

PLANTAS DE SOJA CULTIVADAS SOB ELEVADO CO₂ ALTERAM O METABOLISMO ANTIOXIDANTE EM FUNÇÃO DA COINOCULAÇÃO

ANDREI NUNES RODRIGUES¹; ADRIANO UDICH BESTER²; DOUGLAS ANTÔNIO POSSO³; EDUARDO PEREIRA SHIMOIA⁴; LUCIANO DO AMARANTE⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – andreinunes6700@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - adriano.udich.bester@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - douglasposso@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – eduardopshimoia@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – lucianodoamarante@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O aumento substancial da concentração de CO₂ na atmosfera vem impulsionando diversas pesquisas relacionadas aos efeitos desse gás para a vida na terra. Estimativas indicam que os níveis atuais de CO₂ (419 µmol mol⁻¹) dobrem até o final deste século. Concomitante a isso, estudos mostram um substancial aumento das áreas de alagamento em todo o planeta, ocasionadas principalmente por precipitações irregulares. Estima-se que 17 milhões de Km² da terra estejam sujeitos a eventos de alagamento. O Brasil é o maior produtor mundial de soja e o grande sucesso dessa produção está diretamente atrelado à inoculação da cultura com bactérias diazotróficas (*Bradyrhizobium*). No Brasil, o estado do Rio Grande do Sul é o quarto maior produtor de soja do país, onde grande parte da produção de soja é oriunda de aéreas em rotação com a cultura do arroz irrigado, cultivado em regiões sujeitas a alagamentos recorrentes. A coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* e/ou *Rhizophagos intraradices*, melhora o sistema antioxidante das plantas (Fukami et al., 2018). O *Azospirillum brasilense* tem como característica a promoção do crescimento da planta pela interação com a produção de fitormônios (Fukami et al., 2018). O *Rhizophagos intraradices*, fungo micorrízico arbuscular, é responsável por aumentar o desempenho de plantas devido aumentos na absorção de nutrientes, principalmente fósforo (Musyoka et al., 2020). Essas interações microbiológicas, ocorrem por meio de trocas, as plantas fornecem açúcares para os microrganismos e esses, nutrientes e outros metabólitos. Com isso, essas interações podem auxiliar as plantas a tolerar e superar períodos de estresse (Shimoia et al., 2023). A exposição de plantas de soja ao alagamento leva ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) resultando em estresse oxidativo, principalmente durante o período de drenagem do solo (reoxigenação), o que pode ser controlado ou atenuado por mecanismos antioxidantes, como a ativação de enzimas que controlam os níveis de EROs (Da-Silva; do Amarante, 2020).

Assim, este estudo teve por objetivo avaliar a resposta antioxidante (pela atividade da enzima catalase) e estresse oxidativo (pela avaliação dos teores de malondialdeído) em plantas de soja coinoculadas quando estas são cultivadas em ambientes de elevado CO₂ e passam por períodos de alagamento.

2. METODOLOGIA

Sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], cultivar PEL BRS 15-7060, sensível ao alagamento, foram inoculadas e coinoculadas com os seguintes tratamentos: 1) *Bradyrhizobium japonicum* (Brad; estirpes SEMIA 5079 e 5080, com 8x10⁹ UFC/g) (IB); 2) Brad + *Azospirillum brasilense* (Azos; cepas Ab-v5 e Ab-v6 com 2 x 10⁹ UFC/mL) (CA), 3) Brad + *Rhizophagos intraradices* (Rhizo) na concentração de 1,35

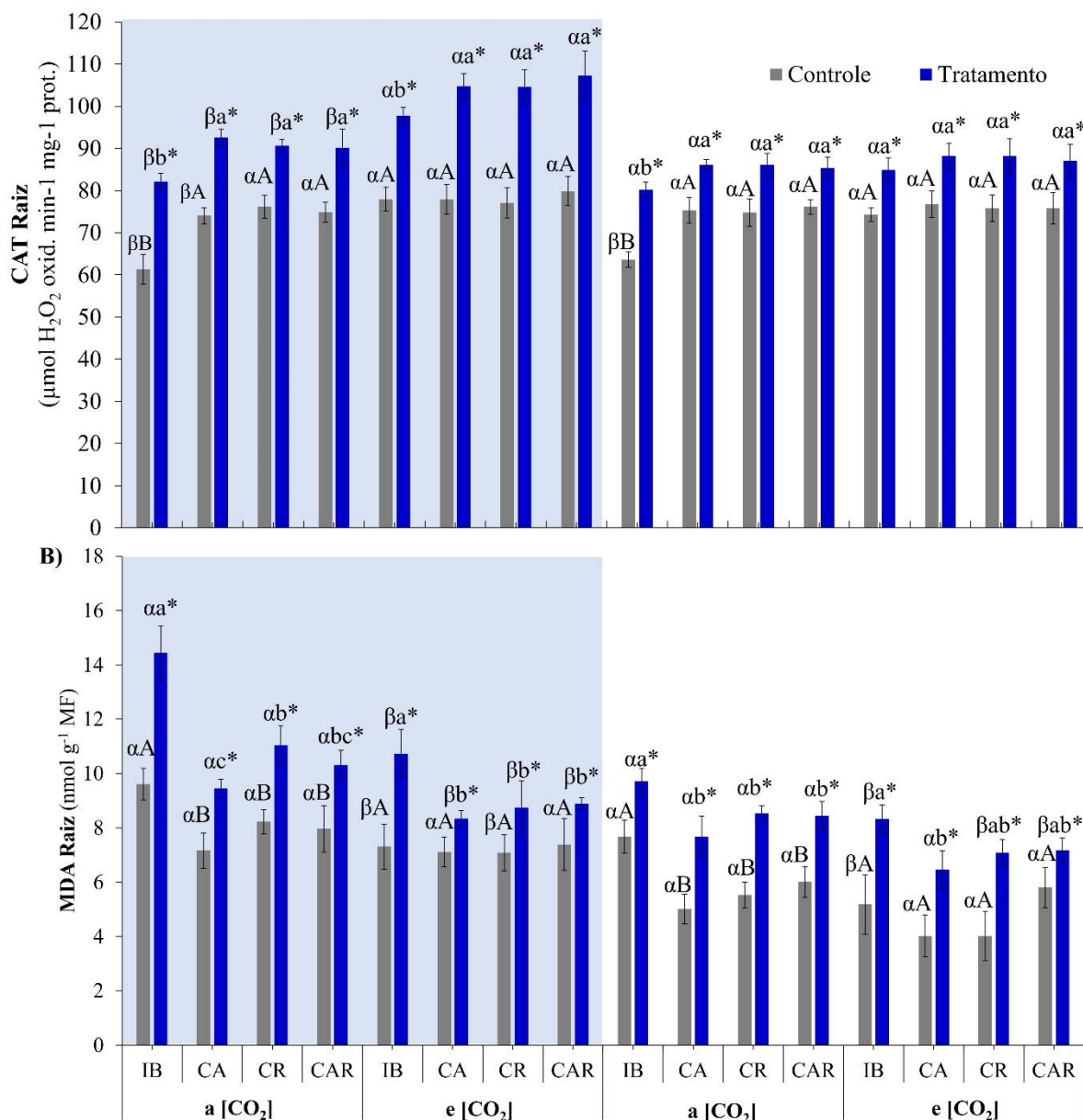
g/Kg de semente com garantia de 20.800 propágulos por grama de produto (CR) e 4) Combinação do simbiote Brad e coinoculação com os dois associativos: Azos e Rhizo (CAR). Utilizou-se como substrato um solo típico de regiões de várzea, esterilizado em autoclave (127°C; 1,5 ATM; 1h e 30 min) e corrigido para atender a demanda nutricional de altas produtividades da cultura da soja, conforme Manual de Adubação e Calagem. A germinação e cultivo ocorreu em vasos com volume de um litro contendo planossolo háplico. Os vasos foram dispostos em duas OTC (câmara de topo aberto) diferenciadas por suas concentrações de CO₂, 400 ppm ([CO₂] atmosférico; a[CO₂]) e 750 ppm ([CO₂] elevado; e[CO₂]). Quando as plantas atingiram o estágio fenológico V5, foram alagadas colocando os vasos dentro de recipientes sem furos e preenchidos com água, mantendo-se uma lâmina d'água de aproximadamente 2cm sobre o substrato. Aos sete dias de alagamento e quatro dias de reoxigenação foram avaliados a atividade da enzima antioxidante Catalase (CAT; EC1.11.1.6) e peroxidação de lipídeos em raízes. A atividade da enzima CAT, foi determinada conforme metodologia proposta por Giannopolitis e Ries (1977). A peroxidação de lipídeos foi determinada conforme metodologia proposta por Cakmak e Horst (1991) pela quantificação dos teores de MDA (malondialdeído). O experimento foi conduzido em esquema trifatorial: condição hídrica, tratamento microbiológico e níveis de CO₂ atmosférico, em delineamento experimental de blocos ao acaso com quatro repetições. A unidade experimental foi constituída de um vaso contendo três plantas. Os dados foram analisados por ANOVA e nos casos de interação significativa entre os fatores, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de probabilidade de 0,5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software RBio e as figuras confeccionadas por meio do programa Excel 365.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Plantas cultivadas em CO₂ ambiente quando submetidas ao alagamento, aumentaram em 24% a atividade da CAT e naquelas cultivadas em alto CO₂, o aumento foi de 32% (Figura 1A). Se compararmos plantas IB versos plantas CA, CR e CAR em condições de alagamento a diferença foi de 11% no a[CO₂] e 55% em e[CO₂]. No período de drenagem, as plantas drenadas apresentaram atividade de CAT 16% maior quando cultivadas em a[CO₂] e 15% mais elevada quando em e[CO₂] em relação aos seus controles. Observamos também plantas IB drenadas diferiram de CA, CR e CAR drenadas, apresentando uma atividade de CAT, 7% menor quando cultivadas em ambiente de a[CO₂] e 3% menor quando foram cultivadas em e[CO₂]. A peroxidação de lipídeos em raízes, aumentou durante o período de alagamento (Figura 1B). As plantas alagadas cultivadas em a[CO₂] aumentaram em 37% a concentração de MDA, enquanto cultivadas em e[CO₂] elevaram em 27%. Quando submetemos as plantas ao alagamento, a diferença média entre IB para as plantas CA, CR, CAR foi de 28% quando cultivadas no CO₂ ambiente e 11% elevado CO₂. No período de drenagem, plantas cultivadas em a[CO₂] aumentaram em 42% o MDA e plantas cultivadas em e[CO₂] aumentaram em 53% em relação aos seus respectivos controles. As plantas IB em processo de drenagem cultivadas em a[CO₂] apresentaram 15% mais MDA que drenadas de CA, CR, CAR e 17% quando avaliamos essa diferença em plantas crescidas em e[CO₂].

Figura 1: Atividade da Catalase (CAT) (A) e teores de malondialdeído (MDA) (B) em raízes de de soja cultivadas em associação com Bradyrhizobium e em combinação com Azospirillum e/ou Rhizophagus sob dois níveis de CO₂ atmosférico (400 e 750 µmol mol⁻¹) submetidas à condição de alagamento por sete dias e drenagem por quatro dias. Valores representam a média ± DP, n=4. Asteriscos indicam

diferença entre plantas controles ou alagadas/drenadas (teste t; $P < 0,05$), letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos em condições de controle, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos para a condição de alagamento/drenagem (Tukey, $P < 0,05$) e letras gregas indicam diferença entre o tratamento em a[CO₂] ou e[CO₂] (teste t; $P < 0,05$). IB- Inoculação *Bradyrhizobium*; CA- coinoculação *Azospirillum brasilense* + *Bradyrhizobium*; CR – coinoculação *Rhizophagus intraradices* + *Bradyrhizobium*; CAR - inoculação tripla *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense* + *Rhizophagus intraradices*.



O e[CO₂] atuou melhorando a performance do sistema antioxidante enzimático, mensurado aqui pela atividade da CAT, uma das principais enzimas que atua degradando o H₂O₂, evitando assim a geração de espécies reativas de oxigênio, assim como em outros casos (Gong et al., 2023). Efeitos mitigadores do estresse oxidativo também foram percebidos em plantas coinoculadas (CA, CR, CAR), provando que a coinoculação constitui uma ferramenta importante contra a elevação dos níveis de H₂O₂ e MDA. A mitigação do estresse oxidativo por microrganismos ocorre pela ativação do sistema antioxidante CAT (Khalafallah., 2008). Como os microrganismos também enfrentam estresse por alagamento, suas atividades antioxidantes convergiram com as da planta no combate às ROS, em

CA, CR e CAR, sendo mediadas por sinalização. Estudos mostram que plantas mais robustas, com maior massa, absorção de nutrientes, concentração de açúcares e eficiência no uso da água, apresentam melhor desempenho (Wang et al., 2012). A coinoculação com *Rhizophagus* em condições de alagamento é uma alternativa de promover tolerância ao estresse, mitigando o dano oxidativo. Da mesma forma a coinoculação com *Azospirillum* está diretamente relacionada não só com a promoção do crescimento das plantas, mas também com as melhorias nas respostas ao estresse oxidativo (Barros et al., 2022).

4. CONCLUSÕES

A coinoculação de plantas de soja é uma alternativa que pode ser adotada para melhorar as respostas das plantas aos danos oxidativos causados pelo alagamento por meio do aumento da atividade da enzima antioxidante CAT e essas respostas ocorrem de forma mais evidente em condições de elevado CO₂.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barros, F. C., De Camargo, R., Lana, R. M. Q., Franco, M. H. R., Stanger, M. C., Pereira, V. J., & Lemes, E. M. (2022). *Azospirillum brasilense* and organomineral fertilizer co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* oxidative stress in soybean. **International journal of recycling organic waste in agriculture**, 11(2), 229-245. <https://doi.org/10.30486/ijrowa.2021.1909458.1134>
- Da-Silva, do Amarante, L. Time-course biochemical analyses of soybean plants during waterlogging and reoxygenation. **Environmental and Experimental Botany**, 180, 104242, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104242>
- Fukami, J., Ollero, F. J., de la Osa, C., Valderrama-Fernandez, R., Nogueira, M. A., Megías, M., & Hungria, M. (2018b). Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Archives of microbiology**, 200, 1191-1203. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1535-x>
- Gong, Z., Duan, Y., Liu, D., Zong, Y., Zhang, D., Shi, X., ... & Li, P. (2023). Physiological and transcriptome analysis of response of soybean (*Glycine max*) to cadmium stress under elevated CO₂ concentration. **Journal of Hazardous Materials**. 448, 130950. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130950>
- Khalafallah, A. A., & Abo-Ghalia, H. H. (2008). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the metabolic products and activity of antioxidant system in wheat plants subjected to short-term water stress, followed by recovery at different growth stages. **Journal of Applied Sciences Research**, 4(5), 559-569.
- Musyoka D M, Njeru E M, Nyamwange M M & Maingi J M. (2020) Arbuscular mycorrhizal fungi and coinoculation of *Bradyrhizobium* increase nitrogen fixation and the growth of green grasses (*Vigna radiata* L.) under water stress, **Journal of Plant Nutrition**, 43: 7, 1036-1047, DOI: 10.1080 / 01904167.2020.1711940
- Shimoia, E. P., Da-Silva, C. J., Posso, D. A., da Silva Martins, T., Agualongo, D. A. P., de Oliveira, A. C. B., & do Amarante, L. (2023). Co-inoculation of Seeds with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, and *Rhizophagus* Improves Nitrogen Assimilation and Growth in Soybean Plants Subjected to Waterlogging. **Russian Journal of Plant Physiology**. 70(6), 146. <https://doi.org/10.1134/S1021443723601040>
- Wang C-J, Yang W, Wang C, Gu C, Niu D-D, Liu H-X, Wang Y-P, Guo J-H (2012) Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains. **PLoS One** 7:1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052565>.