

## ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA EM FOLHAS DE DOIS GENÓTIPOS DE SOJA SUBMETIDOS À CONDIÇÃO DE ALAGAMENTO EM SOLOS DE VÁRZEA

JOÃO VICTOR LEMOS DA SILVA<sup>1</sup>; KASSIA LUIZA TEIXEIRA COCCO<sup>2</sup>; ANA CLAUDIA BARNECHE DE OLIVEIRA<sup>3</sup>; SUZANA LEITZKE<sup>4</sup>; SIDNEI DEUNER<sup>5</sup>; LUCIANO DO AMARANTE<sup>6</sup>

<sup>1,4</sup>UFPel/Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel –

[joao.victor.lemos.dasilva97@gmail.com](mailto:joao.victor.lemos.dasilva97@gmail.com); [suzanaleitzke@outlook.com](mailto:suzanaleitzke@outlook.com)

<sup>2,5</sup>UFPel/Instituto de Biologia – [kassiacocco@hotmail.com](mailto:kassiacocco@hotmail.com); [sdeuner@yahoo.com.br](mailto:sdeuner@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Embrapa Clima Temperado – [ana.barneche@embrapa.br](mailto:ana.barneche@embrapa.br)

<sup>6</sup>UFPel/CCQFA – [lucianodoamarante@yahoo.com.br](mailto:lucianodoamarante@yahoo.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A soja é uma leguminosa originária da China e um dos produtos agrícolas de maior importância no mundo, sendo o Brasil um dos seus maiores produtores. No entanto, há regiões em que a produtividade é afetada em função do estresse por encharcamento do solo, acarretando na deficiência de oxigênio ( $O_2$ ) para as raízes das plantas. Esta falta de  $O_2$  gera o desvio do metabolismo aeróbico para a via anaeróbia, o que diminui o saldo de ATP produzido por moléculas de glicose devido ao bloqueio da fosforilação oxidativa. Este processo resulta em um baixo rendimento energético, além disso, alterações no fluxo de elétrons da cadeia de transporte mitocondrial e cloroplastídica levam à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem ocasionar vários danos ao metabolismo celular (BORELLA, 2015).

A planta como forma de defesa a estas EROs, realiza a síntese de um complexo enzimático formado pela superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), entre outras. Sendo a SOD, a principal enzima que atua sobre o  $O_2\cdot^-$ , formando  $H_2O_2$  e  $O_2$ , o  $H_2O_2$  é então convertido a  $O_2$  e  $H_2O$  pela ação da CAT ou em  $H_2O$  pela atividade da APX (TUTEJA, 2010).

A variabilidade genética da soja, faz com que existam formas de tolerar o excesso de umidade em solos de várzea (PIRES et al., 2002), consolidando a utilização da cultura nestas áreas. Assim, é necessário o entendimento dos mecanismos de tolerância ao estresse por alagamento com o objetivo de se caracterizar e selecionar genótipos tolerantes à deficiência de oxigênio, contribuindo aos programas de melhoramento genético para esta característica.

### 2. METODOLOGIA

O experimento foi conduzido em área experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Clima Temperado, localizada no município do Capão do Leão/RS. O experimento foi conduzido a campo, em condições naturais de luz e temperatura, utilizando-se de duas cultivares comerciais de soja (*Glycine max* L. Merril), BRS 246 RR e NA 5909 RG.

Os tratamentos consistiram em estresse, caracterizado pela indução de hipoxia, a partir do estádio fenológico V6, pela aplicação e manutenção de lâmina de água, pelos períodos de um, três e cinco dias e, posteriormente, drenagem, caracterizando o início do período de recuperação, sendo avaliada aos três e sete dias e controle, consistindo em plantas cultivadas em solo com umidade mantida na capacidade de campo. Foram realizadas coletas de folhas de quatro repetições para cada tratamento, sendo mantidas congeladas (-80°C) até o momento das análises.

## 2.1 Extração e Dosagem de Enzimas Antioxidantes

O sistema enzimático antioxidante foi avaliado através da atividade específica das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). As amostras de tecido foliar foram maceradas com N<sub>2</sub> líquido e polivinilpolipirolidona (10% peso fresco), com tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 13000g, por 20 min, a 4°C e o sobrenadante coletado para as dosagens enzimáticas. A SOD foi avaliada conforme metodologia proposta por Giannopolitis e Ries (1977), medida pela quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT a 560 nm, nas condições de ensaio. A APX foi determinada segundo Nakano e Asada (1981), pela medição da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. A CAT foi determinada conforme descrito por AZEVEDO et al. (1998) pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>a 240 nm.

## 2.2 Peróxido de Hidrogênio e Peroxidação Lipídica

As amostras de tecido foliar foram maceradas em tampão de extração contendo ácido tricloroacético 0,1%. O homogenato foi centrifugado a 12000g, durante 20 min, sendo o sobrenadante utilizado para as determinações do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) segundo VELIKOVA et al. (2000) e peroxidação lipídica, medida pelo teor de malondialdeído (MDA) conforme descrito por CAKMAK e HORST (1991).

## 2.3 Análise Estatística

Cada tratamento consistiu de quatro repetições, cada uma constituída por uma parcela de campo de 2,0 x 5,0 m, com espaçamento de 0,4m entrelinhas, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 5 (tratamentos x períodos de exposição). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativos pelo Teste F, foram comparados pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

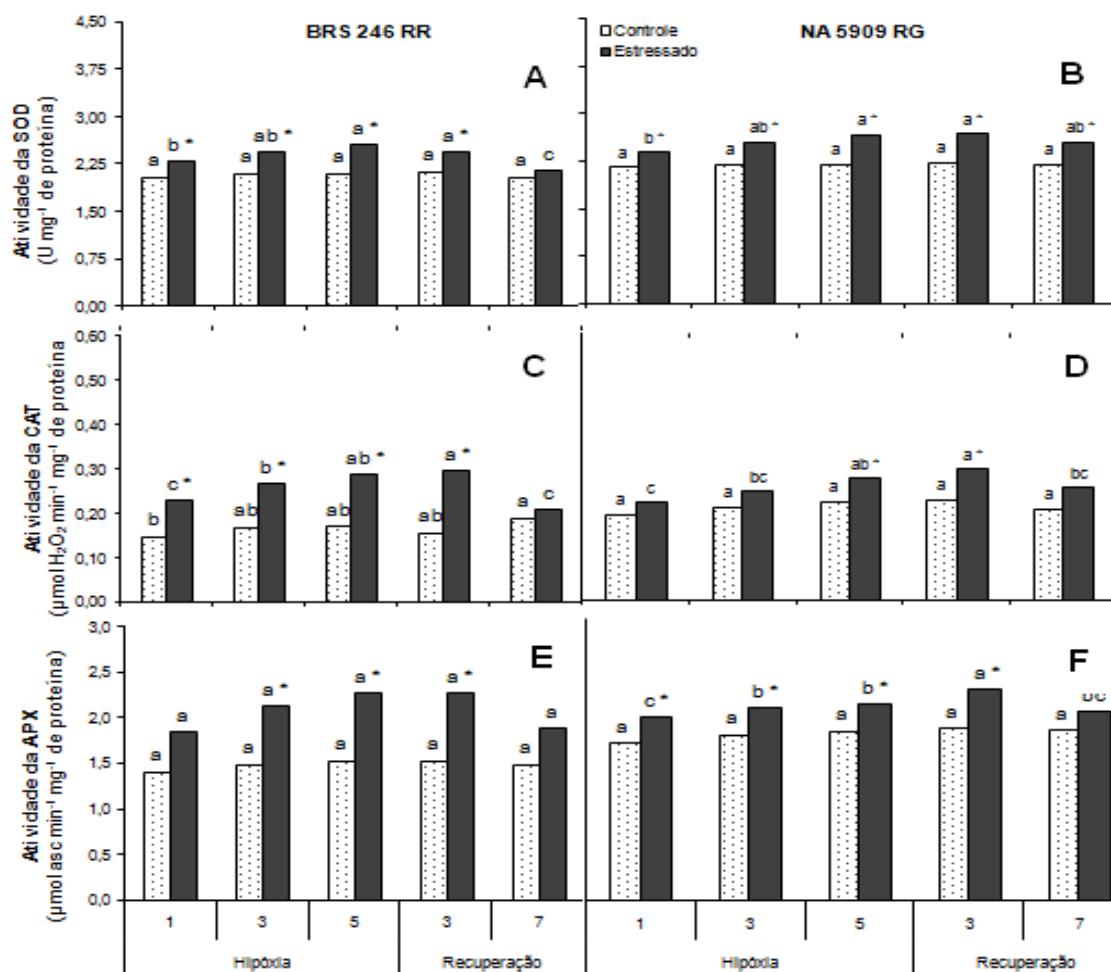
A atividade da enzima SOD aumentou significativamente com a condição de hipóxia desde o primeiro período de avaliação, apresentando maior atividade ao quinto dia de estresse e mantendo-se atividade equivalente no terceiro dia de recuperação em ambos os genótipos. No entanto, no sétimo dia de recuperação a atividade diminuiu aos níveis do controle na cultivar BRS 246 RR e manteve-se superior ao controle em NA 5909 RG (Figura 1.A e 1.B).

A atividade da CAT na cultivar BRS 246 RR (Figura 1.C) mostrou-se muito responsiva à condição de hipóxia, aumentando significativamente em relação ao controle desde o primeiro dia de hipóxia e elevando-se até o terceiro dia de recuperação, onde atingiu o maior valor de atividade. Ao sétimo dia de recuperação houve uma redução expressiva, alcançando valores de atividade próximos ao controle. Na cultivar NA 5909 RG (Figura 1.D) foi observado um aumento significativo em relação ao controle apenas no quinto dia de hipóxia, mantendo uma atividade equivalente ao terceiro dia de recuperação, restabelecendo-se aos níveis do controle no sétimo dia de recuperação.

A atividade da APX foi aumentou significativamente com o tratamento de hipóxia na cultivar NA 5909 RG (Figura 1.F) desde a primeira avaliação, elevando-se gradualmente até o terceiro período de recuperação, onde atingiu atividade máxima. Para a cultivar BRS 246 RR (Figura 1.E), esse aumento foi observado no terceiro dia de hipóxia porém maior que em NA 5909 RG,

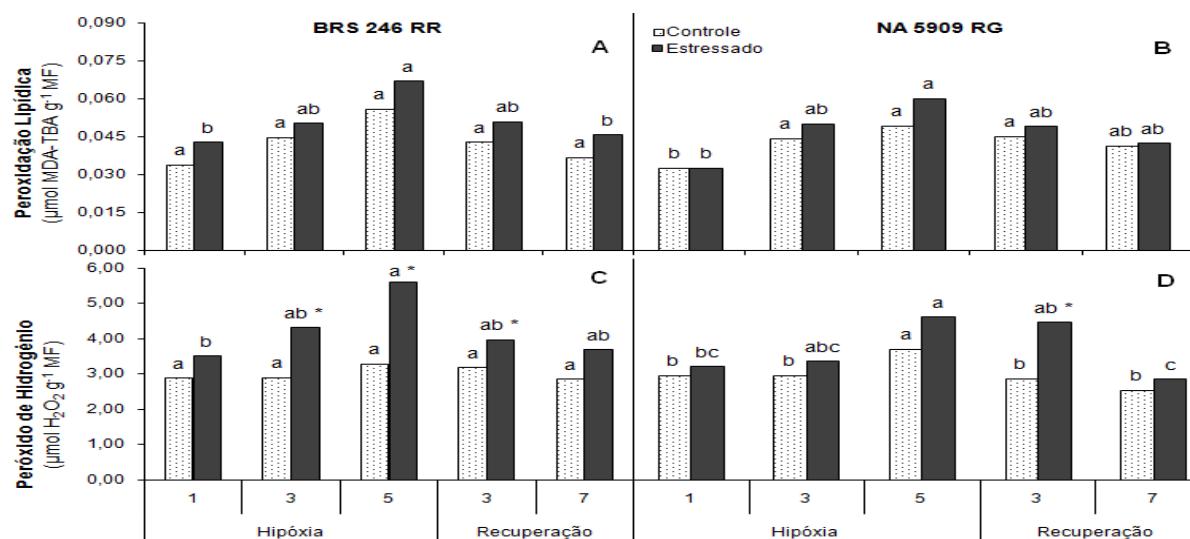
mantendo-se estável até o terceiro dia de recuperação. Ao sétimo dia de recuperação a atividade da APX decresceu aos níveis do controle em ambos os genótipos.

O conteúdo de peróxido de hidrogênio, aumentou significativamente com o período de hipóxia no genótipo BRS 246 RR (Figura 2.C), decrescendo durante a recuperação e atingindo as concentrações equivalentes ao controle apenas no sétimo dia de recuperação. Para o genótipo NA 5909 RG, houve um aumento significativo da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apenas no terceiro dia de recuperação, restabelecendo-se aos níveis do controle no sétimo dia de recuperação.



**Figura 1.** Atividade específica da enzima superóxido dismutase (SOD),catalase (CAT) e ascorbatoperoxidase (APX) em folhas de duas cultivares de soja, BRS 246 RR e NA 5909 RG, submetidas a condições de hipóxia e recuperação. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), entre os períodos avaliados para os tratamentos de estresse e controle, separadamente. Asterisco (\*) indica diferenças significativas, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), entre controle e tratamento de estresse, para cada período avaliado.

A peroxidação lipídica aumentou significativamente no quinto dia de hipóxia em ambos os genótipos, equivalendo-se, no terceiro dia de recuperação, aos níveis do primeiro dia de hipóxia. Apesar das variações observadas em relação aos períodos de hipóxia e de recuperação, os teores de MDA observados não diferiram do controle, nos dois genótipos, indicando que a peroxidação lipídica mensurada teve outras causas além do estresse por deficiência de oxigênio (Figura 2.A e 2.B).



**Figura 2.** Conteúdo de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica em folhas de duas cultivares de soja, BRS 246 RR e NA 5909 RG, submetidas a condições de hipóxia e recuperação. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), entre os períodos avaliados para os tratamentos de estresse e controle, separadamente. Asterisco (\*) indica diferenças significativas, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), entre controle e tratamento de estresse, para cada período avaliado.

#### 4. CONCLUSÕES

O estresse oxidativo durante o período de hipóxia e de recuperação é contornado pela atividade das enzimas antioxidantes nos períodos avaliados, em ambos os genótipos de soja, sendo mais responsivas na cultivar BRS 246 RR.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE,C. A.O papel do peróxido de hidrogênio na tolerância de soja (*Glycinemax*) ao alagamento. Lavras: UFLA, 2013
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation in leaves and roots of wild type and a catalasedeficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum*, v. 104, p.280-292. 1998.
- BORELLA, Junior. Adaptações metabólicas de genótipos de soja em resposta à deficiência de oxigênio e envolvimento do nitrato. 2015. 100f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.
- CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxidedismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, v. 83, p. 463-468. 1991.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, v.59, p.309-314. 1977.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, v.22, p.867-880. 1981.
- VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Science*, v. 151, p. 59-66.2000.