

ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE E TEORES DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM FOLHAS DE PLANTAS DE SOJA SUBMETIDAS AO ALAGAMENTO EM DIFERENTES ESTÁDIOS FENOLÓGICOS

DARWIN POMAGUALLI¹, ANA CLAUDIA BARNECHE DE OLIVIERA²,
ANGELITA CELENTE¹, NATALIA GARCIA¹, FABIANE KETKLE DE OLIVEIRA¹,
LUCIANO DO AMARANTE¹

¹Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Plantas – pomagualli@yahoo.es

²Embrapa Clima Temperado

E-mail do Orientador – lucianoamarante@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Um dos fatores ambientais que gera dificuldades na produção agrícola e florestal nas áreas cultivadas do planeta é o alagamento (Jackson and Colmer, 2005; Sairam et al., 2009). Os solos inundados têm o oxigênio disponível reduzido para uma produção eficiente de ATP, através da fosforilação oxidativa em plantas (Coutinho et al., 2018). Assim, as mitocôndrias tornam-se os principais produtores de espécies reativas de oxigênio (ROS). No entanto, as plantas desenvolveram mecanismos antioxidantes para lidar com os efeitos nocivos da ROS e manter o equilíbrio redox celular, auxiliado por enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e antioxidantes não-enzimáticos como o ácido ascórbico, carotenóides e fenóis (Demidchik, 2015).

A soja [*Glycine max* (L.) Merril] é uma das culturas oleaginosas mais importantes do mundo. No entanto, seu rendimento pode ser afetado pelo estresse abiótico, como o alagamento, resultante das mudanças climáticas, devido ao aumento das precipitações, aliado ao cultivo da espécie em regiões de baixa drads. Neste contexto, a sobrevivência das plantas expostas ao estresse depende da sua capacidade em perceber as alterações ambientais e desencadear respostas de defesa. Neste trabalho, descrevemos o fenômeno através do registro da informação sobre um estresse que é retido em um estágio de desenvolvimento da planta (HILKER et al., 2016; LÄMKE and BÄURLE, 2017; VRIET et al., 2015), e resulta em uma resposta modificada quando o estresse é recorrente, no caso o estresse por alagamento do sistema radicular.

2. METODOLOGIA

Sementes de soja, genótipo PEL BR10-6042, foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* estirpe SEMIA 5079 (BIOAGRO) e semadas em caixas de 1x1,2x1m (36 plantas por caixa) contendo solo (classificado como Planossolo Hidromórfico Eutrófico típico), sob condições de luz natural (fotoperíodo de 16 h) e temperatura (18-39°C) e irrigação de forma a manter o solo na capacidade de campo.

Quando as plantas atingiram o estágio V3 foi iniciado o tratamento com alagamento, o qual foi repetido no estágio R2 em um grupo de plantas (V3/R2) e em outro grupo foi aplicado apenas no estágio R2 (FEHR, W. R., 1971) por meio do fechamento do dreno de escoamento das caixas, mantendo-se uma lâmina d'água de 3 cm acima do substrato.

Em cada estágio, as plantas foram alagadas por cinco dias, e após esse período, realizou-se a drenagem das caixas (retirando-se a tampa do dreno das caixas) iniciando-se então tratamento de recuperação. Plantas mantidas em solo

sem alagamento foram usadas como controle. Nos tempos de dois e cinco dias de alagamento e de recuperação foram realizadas coletas de amostras (0,250g) de folhas (terceira folha trifoliada completamente expandida) e armazenadas em ultra freezer (-80°C) para análises da enzima Superóxido dismutase (SOD) e teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Os extratos enzimáticos para dosagem de atividade da SOD, foi obtido por meio da maceração de amostras (0,250g) em almofariz com N_2 líquido, contendo polivinilpolipirrolidona 5% (PVPP), homogeneizado em 1,5 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, contendo 0,1 mM de EDTA e 20 mM de ácido ascórbico. Após centrifugação a $12.000 \times g$ por 20 min a 4°C , o sobrenadante foi coletado para mensurar a atividade enzimática.

A atividade da superóxido dismutase (SOD - EC 1.15.1.1) foi determinada conforme descrito por GIANNOPOLITIS AND RIES. (1977). Uma unidade de atividade da SOD foi definida como a quantidade de enzima que produz uma inibição de 50% da redução fotoquímica do NBT.

O conteúdo de H_2O_2 foram determinados de acordo com VELIKOVA ET AL., (2002). O conteúdo de H_2O_2 foi determinado por meio de uma curva padrão preparada com concentrações de $0-100 \mu\text{mol mL}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio.

O delineamento experimental foi completamente casualizado em arranjo fatorial. Os dados foram submetidos à ANOVA e nos casos significativos pelo teste F, as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Realizadas com Statistix 10 (Analytical Software. FL, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados parciais de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e teores de peróxido de hidrogênio em folhas de plantas de soja submetidas ao alagamento do sistema radicular e posterior recuperação, em diferentes estádios de desenvolvimento, são mostrados nas figuras 1 e 2, respectivamente.

As folhas de plantas de soja alagadas nos estádios V3 e R2 apresentaram menor atividade de superóxido dismutase (SOD), em relação às plantas que foram submetidas ao alagamento apenas no estágio R2. A mesma resposta foi observada durante os períodos de pós-hipóxia (recuperação) avaliados, aumentando no entanto com o aumento do tempo de recuperação, para ambos os grupos de plantas, V3 e V3R2, o que sugere um efeito protetor à geração de ROS (Fig. 1).

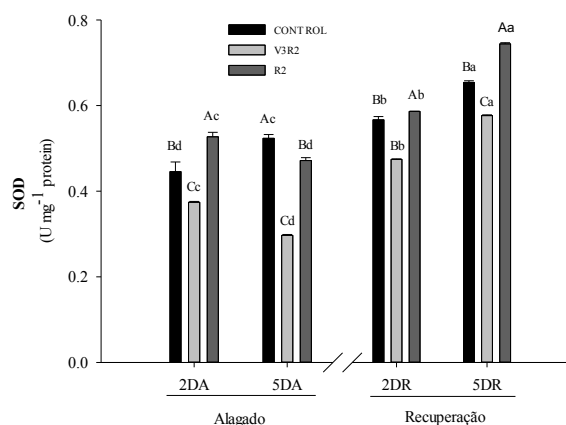


Fig.1 – Atividade da enzima antioxidante Superóxido dismutase (SOD) em folhas de plantas de soja, submetidas ao alagamento e posterior recuperação, nos estádios de desenvolvimento V3R2 e R2. As médias com a mesma letras maiúsculas e minúsculas não existe diferença significativa no teste de Tukey ($p > 0,05$). Os valores representam a média \pm SE ($n = 3$). Dias Alagado–DA. Dias de Recuperação DR.

O teor de H_2O_2 nas folhas (Fig. 2) durante o período de alagamento de dois dias, foi superior ao controle em plantas estressadas em estágio de desenvolvimento (V3R2), aos cinco dias de alagamento teve um decréscimo aos níveis do controle, nesse tempo de tratamento, em plantas alagadas apenas no estágio R2, os teores aumentaram significativamente. Já nas plantas sob recuperação, os teores de H_2O_2 aumentaram drasticamente em relação ao controle aos dois dias de avaliação, restabelecendo-se aos níveis do controle aos cinco dias de recuperação, o que parece estar de acordo com as respostas de atividade de SOD determinadas nesses períodos (Fig. 1).

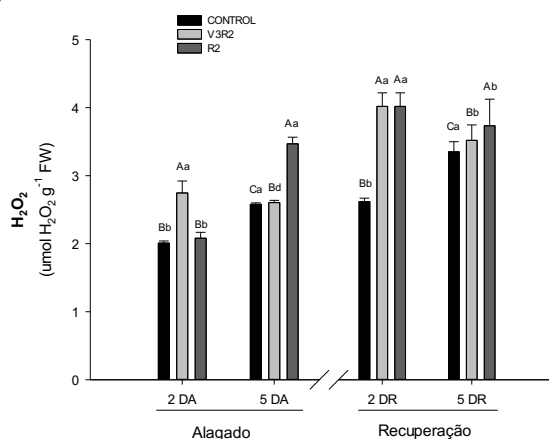


Fig. 2 Teores de peróxido de hidrogênio em folhas de plantas de soja, submetidas ao alagamento e posterior recuperação, nos estádios de desenvolvimento V3R2 e R2. As médias com a mesma letras maiúsculas e minúsculas não existe diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,05$). Os valores representam a média \pm SE ($n = 3$). Dias Alagado –DA Dias de Recuperação DR

Em geral, o teor de peróxido aumentou em folhas de plantas inundadas em V3R2 e R2 em comparação com as plantas de controle. A transição da condição alagamento/recuperação, aumenta a produção de ROS em plantas (WEI et al., 2013; ZHANG et al., 2019). A SOD constitui a primeira linha de defesa contra a ROS, que desempenha um papel crucial na célula, estando presente em todos os compartimentos subcelulares, na defesa contra o estresse oxidativo por meio da modulação direta das quantidades de O_2 e H_2O_2 (GILL and TUTEJA, 2010; ZHANG et al., 2019). Em plantas de soja submetidas à inundação, o aumento de atividade da SOD sugere uma leve indução no sistema antioxidante da folha e a atividade da SOD foi maior no estágio R2 com aumento expressivo durante a hipóxia e recuperação, o aumento da concentração de enzimas antioxidantes na planta sob hipóxia é um parâmetro de tolerância ao estresse por inundação (JIMÉNEZ et al., 2012). Da mesma forma, o aumento de atividade da SOD ocorre em outras culturas, como milho, o que denota maior capacidade desses genótipos para evitar danos oxidativos e, portanto, melhor capacidade de tolerar o estresse (ANJUM et al., 2017; BOARETTO et al., 2014). Por outro lado, a menor atividade da SOD em plantas avaliadas no estágio R2 e previamente alagadas no estágio V3 sugere um menor estresse oxidativo e possivelmente o desencadeamento de mecanismos adaptativos e protetores ao estresse oxidativo promovido pela aclimação desse grupo de plantas.

4. CONCLUSÕES

A atividade da enzima superóxido dismutase em folhas de plantas de soja submetidas ao estresse por alagamento no estágio R2, responde diferenciadamente em plantas previamente submetidas ao estresse (estádio V3R2), sugerindo o desenvolvimento de mecanismos protetores ao estresse

hipóxico (alagamento) e pós-hipóxico (recuperação) induzidos pelo primeiro período de estresse.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANJUM, S.A., ASHRAF, U., TANVEER, M., KHAN, I., HUSSAIN, S., SHAHZAD, B., ZOHAIB, A., ABBAS, F., SALEEM, M.F., ALI, I., WANG, L.C., 2017. Drought Induced Changes in Growth, Osmolyte Accumulation and Antioxidant Metabolism of Three Maize Hybrids. *Frontiers in Plant Science* 08. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00069>
- BOARETTO, L.F., CARVALHO, G., BORGIO, L., CRESTE, S., LANDELL, M.G.A., MAZZAFERA, P., AZEVEDO, R.A., 2014. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.11.016>
- COUTINHO, I.D., HENNING, L.M.M., DÖPP, S.A., NEPOMUCENO, A., MORAES, L.A.C., MARCOLINO-GOMES, J., RICHTER, C., SCHWALBE, H., COLNAGO, L.A., 2018. Flooded soybean metabolomic analysis reveals important primary and secondary metabolites involved in the hypoxia stress response and tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 153, 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.018>
- DEMIDCHIK, V., 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
- GILL, S.S., TUTEJA, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- HILKER, M., SCHWACHTJE, J., BAIER, M., BALAZADEH, S., BÄURLE, I., GEISELHARDT, S., HINCHA, D.K., KUNZE, R., MUELLER-ROEBER, B., RILLIG, M.C., ROLFF, J., ROMEIS, T., SCHMÜLLING, T., STEPPUHN, A., VAN DONGEN, J., WHITCOMB, S.J., WURST, S., ZUTHER, E., KOPKA, J., 2016. Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biological Reviews* 91, 1118–1133. <https://doi.org/10.1111/brv.12215>
- JIMÉNEZ, J. DE LA C., MORENO, L.P., MAGNITSKIY, S., 2012. Respuesta de las plantas a estrés por inundación. *REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS* Vol. 6, 96–109.
- LÄMKE, J., BÄURLE, I., 2017. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1263-6>
- VRIET, C., HENNIG, L., LALOI, C., 2015. Stress-induced chromatin changes in plants: of memories, metabolites and crop improvement. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72, 1261–1273. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1792-z>
- WEI, W., LI, D., WANG, L., DING, X., ZHANG, Y., GAO, Y., ZHANG, X., 2013. Morpho-anatomical and physiological responses to waterlogging of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Plant Science* 208, 102–111. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2013.03.014>
- ZHANG, J., YIN, D.J., FAN, S.X., LI, S.G., DONG, L., 2019. Modulation of Morphological and Several Physiological Parameters in Sedum under Waterlogging and Subsequent Drainage. *Russian Journal of Plant Physiology* 66, 290–298. <https://doi.org/10.1134/s1021443719020183>