosynthetic pigments of millet plants grown under different salinity. **Journal of Agricultural Science** 5:1253-1260.

Ighodaro OM, Akinloye OA (2017) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. In press : **Alexandria Journal Medicine**3:1-7.

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

Israr M, Sahi S, Datta R, Sarkar D (2006) Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. **Chemosphere** 65:591-598.

Jabeen N, Ahmad R (2012) Improvement in growth and leaf water relation parameters of sunflower and safflower plants with foliar application of nutrient solutions under salt stress. **Pakistan Journal of Botany** 44:1341-1345.

Jenks MA, Hasegawa, PM, Jain SM (2007) **Advances in Molecular Breeding Towards Drought and Salt Tolerant Crops**. Kosma DK., Enks MA. in: Eco-Physiological and Molecular-K. Genetic Determinants of Plant Cuticle Function in Drought and Salt Stress Tolerance. Capter 5:91-120.

Jisha KC, Vijayakumari K, Puthur JT (2013) Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. **Acta Physiologia Plantarum** 35:1381-1396.

Kafi M (2009) The effects of salinity and light on photosynthesis, respiration and chlorophyll fluorescence in salt tolerant and salt-sensitive wheat [*Triticum aestivum* L.] cultivars. **Journal of Agricultural Science and Technology** 11:535-547.

Kapoor D, Sharma R, Handa N, Kaur H, Rattan A, Yadav P, Gautam V, Kaur R, Bhardwaj R (2015) Redox Homeostasis in Plants under Abiotic Stress: role of electron carriers, energy metabolism mediators and proteinaceous thiols. **Frontiers Environmental Science** 3:1-13.

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

Kaur H, Gupta N (2018) Ameliorative Effect of Proline and Ascorbic Acid on Seed Germination and Vigour Parameters of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Under Salt Stress. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science** 7:3523-3532.

Kaya C, Akram NA, Ashraf M, Sonmez O (2017) Exogenous Application of Humic Acid Mitigates Salinity Stress in Maize (*Zea mays* L.) Plants by Improving some Key Physico-biochemical Attributes. **Cereal Research Communications** 46:1-12.

Khan TA, Mazid M, Mohammad F (2015) A review of ascorbic acid potentialities against oxidative stress induced in plants. **Journal of Agrobiology** 28:97-111.

Khanbabalo N, Hajizadeh HS, Behtash F (2018) Effects of salinity on taste quality and biochemical traits of four tomato varieties (*Solanum lycopersicum*) grown under hydroponic conditions. **Journal of Horticulture and Postharvest Research** 1:15-26.

Korkmaz A, Korkmaz Y, Demirkiran AR (2010) Enhancing chilling stress tolerance of pepper seedlings by exogenous application of 5-aminolevulinic acid. **Environmental Experimental Botany** 67:495-501.

Krifka S, Hiller KA, Spagnuolo G, Jewett A, Schmalz G, Schweikl H (2012) The influence of glutathione on redox regulation by antioxidant proteins and apoptosis in macrophages exposed to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). **Biomaterials** 33:5177-5186.

Krupa-Małkiewicz M, Beata BS, Ostojski D, Sędzik M, Pelc J (2015) Effect of ascorbic acid on morphological and biochemical parameters in tomato seedling exposure to salt stress. **Environmental Protection and Natural Resources** 26:21-25.

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids; pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology** 148:350-382.

Liu D, Pei Z, Naeem M, Ming D, Liu H, Khan F, Zhou WJ (2011) 5-Aminolevulinic acid activates antioxidative defence system and seedling growth in *Brassica napus* L. under water-deficit stress. **Journal of Agricultural and Crop Science** 197:284-295.

Liu J, Macarasin D, Wisniewski M, Sui Y, By S, Norelli J, HersHKovitz V (2013) Production of hydrogen peroxide and expression of ros-generating genes in peach flower petals in response to host and non-host fungal pathogens. **Plant Pathology** 62:820-828.

Liu SL, Yang RJ, Ma MD, Dan F, Zha Y, Jiang P, Wang MH (2015) Effects of exogenous NO on the growth, mineral nutrient content, antioxidant system, and ATPase activities of *Trifolium repens* L. plants under cadmium stress. **Acta Physiologiae Plantarum** 37:1-16.

Ma NL, Lah WAC, Kadir NA, Mustaqim M, Rahmat Z, Ahmad A, Lam SD, Ismail MR (2018) Susceptibility and tolerance of rice crop to salt threat: Physiological and metabolic inspections. **PLoS ONE** 13:1-17.

Maskri A, Al-Kharusi L, Al-Miqbali H (2010) Effects of salinity stress on growth of lettuce (*Lactuca sativa*) under closed-recycle nutrient film technique. **International Journal of Agriculture and Biology** 12:377-380.

Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. **Journal of experimental Botany** 51:659-668.

Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shaley G, Ashri A, Elkind Y, Levy A (1997) A new model system for tomato genetics. **Plant Journal** 12:1465-1472.

Memon SA, Wang LJ, Hou XL (2013) Effect of 5-aminolevulinic acid (ALA) on antioxidative enzymes, chlorophyll content, and photosynthesis of Pakchoi [*Brassica campestris* ssp. *Chinensis*] under salt stress. **Journal of Agricultural Science and Technology** 9:1333-1346.

Michalak A (2004) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Polish Journal of Environmental Studies** 15:523-530.

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

Munir N, Naz S, Aslam F, Shahzadi K, Javad S (2013) Effect of various levels of ascorbic acid pretreatment on alleviation of salt stress in salt sensitive sugarcane genotype SPF-213. **Journal of Agricultural Research** 51:267-276.

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

Nawaz F, Ashraf MY, Ahmad R, Waraich EA, Shabbir RN, Bukhari MA (2015) Supplemental selenium improves wheat grain yield and quality through alterations in biochemical processes under normal and water deficit conditions. **Food Chemistry** 175:350-357.

Niu L, Liao W (2016) Hydrogen Peroxide Signaling in Plant Development and Abiotic Responses: Crosstalk with Nitric Oxide and Calcium. **Frontiers Plant Science** 7:1-14.

Noctor G, Foyer CH (2016) Intracellular Redox Compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. **Plant Physiology** 171:1581-1592.

Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH (2014) The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. **Plant Physiology** 164:1636-1648.

Nogueirol RC, Monteiro FA, Gratão PL, Borgo L, Azevedo RA (2015) Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. **Environmental Monitoring and Assessment** 187:1-16.

Nunes MUC (2000) **Produção de mudas de hortaliças com o uso da plasticultura e do pó de coco**. Aracaju: Embrapa Tubuleiros Costeiros, 29 p. (Embrapa, circular técnica, 13).

Oliveira FDA, Medeiros JF, Alves RDC, Linhares PSF, Medeiros AM, Oliveira MK (2014) Interação entre salinidade da água de irrigação e adubação nitrogenada na cultura da berinjela. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental** 18:480-486.

Ouhaddach M, Elyacoubi H, Douaik A, Rochdi A (2018) Morpho-Physiological and Biochemical Responses to Salt Stress in Wheat (*Triticum aestivum* L.) at the Heading Stage. **Journal of Materials and Environmental Sciences** 9:1899-190.

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

Palop S, Ozdikicierler O, Kostekli M, Escrive M, Esteve MJ, Frigola A (2010) Ascorbic acid in tomatoes during refrigeration storage with absorbing sheet of ethylene. **International Conference Food and Innovation** 1-4.

Passaia G, Caverzan A, Fonini LS, Carvalho FEL, Silveira JAG, Margis-Pinheiro, M (2014) Chloroplastic and mitochondrial GPX genes play a critical role in rice development. **Biologia Plantarum** 58:375-378.

Passardi F, Penel C, Dunand C (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science** 9:534-540.

Paul S, Roychoudhury A (2016) Seed priming with spermine ameliorates salinity stress in the germinated seedlings of two rice cultivars differing in their level of salt tolerance. **Tropical Plant Research** 3:616-633.

Pompeu GB, Vilhena MB, Gratão PL, Carvalho RF, Rossi ML, Martinelli AP, Azevedo RA (2016) Absciscic acid-deficient sit tomato mutant responses to cadmium-induced stress. **Protoplasma** 254:771-783.

Pratt LH, Cordonnier-Pratt MM, Kelmenson PM, Lazarova GI, Kubota T, Alba RM (1997) The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicon* L.). **Plant Cell and Environment** 20:672-677.

Racchi ML (2013) Antioxidant Defenses in Plants with Attention to *Prunus* and *Citrus* spp. **A review Antioxidants** 2:340-369.

Rady MM, Mohamed GF (2018) Improving salt tolerance in *Triticum aestivum* (L.) plants irrigated with saline water by exogenously applied proline or potassium. **Advances in Plants & Agriculture Research** 8:193-199.

Rafique N, Raza SH, Qasim M, Iqbal N (2011) Pre-sowing application of ascorbic acid and salicylic acid to seed of pumpkin and seedling response to salt. **Pakistan Journal of Botany** 43:2677-2682.

Roy PR, UI-Arif MT, Akter T, Ray SR, Sayed MA (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** 10:148-154.

Saidi-Sar S, Abbaspour H, Afshari H, Yaghoobi SR (2013) Effects of ascorbic acid and gibberellin GA3 on alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum** 35:667-677.

Sayed E, Hamed EA, Baziad, Salih AM, Basaba, Reem AAS (2016) Alleviated effect of salinity stress by exogenous application of ascorbic acid on the antioxidant catalase enzymes and inorganic mineral nutrient elements contents on tomato plant. **International Journal Life and Science** 4:467-490.

Sayyad-Amin P, Jahansooz M, Azamborzouei A, Fatemehajili F (2016) Changes in photosynthetic pigments and chlorophyll-a fluorescence attributes of sweet-forage and grain sorghum cultivars under salt stress. **Journal of Biological Physics** 42:601-620.

Scholander PF, Hammel HT, Hemmingsen EA, Bradstreet ED (1965) Sap pressure in vascular plants. **Science** 148:339-346.

Shieber M, Chandel NS (2014) ROS Function in Redox Signaling and Review Oxidative. **Stress Current Biology** 24:453-462.

Shimizu N, Hosogi, Park PJ (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 Genetic Plant Pathology** 72:6-15.

Silva EM, Silveira JAG, Fernandes CRR, Dutra ATB, Aragão RM (2009) Acúmulo de íons e crescimento de pinhão-mansô sob diferentes níveis de salinidade. **Revista Ciência Agronômica** 40:240-246.

Silva PF, Lima CJGS, Barros AC, Silva EM, Duarte SN (2013) Sais fertilizantes e manejo da fertirrigação na produção de tomateiro cultivado em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 17:1173-1180.

Singh M, Singh A, Nehal N, Sharma N (2018) Effect of proline on germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) under salt stress. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** 7:2449-2452.

Soares AMS, Machado OLT (2007) Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Ciências Agrárias e Biológicas** 1:9-19.

Stevens MA, Rick CM (1986) Genetic and Breeding in: Atherton JG, Rudich J. eds. **The tomato crop: a scientific basis for improvement**. London: Chapman and Hall, p. 35-109.

Stirbet A, Govindjee (2011) On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology** 104:236-257.

Suhita D, Raghavendra AS, Kwak JM, Vavasseur A (2004) Cytoplasmic alkalization precedes ROS production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. **Plant Physiology** 134:1536-1545.

Tuna AL, Kaya C, Altunlu H, Ashraf M (2013) Mitigation effects of non-enzymatic antioxidants in maize (*Zea mays* L.) plants under salinity stress. **Australian Journal and Crop Science** 7:1181-1188.

Van-Heerden PDR, Strasser RJ, Kruger GHJ (2004) Reduction of dark chilling stress in N₂-fixing soybean by nitrate as indicated by chlorophyll a fluorescence kinetics. **Physiologia Plantarum** 121:239-249.

Vincent JM (1975) **Manual Practico de Rizobiologia**, 1 St Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.

White AJ, Critchley C (1999) Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. **Photosynthesis Research** 59:63-72.

Xing W, Wang J, Liu H, Zou D, Zhao H (2013) Influence of natural saline-alkalstress on chlorophyll content and chloroplast ultrastructure of two contrasting rice [*Oryza sativa* L. japonica] cultivars. **Australian Journal and Crop Science** 7:289-292.

Yadav P, Kumar S, Reddy KP, Yadav T, Murthy IYLN (2014) **Oxidative stress and antioxidant defense system in plants**. In: Kumar PA, Govil JN (Eds.), *Biotechnology* 2: 262-281.

Yang Y Guo Y (2018) Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. **New Phytologist** 217: 523-539.

Yasar F, Uzal O, Yasar O (2016) Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation amount of pea varieties (*pisumsativum* sp. *arvense* L.) under salt stress. **Agricultural Sciences** 5:37-42.

Younis ME, Hasaneen MNA, Kazamel AMS (2010) Exogenously applied ascorbic acid ameliorates detrimental effects of NaCl and mannitol stress in *Vicia faba* seedlings. **Protoplasma** 239:39-48.

Zhai CZ, Zhao L, Yin LJ, Chen M, Wang QY, Li LC, Xu ZS, Ma YZ (2013) Two wheat glutathione peroxidase genes whose products are located in chloroplasts improve salt and H₂O₂ tolerances in Arabidopsis. **PLoS ONE** 8: e73989.

Zhang P, Senge M, Dai Y (2017) Effect of salinity stress at different growth stages on tomato growth, yield and water use efficiency. **Journal Agricultural Science** 48:624-634.

Zhang P, Senge M, Dai Y (2016) Effects of salinity stress on growth, yield, fruit quality and water use efficiency of tomato under hydroponics system. **Reviews in Agricultural Science** 4:46-55.

Zhen A, Bie ZL, Huang Y, Liu ZX, Fan ML (2012) Effects of 5-aminolevulinic acid on the H₂O₂-content and antioxidative enzyme gene expression in NaCl-treated cucumber seedlings. **Biologia Plantarum** 56:566-570.

Zhou Y, Tang N, Huang, Zhao Y, Tang X, Wang K (2018) Effects of Salt Stress on Plant Growth, Antioxidant Capacity, Glandular Trichome Density, and Volatile Exudates of *Schizonepetatenui folia* Briq. **International Journal of Molecular Sciences** 19:1-15.

Zouari M, Ahmed CB, Elloumi N, Bellassoued K, Delmail D, Labrousse P, Abdallah FB, Rouina BB (2016b) Impact of proline application on cadmium accumulation, mineral nutrition and enzymatic antioxidant defense system of *Olea europaea* L. cv Chemlali exposed to cadmium stress. **Ecotoxicology Environmental Safety** 128:195-205.

Zouari M, Elloumi N, Ahmed CB, Delmail D, Rouina BB, Abdallah FB, Labrousse P (2016a) Exogenous proline enhances growth, mineral uptake, antioxidant defense and reduces cadmium-induced oxidative damage in young date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Ecological Engineering** 86:202-209.