

ESTRESSE OXIDATIVO EM RAÍZES DE SOJA SUBMETIDAS À DEFICIÊNCIA DE OXIGÊNIO E INFLUÊNCIA DO NITRATO

SUZANA LEITZKE¹; KASSIA LUIZA TEIXEIRA COCCO²; ANGELITA CELENTE MARTINS³; DENISE DOS SANTOS COLARES DE OLIVEIRA⁴; ANA CLAUDIA BARNECHE DE OLIVEIRA⁵; LUCIANO DO AMARANTE⁶

¹UFPEL/Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – suzanaleitzke@outlook.com

^{2,3}UFPEL/ Instituto de Biologia – kassiacocco@hotmail.com; angel-celente@hotmail.com

⁵Embrapa Clima Temperado – ana.barneche@embrapa.br

^{4,6}UFPEL/CCQFA – lucianodoamarante@yahoo.com.br; decolares@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, aproximadamente 28 milhões de hectares de solos estão sujeitos ao encharcamento (solos aluviais e hidromórficos), parte encontra-se na região dos Cerrados e parte na região Sul do Brasil (MAGALHÃES et al., 2005).

Visando aumentar a eficiência do sistema produtivo brasileiro, é importante diversificar as espécies cultivadas nas áreas de várzea (sujeitas ao alagamento) com a incorporação de outras, que apresentem tolerância ao estresse causado pelo alagamento (hipóxia), como a cultura da soja. Além da importância econômica dessa leguminosa, ajuda a preservar ou melhorar as características físicas, químicas e biológicas do solo; o controle de plantas daninhas, doenças e pragas; contribui com a incorporação de nitrogênio (N) no solo devido à associação com rizóbios responsáveis pela fixação do N atmosférico, representando economia em fertilizantes nitrogenados (EMBRAPA SOJA, 2013).

Estudos mostram que a aplicação exógena de nitrato é uma das formas de diminuir os efeitos prejudiciais sobre o metabolismo vegetal causados pelo alagamento. O nitrato parece desempenhar uma importante função em prolongar a tolerância aos efeitos desencadeados pelo déficit de O₂ em muitas espécies de plantas (HORCHANI et al., 2010).

As condições de hipóxia e especialmente a reoxigenação das células, promove um desbalanço no estado redox nos componentes da mitocôndria e do cloroplasto, levando à uma super redução dos carreadores de elétrons e vazamento de elétrons (MURPHY, 2009), permitindo os mesmos reagirem com o oxigênio e produzirem as espécies reativas de oxigênio (EROs), o que pode resultar em estresse oxidativo.

As informações sobre os efeitos do nitrato na proteção celular contra danos oxidativos em raízes de soja submetidas a condições de hipóxia ou pós-hipóxia e cultivadas na ausência de N-mineral (plantas noduladas), são ainda desconhecidas. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a resposta da aplicação de nitrato em plantas noduladas de soja quanto à atividade da enzima antioxidante ascorbato peroxidase, produção de H₂O₂ e peroxidação lipídica em raízes sob condição de hipóxia (inundação) e pós-hipóxia (recuperação do estresse hipóxico).

2. METODOLOGIA

O experimento foi conduzido com plantas de soja [*Glycine max* (L.)], genótipo TEC IRGA 6070 RR, no período de janeiro a março de 2016, em casa de vegetação sob condições naturais de luz e temperatura, em área pertencente à Universidade Federal de Pelotas localizada no município do Capão do Leão, RS.

Inicialmente, as sementes foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*. As plantas foram cultivadas em vasos de 3L contendo vermiculita média expandida como substrato, na proporção de duas plantas/vaso, representando a unidade experimental, sendo as mesmas nutridas com solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1938), sem nitrogênio mineral.

Ao atingirem o estágio R2 (florescimento), um grupo de plantas foi nutrido com nitrogênio mineral na forma de nitrato (5 mM), quatro dias antes de iniciar o alagamento das plantas (hipóxia radicular), e o outro grupo permaneceu dependente apenas do nitrogênio oriundo da fixação simbiótica. Após esse período, os dois grupos de plantas foram submetidos à inundação do sistema radicular, por meio da manutenção de uma lâmina de 2 cm de solução nutritiva diluída a 1/3 da força sobre a superfície do substrato, totalizando sete dias de inundação, ocasião em que foi realizada a primeira coleta de material vegetal para análise. O grupo de plantas nutridas com nitrato, recebeu o íon na concentração de 5 mM durante todo o período de inundação do sistema radicular, assim como um dos grupos de plantas controle (normóxia). A recuperação das plantas submetidas aos sete dias de tratamento hipóxico foi avaliada no primeiro e quarto dia após drenagem da lâmina de solução de inundação, ocasiões onde foram realizadas a segunda e terceira coleta.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2, sendo os fatores regime hídrico (controle e alagamentorecuperação) e adição de nitrato na solução nutritiva (ausência ou presença do íon), com três repetições.

As variáveis avaliadas foram a atividade da enzima antioxidante ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11), conforme NAKANO; ASADA (1981), os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), determinados de acordo com VELIKOVA et al. (2000) e a peroxidação lipídica determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por CAKMAK; HORST (1991).

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo testados os efeitos simples e interações, comparando as médias pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SAS 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância apontou interação entre os fatores regime hídrico e adição de nitrato (NO_3^-) para a variável APX, demonstrando efeito estimulador do tratamento de inundação sobre a atividade da enzima independente da presença de nitrato. Porém, os valores mais elevados de atividade da APX, nas plantas sob hipóxia, foram observados naquelas que não receberam nitrato (Tabela 1).

Para a variável peróxido de hidrogênio, plantas controle apresentaram maiores teores em relação à inundação. Quanto à aplicação de nitrato, maior produção de H_2O_2 ocorreu no grupo nutrido com o íon. Para a TBARS, observou-se diferença significativa apenas para o fator regime hídrico, onde plantas inundadas mostraram maior peroxidação lipídica, sem efeito significativo da adição de nitrato.

Considerando a análise de variância para um dia de recuperação, houve interação entre os dois fatores, tanto para a atividade da enzima APX como para o teor de H_2O_2 . Para a APX, os valores foram menores em plantas sob pós-hipóxia. Somado a isto, as plantas controle, nutridas com nitrato, apresentaram maior atividade da enzima (Tabela 1). O conteúdo de H_2O_2 foi significativamente maior apenas em plantas sob recuperação que não receberam nitrato, em comparação ao controle. No entanto, em relação ao efeito da nutrição, plantas que receberam nitrato apresentaram maiores índices. A condição pós-hipóxia estimulou a peroxidação

lipídica, evidenciado pela maior produção de TBARS, porém sem efeito significativo da adição do íon.

Tabela 1. Atividade da enzima APX ($\mu\text{mol Asc min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína), teor de H_2O_2 ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) e TBARS ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF), em raízes de soja submetidas à inundação e diferentes períodos de recuperação, e a adição de nitrato na solução de cultivo.

Variável	Regime Hídrico – Inundação	Adição de Nitrato (NO_3^-)		
		- NO_3^-	+ NO_3^-	
APX	Controle	0,108 a B*	0,124 a B	
	Inundação – 7 dias	0,293 a A	0,219 b A	
Regime Hídrico – Inundação – 7 dias		Adição de Nitrato (NO_3^-)		
H_2O_2	Controle	Inundado	- NO_3^-	+ NO_3^-
	59,759 a	56,490 b	54,747 b	61,502 a
TBARS	0,010 b	0,015 a	0,013 ^{ns}	0,012 ^{ns}
Variável	Regime Hídrico – Recuperação	Adição de Nitrato (NO_3^-)		
		- NO_3^-	+ NO_3^-	
APX	Controle	0,086 b A	0,121 a A	
	Recuperação – 1 dia	0,044 a B	0,054 a B	
H_2O_2	Controle	55,784 b B	77,457 a A	
	Recuperação – 1 dia	64,530 b A	75,200 a A	
Regime Hídrico - Recuperação		Adição de Nitrato (NO_3^-)		
TBARS	Controle	Recuperação – 1 dia	- NO_3^-	+ NO_3^-
	0,009 b	0,014 a	0,012 ^{ns}	0,011 ^{ns}
Variável	Regime Hídrico – Recuperação	Adição de Nitrato		
		- NO_3^-	+ NO_3^-	
APX	Controle	0,135 a B	0,142 a B	
	Recuperação – 4 dias	0,295 a A	0,185 b A	
Regime Hídrico - Recuperação		Adição de Nitrato		
H_2O_2	Controle	Recuperação – 4 dias	- NO_3^-	+ NO_3^-
	62,136 ^{ns}	65,329 ^{ns}	55,709 b	71,756 a
TBARS	0,009 ^{ns}	0,008 ^{ns}	0,009 ^{ns}	0,008 ^{ns}

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, na linha, e maiúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; ^{ns} – não significativo.

Aos quatro dias de recuperação ocorreu interação entre os dois fatores para a atividade da APX. Nas plantas que sofreram o estresse, a atividade da enzima foi significativamente maior em relação às do controle, independente da aplicação de nitrato, porém quando comparado os dois grupos em recuperação, foi mais elevada no grupo cultivado na ausência de N-mineral (Tabela 1). A produção de H_2O_2 e a peroxidação lipídica foram equivalentes ao controle, sugerindo recuperação das plantas ao estresse pós-hipóxico. Porém, em plantas nutridas com nitrato o teor de H_2O_2 foi maior em plantas que receberam NO_3^- , não resultando em maior peroxidação lipídica quando comparado a plantas mantidas na ausência de N-mineral.

De maneira geral, condições de estresse intensificam a produção de EROs e sua eliminação, principalmente pela ação das enzimas antioxidantes. Em soja, o nitrato exerceu um efeito benéfico induzindo a ativação do sistema antioxidante de defesa contra EROs através do aumento da atividade das enzimas em raízes sob condições de hipóxia e pós-hipóxia, tais como a APX (BORELLA, 2015). Embora a

APX tenha alta afinidade com o H_2O_2 , permitindo a eliminação deste, mesmo em baixas concentrações, é possível que outros mecanismos antioxidantes estejam mais ativos no genótipo TEC IRGA 6070 RR. Os resultados observados nesta literatura foram obtidos a partir de plantas cultivadas com nitrato desde o início do ciclo (plantas não-noduladas), diferentemente do presente estudo, onde as plantas noduladas necessitaram ajuste metabólico ao íon, uma vez que o nitrogênio foi provido apenas pela fixação simbiótica de N_2 até o início do tratamento com nitrato. Além disso, outros mecanismos podem estar ativados pela presença do nitrato, como o ciclo do óxido nítrico (NO), processo que recicla o poder redutor mitocondrial e citossólico sob hipóxia (GUPTA et al., 2011), diminuindo danos oxidativos envolvidos sob deficiência de O_2 .

4. CONCLUSÕES

O aumento da tolerância ao alagamento de plantas noduladas de soja genótipo TEC IRGA 6070 RR, frente à aplicação de nitrato, não pode ser explicado pela atividade da enzima APX, tanto em condição de hipóxia quanto de pós-hipóxia. Outras enzimas e moléculas antioxidantes envolvidas no status redox celular deverão ser investigados em trabalhos futuros, assim como os mecanismos de reciclagem de poder redutor induzidos pelo nitrato sob deficiência de O_2 .

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORELLA, J. **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, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v.83, p.463-468, 1991.
- EMBRAPA SOJA. **Tecnologia de produção de soja – região central do Brasil 2014**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265p.
- GUPTA, K.J.; IGAMBERDIEV, A.U.; MANJUNATHA, G.; SEGU, S.; MORAN, J.F.; NEELAWARNE, B.; BAUWE, H.; KAISER, W.M. The emerging roles of nitric oxide (NO) in plant mitochondria. **Plant Science**, v. 181: 520-526, 2011.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The Water Culture Method of Growing Plants Without Soil. **Cal Agri Exp Sta**, v.347, p. 1–39, 1938.
- HORCHANI, F.; HAJRI, R.; KHAYATI, H.; BROUQUISSE, R.; ASCHI-SMITI, S. Does the source of nitrogen affect the response of subterranean clover to prolonged root hypoxia?. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, v. 173, p. 275-283, 2010.
- MAGALHÃES, P. C.; COELHO, C. H. M.; GAMA, E. E. G.; BORÉM, A. **Avaliação dos ciclos de seleção da variedade BRS 4154 – Saracura para tolerância ao encharcamento do solo**. 2005. Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 67p.
- MURPHY, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemistry Journal**, v.417, p. 1-17, 2009.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant 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.