



CÍNTHIA APARECIDA ANDRADE

**O PAPEL DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA
TOLERÂNCIA DE SOJA (*Glicine max*) AO
ALAGAMENTO**

LAVRAS – MG

2013

CÍNTIA APARECIDA ANDRADE

**O PAPEL DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA TOLERÂNCIA DE
SOJA (*Glicine max*) AO ALAGAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. José Donizeti Alves

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Andrade, Cíntia Aparecida.

O papel do peróxido de hidrogênio na tolerância de soja (*Glycine max*) ao alagamento / Cíntia Aparecida Andrade. – Lavras : UFLA, 2013.

58 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: José Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. Soja - Estresse oxidativo. 2. Soja - Crescimento. 3. Soja - Fotossíntese. 4. Soja - Hipoxia. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 583.322041

CÍNTHIA APARECIDA ANDRADE

**O PAPEL DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA TOLERÂNCIA DE
SOJA (*Glicine max*) AO ALAGAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 03 de outubro de 2013.

Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart	UNILAVRAS
Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho	EMBRAPA
Dr. João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa	UFLA

Dr. José Donizeti Alves
Orientador

LAVRAS – MG

2013

AGRADECIMENTOS

A Deus que incessantemente olha por mim, guia meus passos e ensina-me que sempre há uma solução.

Aos meus pais, que incentivou-me e, acima de tudo, apoiou-me para a realização de mais este sonho.

As minhas avós: “Vó” Joana e “Vó” Maria, que foram e são exemplos de perseverança na vida e a todos os tios (as) e primos (as) que torcem por mim.

Ao meu namorado Leandro, por viver comigo a Palavra: “O amor é paciente, é bondoso; o amor não é invejoso, não é arrogante, não se ensoberbece, não é ambicioso, não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não guarda ressentimento pelo mal sofrido, não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade; tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta”.

Aos meus amigos (as) de Ingaí e Lavras, que são parte integrante da minha história e estão sempre guardados na memória e no coração.

Aos meus amigos (as) e companheiros (as) de sala de aula da Fisiologia Vegetal com que, nesse tempo, convivi e que fizeram este mestrado diferente.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de cursar a pós-graduação.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal e a todos os outros que participaram ativamente do meu processo de formação.

Ao meu orientador, Prof. José Donizeti, por toda a atenção, apoio, amizade e conselhos oferecidos durante estes anos...

Aos membros da banca examinadora Prof^a. Patrícia e Dr.^a Milene pela disponibilidade em participarem da banca de defesa e pela contribuição intelectual.

Aos colegas Kamila, Dayane, Helbert, Isabel, Jaqueline, Lorena e Meline pela amizade, disponibilidade e ajuda para a realização deste trabalho. À Lissa, Ian, Jessica e Valter pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal Daniela, Lena, Tanhan, Joel, Odorêncio, Barrinha e Evaristo pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, de forma direta ou indireta, participaram deste encerramento de mais um “degrau” de minha vida e que não foram citados aqui, mas Deus sabe e traz a recompensa.

RESUMO

Objetivou-se, no presente trabalho, avaliar a influência do pré-tratamento de sementes de soja (*Glycine max*) com peróxido de hidrogênio, na tolerância ao alagamento. Dessa maneira, sementes de soja foram pré-tratadas com H₂O₂ 70mM ou com água (controle) e 12 dias após semeadura essas foram submetidas ao alagamento. As avaliações foram realizadas antes da imposição do estresse, aos 16 dias (aparecimento de clorose nas plantas controle) e aos 27 dias (aparecimento de clorose nas plantas pré-tratadas) de alagamento. Avaliou-se a condutância estomática, taxa fotossintética, acúmulo de massa seca, conteúdo de pigmentos, sistema antioxidante e diâmetro do caule das plantas expostas ao alagamento. Observou-se que o pré-tratamento induziu a uma maior atividade da enzima catalase em folha, que, juntamente, com maiores teores de carotenoides proporcionaram uma manutenção dos níveis de clorofila e taxas fotossintéticas em plantas pré-tratadas, o que culminou com maior acúmulo de massa seca na parte aérea dessas plantas. O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio também levou ao aparecimento de adaptações morfoanatômicas como hipertrofia do caule e maior formação de raízes adventícias. O pré-tratamento com H₂O₂ desencadeou a tolerância de plantas de soja ao alagamento pela ativação de diferentes vias que atuaram conjuntamente, atenuando os efeitos do estresse prolongado nestas plantas e resultando em um melhor desempenho fisiológico. O peróxido de hidrogênio atuou como molécula sinalizadora para desencadear as respostas fisiológicas de plantas de soja submetidas ao alagamento.

Palavras-chave: Hipoxia. Estresse oxidativo. Fotossíntese. Crescimento.

ABSTRACT

The present work aimed at evaluating the influence of pretreatment of soybean seeds (*Glicine max*) with hydrogen peroxide regarding flooding tolerance. Thus, soybean seeds were pre-treated with 70mM H₂O₂ or water (control) and, 12 days after sowing, they were submitted to flooding. The evaluations were performed before the imposition of stress, at 16 days (symptoms of chlorosis in control plants) and at 27 days (symptoms of chlorosis in pretreated plants) of flooding. Stomatal conductance, photosynthetic rate, biomass accumulation, pigment content, antioxidant system and stem diameter of plants exposed to flooding were evaluated. We observed that the pretreatment increased catalase activity in the leaves which, in addition to larger carotenoid content, provided maintenance in the chlorophyll levels and photosynthetic rates in pre-treated plants, causing higher dry matter accumulation in the shoots of these plants. The pretreatment with hydrogen peroxide also lead to morph-anatomical adaptations such as stem hypertrophy and increased formation of adventitious roots. The pretreatment also sparked soybean tolerance to flooding by activating different pathways which acted together, mitigating the effects of prolonged stress, resulting in better physiological performance. Hydrogen peroxide acted as a signaling molecule to trigger physiological responses of soybean to flooding.

Keywords: Hypoxia. Oxidative stress. Photosynthesis. Growth.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Plantas de soja pré-tratadas com H ₂ O ₂ e controle submetidas à hipoxia.....	23
Figura 2	Caule evidenciando o aparecimento de rachaduras (A) e formação de raízes (B) em plantas de soja, pré-tratadas com H ₂ O ₂ e controle, submetidas ao alagamento.....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Comportamento da soja frente ao excesso de água no solo	12
2.2	Estresse oxidativo	13
2.3	Peróxido de hidrogênio como uma molécula sinalizadora	17
2.4	O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Condutância estomática e taxa fotossintética	24
3.2	Massa seca	24
3.2.1	Pigmentos cloroplastídicos	24
3.3	Análises bioquímicas	25
3.3.1	Enzimas do metabolismo antioxidante	25
3.4	Peróxido de hidrogênio	26
3.5	Peroxidação lipídica	26
3.6	Diâmetro	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Taxa fotossintética e condutância estomática	28
4.2	Massa seca	29
4.3	Pigmentos cloroplastídicos	31
4.4	Atividade do sistema antioxidante	33
4.5	Conteúdo de H₂O₂ e peroxidação lipídica	37
4.6	Diâmetro de caule	40
5	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de condições ambientais desfavoráveis, tais como alagamento, temperaturas extremas, ataque de patógenos e alta luminosidade, leva à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo caracterizar o estresse oxidativo. A elevada produção de radicais superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH^\cdot), oxigênio singleto (1O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é prejudicial às células, uma vez que essas EROS podem causar danos às suas estruturas. Quando ocorre um desequilíbrio entre a sua produção e remoção, essas podem levar à peroxidação de lipídeos, oxidação de proteínas, danos a ácidos nucleicos, inibição enzimática e ativação da morte celular programada.

As espécies reativas de oxigênio também podem desempenham um papel na sinalização celular, relacionando diferentes estímulos e as respectivas respostas. Diferentes formas de EROs interagem com alvos moleculares sensíveis a alterações na concentração dessas espécies, dentro e fora das células e, assim, transformam essa informação em alterações na expressão de genes .

Dentre as EROs, o peróxido de hidrogênio é a molécula mais apropriada para a função de sinalização, devido ao maior tempo de meia-vida, à maior estabilidade e à capacidade de difundir-se livremente através das membranas celulares. O acúmulo celular de peróxido de hidrogênio é uma resposta precoce a vários estresses, tais como alagamento, seca, temperaturas extremas, ataque de patógenos dentre outros.

Atualmente, sabe-se que a aplicação de H_2O_2 em baixas concentrações pode induzir à tolerância de plantas ao estresse. Estudos têm comprovado que o pré-tratamento com H_2O_2 , em várias espécies, protege as plantas de danos oxidativos causados por alta intensidade de luz, baixas temperaturas e estresse salino. Nesses casos, o pré-tratamento relaciona-se à manutenção da maior

atividade das enzimas do sistema antioxidante, bem como maiores concentrações de antioxidantes não enzimáticos. As plantas pré-tradadas com H_2O_2 também apresentam adaptações morfofisiológicas tais como o aumento na condutância estomática e na taxa fotossintética, maiores teores de pigmentos, acúmulo de biomassa e formação de raízes adventícias.

O alagamento constitui-se uma forma de estresse ao qual muitas espécies são susceptíveis, podendo levar a uma redução na produtividade da cultura ou até mesmo não completar seu ciclo de vida. Nas áreas de várzea da região Sul do Brasil, há a crescente utilização da cultura da soja como estratégia mais rentável para ser plantada alternativamente ao arroz. Dessa maneira, considerando-se que a soja não é uma espécie predominantemente tolerante à baixa disponibilidade de oxigênio, a utilização de métodos que promovam a tolerância a esse tipo de estresse pode ser uma alternativa.

Diante da atuação do peróxido de hidrogênio no aumento da tolerância de espécies vegetais aos mais variados tipos de estresse e considerando-se a inexistência de estudos relacionando a aplicação deste composto em soja e a tolerância de plantas ao alagamento, objetivou-se, no presente trabalho, investigar a aplicação de H_2O_2 como pré-tratamento de sementes de soja (*Glicine max*) e a possibilidade do aumento da tolerância dessa espécie ao alagamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Comportamento da soja frente ao excesso de água no solo

A soja é uma planta pertencente ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Faboideae (Papilionoideae), gênero *Glycine* e forma cultivada *Glycine max* (L.) Merrill (COSTA, 1996).

No que se refere ao comportamento da soja frente ao excesso de água no substrato, há diferentes adaptações morfoanatômicas desenvolvidas por plantas dessa espécie, como forma de tolerar a condição de estresse. Estudos sobre respostas de plântulas de soja frente ao encharcamento do solo têm demonstrado uma redução no crescimento, especialmente no alongamento radicular (SHI et al., 2008), além de redução no acúmulo de massa seca (FANTE et al., 2010) e massa fresca (SILVA, 2009).

Pires, Soprano e Cassol (2002) constataram formação de rachaduras no caule na região submersa, aumento do diâmetro e formação de uma região esponjosa na base do caule, surgimento de raízes adventícias, morte da raiz principal, formação de aerênquimas, além de redução nos teores de nitrogênio, potássio, magnésio e manganês, e aumento nos teores de ferro, nas folhas de soja alagada. Na região de hipertrofia do caule, caracterizada pelo aparecimento de um tecido branco, há formação de aerênquimas secundários, que são estruturas que funcionam como uma via de transporte de oxigênio do caule para raízes (SHIANAMURA et al., 2010). Além disso, Komatsu, Hiraga e Yanagawa (2012) observaram menor expressão de proteínas relacionadas à lignificação da parede celular em raízes de soja alagada, em decorrência da regulação negativa por espécies reativas de oxigênio e jasmonato.

Outra estratégia para tolerância à privação de oxigênio é a maior atividade das enzimas relacionadas ao metabolismo anaeróbico, tais como desidrogenase alcoólica, desidrogenase do lactato e descarboxilase do piruvato (BORELLA et al., 2013). Análises bioquímicas de plântulas de soja alagadas provaram que a degradação da glicose (NANJO et al., 2010) e o acúmulo de açúcares solúveis totais e amido são potencializados durante o alagamento (FANTE et al., 2010).

Silva (2009) observou que ocorreram alterações nas trocas gasosas em condições de hipóxia, devido à redução nas concentrações de pigmentos fotossintéticos, aumento na resistência estomática e redução na transpiração. Em situações de déficit de oxigênio, enzimas relacionadas ao metabolismo antioxidante tiveram sua atividade alterada, como uma redução na atividade da enzima peroxidase do ascorbato (KAUSAR et al., 2012).

2.2 Estresse oxidativo

O estresse abiótico, assim como o biótico, levam à formação de EROs, que são radicais livres, ou seja, possuem elétrons desemparelhados na camada de valência e, por isso, são altamente reativas. As principais formas de EROs são radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto (1O_2) (FOYER; NOCTOR, 2005).

O radical superóxido (O_2^-) é um radical livre moderadamente reativo, com uma meia-vida de 2-4 μs . Entretanto, o superóxido não pode atravessar as membranas biológicas e é prontamente dismutado a H_2O_2 . Os radicais hidroperoxila (HO_2^\cdot), que são formados a partir do O_2^- por protonação em soluções aquosas, podem atravessar as membranas biológicas e subtrair átomos de hidrogênio de ácidos graxos poliinsaturados e hidroperóxidos de lipídeos,

iniciando então, a auto-oxidação de lipídeos (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010).

O radical hidroxila (OH^\cdot) é a mais reativa das EROs, sendo formado a partir de O_2^- ou H_2O_2 na reação de Haber-Weiss. O radical OH^\cdot pode reagir potencialmente com todas as moléculas biológicas como DNA, proteínas, lipídeos e praticamente qualquer componente celular. Como as células não possuem mecanismos enzimáticos para eliminar essa espécie altamente reativa, seu acúmulo pode levar à morte celular (VRANOVÁ et al., 2002).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é moderadamente reativo, possui uma longa meia-vida celular (1ms) e tem a capacidade de difundir-se livremente através das membranas (HENZLER; STEUDLE, 2000). Tais características fazem desse radical um importante sinalizador intracelular, tendo um papel central em várias vias de sinalização, que levam, principalmente, à tolerância cruzada (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010; FOYER; NOCTOR, 2003). Entre os processos induzidos pelo peróxido de hidrogênio estão: fechamento estomático, formação de ligações transversais na parede celular, expressão de genes relacionados a respostas ambientais, biogênese de peroxissomos, dentre outros. Além disso, o H_2O_2 pode também inativar enzimas por oxidação de seus grupos tiol, induzir enzimas como catalase e peroxidase, provocar danos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (GILL; TUTEJA, 2010; MITTLER et al., 2011; NEILL et al., 2002).

Em condições fisiológicas normais, existe um equilíbrio entre as EROs e os antioxidantes, entretanto em condições estressantes há um rompimento da homeostase celular, provocando um aumento na produção dessas espécies. Embora esse aumento possa ser uma ameaça às células, essas espécies podem também atuar como sinalizadores para a ativação da resposta ao estresse e vias de defesa do vegetal (MITTLER, 2011; NEILL et al., 2002). Portanto, as EROs

podem ser vistas como indicadores celulares e como mensageiros secundários envolvidos na transdução de sinais na resposta ao estresse (MITTLER, 2002).

Para evitar maiores danos causados pela alta concentração de EROs, existem controles em níveis transcricionais, traducionais e metabólicos. A hipoxia induz os genes de neutralização ou utilização das EROs, assim como aqueles relacionados às vias glicolítica e fermentativa, além de promover ajustes no fluxo mitocondrial de elétrons. Contudo, os pontos de regulação mais importantes são exatamente aqueles relacionados à economia de energia e ao controle da formação de EROs (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010).

Diante da maior produção de EROs e, considerando-se os prejuízos causados pelas mesmas, as plantas possuem os sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático. O enzimático é composto pela dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT), dentre outras, enquanto ascorbato, glutatona e tocoferol são antioxidantes não enzimáticos. A atividade desses dois sistemas, que atuam na proteção contra danos oxidativos, pode ser controlada pela concentração de O_2 na célula sob condições de alagamento (BLOKHINA; FARSGESTEDT, 2010; BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; STEFFENS; STEFFENS-HEINZ; SAUTER, 2013).

Dentro das células, a SOD é a primeira linha de defesa contra EROS, realizando a dismutação dos íons superóxido, com a formação de H_2O_2 . Os íons superóxidos são sintetizados em qualquer compartimento celular onde há um transporte de elétrons, portanto a SOD está presente em todos os compartimentos celulares susceptíveis ao estresse oxidativo (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; BREUSEGEM et al., 2001; MITTLER, 2002). A SOD é classificada, de acordo com o seu metal cofator, em diferentes grupos, sendo o tipo e a quantidade de isoformas de SOD variáveis entre espécies vegetais (ASADA, 1999). A FeSOD está presente nos cloroplastos, MnSOD,

presente nas mitocôndrias e peroxissomos, e as Cu/Zn-SOD, presentes nos cloroplastos, peroxissomos, no citosol e no espaço extracelular (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; CAVALCANTI et al., 2004).

A CAT, enzima que possui diferentes isoformas em vegetais, tem a função de neutralizar o H_2O_2 em água e oxigênio molecular e está presente nos peroxissomas e glioxissomas. Essas são as principais enzimas de detoxificação do H_2O_2 em plantas e podem dismutar diretamente o H_2O_2 ou oxidar substratos, tais como metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico. As catalases podem ser divididas em três classes: classe 1, que removem o H_2O_2 produzido durante a fotorrespiração em tecidos fotossintéticos; classe 2, produzidas em tecidos vasculares e cuja função biológica permanece desconhecida; e classe 3, onde estão as catalases presentes em sementes e plantas jovens, cuja atividade está relacionada à remoção do H_2O_2 produzido durante a degradação dos ácidos graxos no glioxissoma (BREUSEGEM et al., 2001; GARG; MANCHANDA, 2009; GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA, 2012).

A APX é considerada a enzima mais importante da eliminação de H_2O_2 no citosol e nos cloroplastos (INZÉ; VAM, 1995). Essa enzima utiliza ascorbato como seu doador de elétrons para reduzir H_2O_2 à água, fazendo parte do ciclo ascorbato-glutationa (SHIGEOKA et al., 2002). Segundo Polle (2001), esse ciclo é uma via eficiente para plantas que apresentam disponível o H_2O_2 em alguns compartimentos celulares onde não existe catalase presente, como por exemplo, nos cloroplastos (MITTLER, 2002). As isoenzimas de APX são distribuídas em, pelo menos, quatro compartimentos celulares distintos: mitocôndria (miAPX), citosol (cAPX), peroxissomo/glioxissomo (mAPX) e nos cloroplastos (chlAPX). No entanto, nos cloroplastos, a APX ocorre em duas isoformas: a forma da membrana tilacóide (tAPX) e a forma solúvel no estroma (sAPX). A APX da membrana dos tilacóides e a estromal estão envolvidas na eliminação do H_2O_2 produzido pela fotossíntese e a mAPX e a miAPX eliminam

o H_2O_2 pela fotorrespiração e pela respiração, respectivamente. A função fisiológica da cAPX é de proteção das plantas, sob várias condições de estresse (MANO et al., 1997; SHIGEOKA et al., 2002).

Combinados ao sistema enzimático estão os antioxidantes não enzimáticos, tais como ácido ascórbico, tocoferol, glutathione e compostos fenólicos. O ácido ascórbico funciona como doador de elétrons, em diversas reações enzimáticas e não enzimáticas, além de possuir outras funções nas células. O tocoferol é um antioxidante relacionado à proteção das membranas celulares, apresentando também outras funções que não antioxidantes. Os compostos fenólicos são compostos secundários amplamente presentes em plantas que agem como cofatores dos mecanismos enzimáticos para a regulação da atividade enzimática através da geração de enzimas antioxidantes (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003).

Desta maneira, é necessário que o nível de EROs na célula seja mantido sob controle, uma vez que o acúmulo dessas espécies pode causar inúmeros danos às células. Essas espécies reativas produzidas de maneira descontrolada agem oxidando proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, caracterizando o estresse oxidativo (ASADA, 1999; DAT et al., 2000; MITTLER, 2002; MOLLER, 2001; SHARMA, 2012).

É importante notar que a função de ser um sinalizador de estresse ou uma molécula prejudicial à célula depende de um equilíbrio entre a produção de EROs e a produção de substâncias antioxidantes (GECHEV et al., 2006; GRATÃO et al., 2005).

2.3 Peróxido de hidrogênio como uma molécula sinalizadora

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma das EROs mais estáveis, é um componente vital para o desenvolvimento, metabolismo e homeostase de

diferentes organismos (BIENERT; SCHJOERRING; JAHN, 2006), pois está envolvido nos processos de aclimação e defesa (SLESÁK et al., 2007). Diferentemente do superóxido, radical hidroxila e oxigênio singlete, o peróxido de hidrogênio não é um radical livre e não apresenta carga. Por isso, e devido ao seu longo tempo meia-vida, quando comparada às de outras EROs, o mesmo pode atuar como uma molécula sinalizadora capaz de percorrer longas distâncias até o seu alvo (VRANOVÁ et al., 2002). Além disso, canais transportadores de água na membrana plasmática, conhecidos como aquaporinas, podem facilitar o movimento de H_2O_2 transmembranar (HENZLER; STEUDEL, 2000). Nos sistemas biológicos, o peróxido de hidrogênio pode ter surgido juntamente com o metabolismo aeróbico. Elevadas concentrações dessa substância são potencialmente danosas para uma grande variedade de macromoléculas, entretanto, mecanismos de eliminação dessa ERO parecem ter surgido também nos primórdios do processo de evolução (BIENERT; SCHJOERRING; JAHN, 2006).

Até pouco tempo atrás, o peróxido de hidrogênio e outras EROs eram vistos unicamente como metabólitos tóxicos para a célula, porém estudos demonstram que essas atuam como moléculas sinalizadoras, sendo benéficas à baixas concentrações e prejudiciais quando em excesso (GECHEV; HILLE, 2005; NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2002; QUAN et al., 2008; UCHIDA et al., 2002). O H_2O_2 funciona como uma molécula sinalizadora em plantas sob condições de estresses bióticos e abióticos, estando envolvido no fechamento estomático, gravitropismo radicular, tolerância à deficiência de oxigênio, fortalecimento da parede celular, senescência, produção de fitoalexinas, fotossíntese, abertura estomática e no controle do ciclo celular (GECHEV et al., 2006; NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2002; NEILL et al., 2002; PETROV; BREUSEGEM, 2012).

Contudo, os efeitos biológicos do H_2O_2 mostram-se dependentes não apenas de sua concentração, mas também do seu sítio de produção, do estágio de desenvolvimento da planta e da prévia exposição da planta a outros tipos de estresse (PETROV; BREUSEGEM, 2012). Rutschow, Baskin e Kramer (2011) sugerem que baixas concentrações de H_2O_2 geram um suave sinal de estresse que pode aliviar o estresse mais intenso e, inversamente, o acúmulo de quantidades mais elevadas de H_2O_2 produz uma forte mensagem de estresse, semelhante à invasão de um patógeno, o que pode conduzir à morte celular.

Uma grande variedade de estímulos ambientais leva a um aumento temporário na concentração de H_2O_2 , sendo esse fenômeno visto como um sinal que transmite os estímulos iniciais para uma resposta final no metabolismo (PETROV; BREUSEGEM, 2012). Para Miller, Shulaev e Mittler (2008), a elevação na concentração de H_2O_2 é percebida por fatores de transcrição sensíveis às modificações no estado redox da célula e então iniciam as cascatas de reações. De acordo com Hardin et al. (2009), uma possível alternativa para a percepção do H_2O_2 em plantas é a oxidação da metionina a sulfóxido de metionina, em proteínas associadas à percepção de sinais oxidativos, uma vez que isso ocasiona modificação no estado de fosforilação das mesmas e, conseqüentemente, em suas atividades enzimáticas.

O peróxido de hidrogênio possui algumas características que o habilita a atuar como um mensageiro secundário: I- sua produção é facilmente regulada por diversos estímulos, principalmente através de NADPH-oxidases e peroxidases; II- é uma molécula pequena e relativamente móvel, podendo transportar informações entre os diferentes compartimentos celulares; III- é capaz de modular as atividades de sinalização de outros componentes e cascatas de reações, com diferentes resultados biológicos, incluindo os que conduzem à sua própria síntese (PETROV; BREUSEGEM, 2012). De acordo com Bienert, Schloerring e Jahn (2006), o H_2O_2 atua nas células como um mensageiro

secundário, aumentando o fluxo de íons Ca^{2+} e modificando o padrão de proteínas e de expressão gênica. Para Agarwal et al. (2005), o H_2O_2 produzido em resposta à aplicação exógena de Ca^{2+} ou moléculas sinalizadoras (ácido abscísico (ABA) e ácido salicílico) pode induzir à síntese ou ativação de fatores de transcrição que estão associados à indução de várias enzimas do sistema antioxidante. Recentemente, Petrov e Breusegen (2012), afirmaram que o H_2O_2 interfere na produção dos fatores de transcrição e que esses podem induzir uma reprogramação massiva da produção de transcritos que, por sua vez, podem desencadear respostas como a defesa das plantas contra estresses ou a morte celular. Embora o H_2O_2 seja uma molécula sinalizadora que afeta a transcrição, não está claro se ele atua diretamente como sinalizador ou se a oxidação de outras moléculas pelo mesmo é necessária para gerar o sinal intracelular (DESIKAN; HANCOCK; NEILL, 2003).

2.4 O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio

Com o intuito de conferir maior tolerância das plantas a estresses abióticos, muitos estudos têm sido realizados com a aplicação exógena de H_2O_2 . Uchida et al. (2002) demonstraram que plantas de arroz pré-tratadas com H_2O_2 no sistema radicular apresentaram maior resistência ao estresse salino, sugerindo um possível papel desse composto no aumento da tolerância a estresses abióticos. A aplicação de H_2O_2 em sementes de arroz provocou maior taxa de germinação em tempo reduzido, maior peso fresco das plântulas, comprimento das raízes e da parte aérea, além de um aumento dos transcritos de enzimas do sistema antioxidante (SASAKI et al., 2005). Azevedo Neto et al. (2005), trabalhando com milho, também observaram que o pré-tratamento com baixas concentrações de H_2O_2 na solução nutritiva induz aclimação das plantas à salinidade. Em plantas de milho, a produção de H_2O_2 também é elevada em

resposta ao estresse por baixas temperaturas e sua aplicação exógena ao sistema radicular aumenta a tolerância do milho ao resfriamento (PRASAD et al., 1994).

Em alguns estudos com milho foi observado que a aplicação exógena de H_2O_2 no sistema radicular aumenta a tolerância das plântulas aos estresses por calor, frio, seca e salinidade, sugerindo que o H_2O_2 pode funcionar como uma molécula sinalizadora, iniciando o processo de tolerância cruzada (AZEVEDO NETO et al., 2005; GONG et al., 2001; PRASAD et al., 1994).

Em trigo, Wahid et al. (2007) constataram maior tolerância à salinidade por plantas provenientes de sementes pré-tratadas com peróxido de hidrogênio.

O pré-tratamento com H_2O_2 em mudas de café submetidas ao déficit hídrico, induziu a um aumento na atividade das enzimas antioxidantes, bem como uma redução na condutância estomática e na transpiração (DEUNER et al., 2008).

Alguns estudos também foram feitos utilizando a pulverização das folhas com H_2O_2 no sentido de induzirem aclimatação contra estresses abióticos. Gechev et al. (2002), em *Nicotiana tabacum* induziram tolerância das plantas contra o estresse oxidativo, gerado por alta intensidade luminosa ou por um agente inibidor da catalase. Semelhantemente, Gao et al. (2010) detectaram tolerância ao calor em plantas de *Cucumis sativus*, uma vez que a pulverização das plantas com H_2O_2 contribuiu para o aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante, diminuindo a peroxidação lipídica e protegendo a ultraestrutura dos cloroplastos.

O acréscimo nos níveis de H_2O_2 , em resposta a vários estresses constituiu-se um fator-chave que medeia o fenômeno de aclimatação e conduz à chamada tolerância cruzada, em que a exposição prévia a um estresse, pode induzir tolerância a uma exposição subsequente a outro tipo de estresse (NEILL et al., 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em sala de crescimento e casa de vegetação do setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras. Após seleção, sementes de soja (*Glycine max* [L.] Merr.), AN 850, foram pré-tratadas com solução de H₂O₂ 70mM ou água (controle). O pré-tratamento foi realizado pela embebição das sementes na solução ou em água, com aeração constante por um período de 24 horas, após o qual foram lavadas com água destilada para retirar os resíduos da solução. Em seguida, as sementes foram semeadas em sacos de polietileno perfurados de cor preta com as dimensões 15 x 25 cm, e volume de 4,4 L, contendo substrato composto por uma mistura de terra, areia e esterco, na proporção de 1:1:1. Para a germinação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, e temperatura de aproximadamente 25°C por 12 dias. Para a aplicação do estresse foram mantidas duas plantas por saco plástico.

Plantas com 12 dias pós-semeadura foram transferidas para a casa de vegetação, onde foram colocadas em piscinas de 1000 litros para a imposição do estresse por alagamento. Durante todo o período de estresse, o nível de água foi constante, pela manutenção de uma lâmina de água de dois centímetros acima do coleto das plantas, não havendo mecanismos de aeração (Figura 1).



Figura 1 Plantas de soja pré-tratadas com H_2O_2 e controle submetidas à hipoxia

Foram realizadas três coletas: antes da imposição do estresse, aos 16 dias (V1), aos 16 dias (estágio V3) e aos 27 dias (estágio V5) de alagamento. Nessas mesmas épocas foram realizadas as análises de trocas gasosas e coleta do material vegetal (folhas e raízes) para análises bioquímicas e de crescimento.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos, três épocas de coletas e quatro repetições, contendo duas plantas cada. Os resultados foram analisados por análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

3.1 Condutância estomática e taxa fotossintética

As avaliações foram realizadas utilizando-se o analisador de gás por infravermelho (LI-6400XT Portable Photosynthesis System, LI-COR, Lincoln, USA), em folhas medianas completamente expandidas do último trifólio. As características avaliadas foram taxa fotossintética líquida (A) e condutância estomática (gs). Todas as avaliações foram realizadas entre 9 e 10 horas (horário solar) com utilização de fonte artificial de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) em câmara fechada fixada em 1500 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Blue + Red LED LI-6400-02B, LI-COR, Lincoln, USA).

3.2 Massa seca

Para as avaliações de crescimento vegetativo foram quantificadas a massa seca de parte aérea e raízes. O material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada a 70°C até peso constante.

3.2.1 Pigmentos cloroplastídicos

Para a determinação dos teores de pigmentos cloroplastídicos foi utilizado o material vegetal do último trifólio completamente expandido de plantas de cada tratamento. Em seguida, foram macerados 0,1g de tecido foliar em acetona 80%. O volume final foi completado para 10 mL, sendo realizadas as leituras espectrofotométricas a 663,2, 646,3 e 470nm, conforme metodologia de Lichtenthaler e Buschmann (2001). Os teores de clorofilas a, b e total (a+b) e carotenoides foram expressos em μg de pigmentos g^{-1} de massa fresca.

3.3 Análises bioquímicas

O material coletado para as análises bioquímicas foi lavado em água corrente e, em seguida, folhas e raízes foram acondicionadas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -80°C até as análises.

3.3.1 Enzimas do metabolismo antioxidante

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 0,2g de raízes, aos quais foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: tampão fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), EDTA 10 mM, ácido ascórbico 200 mM e PVPP. O extrato foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C , durante o período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT et al., 1998).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Foram adicionados 10 μL do extrato enzimático a 191 μL do meio de incubação composto por: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 mM, NBT 75 mM e riboflavina 2 mM. As placas contendo o meio de incubação mais amostra foram iluminados com lâmpada fluorescente de 20 W por 7 minutos. Para o controle, foi utilizado o mesmo meio de reação sem a amostra. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi realizado com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

A CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1987), em que uma alíquota de 5µL do extrato enzimático será adicionada a 175 µL do meio de incubação, contendo fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e de peróxido de hidrogênio 12,5 mM, incubado a 28°C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de 18 mM⁻¹cm⁻¹.

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota de 5µL do extrato enzimático foi adicionada ao tampão de incubação composto por fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), de ácido ascórbico 10 mM e peróxido de hidrogênio 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981).

3.4 Peróxido de hidrogênio

Cem miligramas de tecido foram macerados em nitrogênio líquido, homogeneizados em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugados, a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. O conteúdo de H₂O₂ foi determinado medindo-se a absorbância a 390 nm em um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0), 45 µL do extrato e iodeto de potássio 1M (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

3.5 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por Buege e Aust (1978). Duzentos miligramas de tecido radicular e foliar foram macerados

em N₂ líquido acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Alíquotas de 250µL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação (0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA), incubando-se, em seguida, a 95°C, por 30 minutos. A paralisação da reação aconteceu por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada, com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600}) / (\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1). A peroxidação foi expressa em µmol de MDA g⁻¹ de matéria fresca.

3.6 Diâmetro

O diâmetro do caule (mm) foi medido na altura do coleto com o auxílio de um paquímetro digital Mitutoyo (CD – 8A CSX – B).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Taxa fotossintética e condutância estomática

Plantas pré-tratadas com H_2O_2 apresentaram maior taxa fotossintética quando comparadas com as do controle (Gráfico 1A). A condutância estomática também foi maior em plantas pré-tratadas, porém no último período não houve diferença entre os tratamentos (Gráfico 1B). Ao longo do período experimental, verificou-se que até os 16 dias houve um acréscimo e, aos 27 dias, um decréscimo dos valores de ambas as variáveis analisadas (Gráfico 1A e 1B).

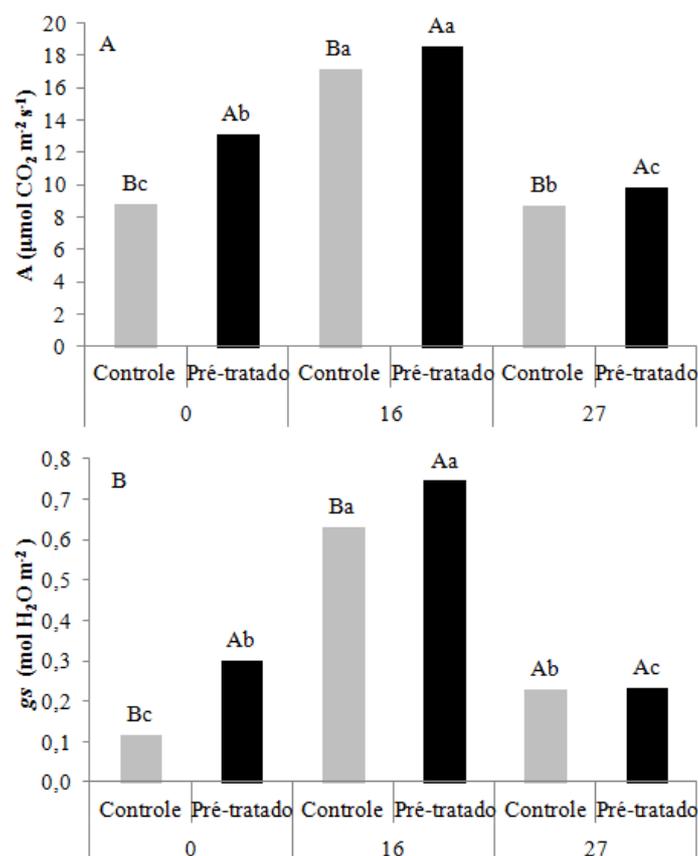


Gráfico 1 Taxa fotossintética (A) e condutância estomática (B) de plantas de soja, pré-tratadas com H_2O_2 e controle, submetidas ao alagamento

Nota: As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam dentro dos tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.2 Massa seca

A massa seca acumulada nas raízes não diferiu entre os tratamentos dentro de cada época de coleta (Gráfico 2A). No que se refere à parte aérea, verificou-se que plantas pré-tratadas apresentaram um incremento da massa seca

somente aos 27 dias, quando comparadas com plantas-controle (Gráfico2B). Ao longo do tempo, houve um aumento da massa seca de raízes e parte aérea, em plantas de ambos os tratamentos (Gráfico 2A e 2B).

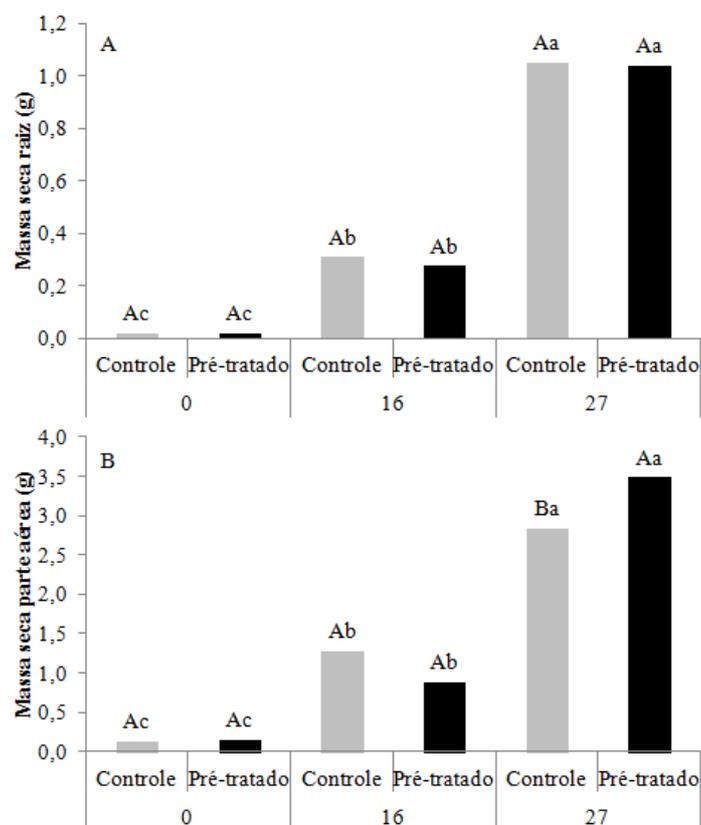


Gráfico 2 Massa seca de raiz (A) e parte aérea (B) de plantas de soja, pré-tratadas com H₂O₂ e controle, submetidas ao alagamento

Nota: As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam dentro dos tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.3 Pigmentos cloroplastídicos

Os conteúdos de clorofilas “a”, “b”, total e carotenoides foram maiores em plantas- controle, quando comparadas às pré-tratadas, antes da imposição do estresse (Gráfico 3). A partir dos 16 dias, o conteúdo de clorofila “a” foi superior em plantas pré-tratadas, em relação às do controle. Ao longo do tempo, houve uma redução desse pigmento em plantas- controle, mantendo-se constante nas pré-tratadas (Gráfico 3A). No que se refere à clorofila “b”, esse conteúdo foi semelhante entre os tratamentos após a submissão das plantas ao alagamento. No decorrer do tempo de alagamento, verificou-se uma redução desse pigmento aos 16 dias de estresse nas plantas- controle, mantendo-se constante até o final do período experimental. Nas plantas pré-tratadas, os teores de clorofila “b” não variaram ao longo do tempo (Gráfico 3B). Para os teores de clorofila total, o comportamento foi semelhante àquele encontrado na clorofila “b” (Gráfico 3C). O teor de carotenoides foi mais elevado em plantas pré-tratadas do que nas controle a partir dos 16 dias até o final do período de estresse. As plantas- controle apresentaram uma redução gradual nos teores desse pigmento, enquanto nas plantas pré-tratadas esses valores mantiveram-se constantes, ao longo de todo o período experimental (Gráfico 3D).

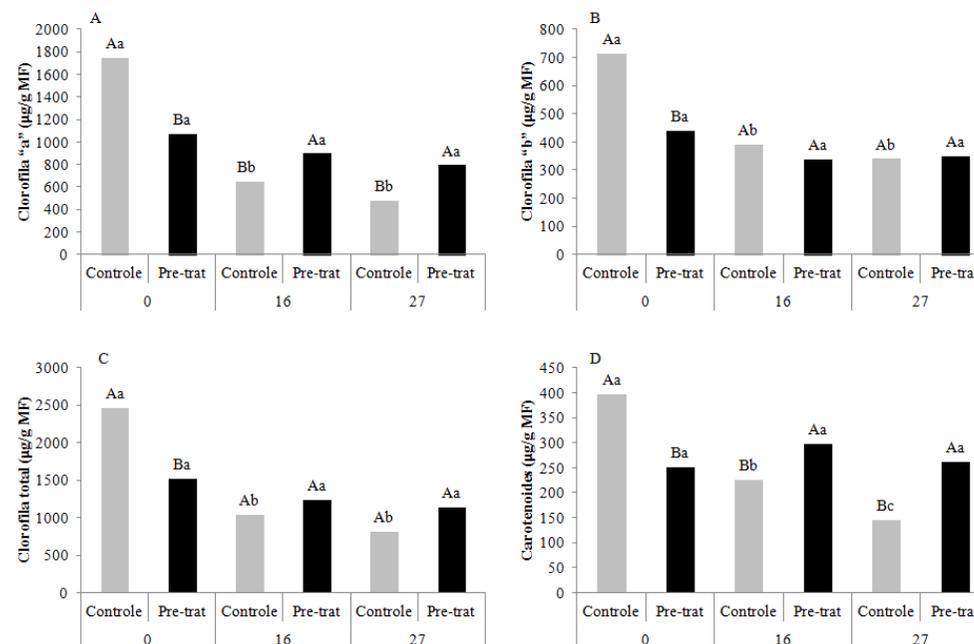


Gráfico 3 Teor de pigmentos fotossintéticos: clorofila a (A), clorofila b (B), clorofila total (c) e carotenoides (D) de plantas de soja, pré-tratadas com H₂O₂ e controle, submetidas ao alagamento

Nota: As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam dentro dos tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.4 Atividade do sistema antioxidante

Pela quantificação da atividade das enzimas do sistema antioxidante SOD, APX e CAT nas raízes, observou-se que a SOD apresentou um comportamento semelhante entre os tratamentos. Ao longo do tempo, a atividade dessa enzima manteve constante até os 16 dias de estresse, aumentando aos 27 dias de alagamento para ambos os tratamentos (Gráfico 4A). A APX apresentou maior atividade de plantas pré-tratadas, quando comparadas com o controle, ao longo de todo o período experimental. Para ambos os tratamentos, houve um aumento na atividade dessa enzima, ao longo do tempo (Gráfico 4B). Quanto à CAT, a atividade dessa enzima não diferiu entre os tratamentos, até os 16 dias de alagamento, sendo menor nas plantas pré-tratadas somente aos 27 dias de estresse. De modo geral, houve um aumento na atividade da CAT, ao longo do tempo (Gráfico 4C).

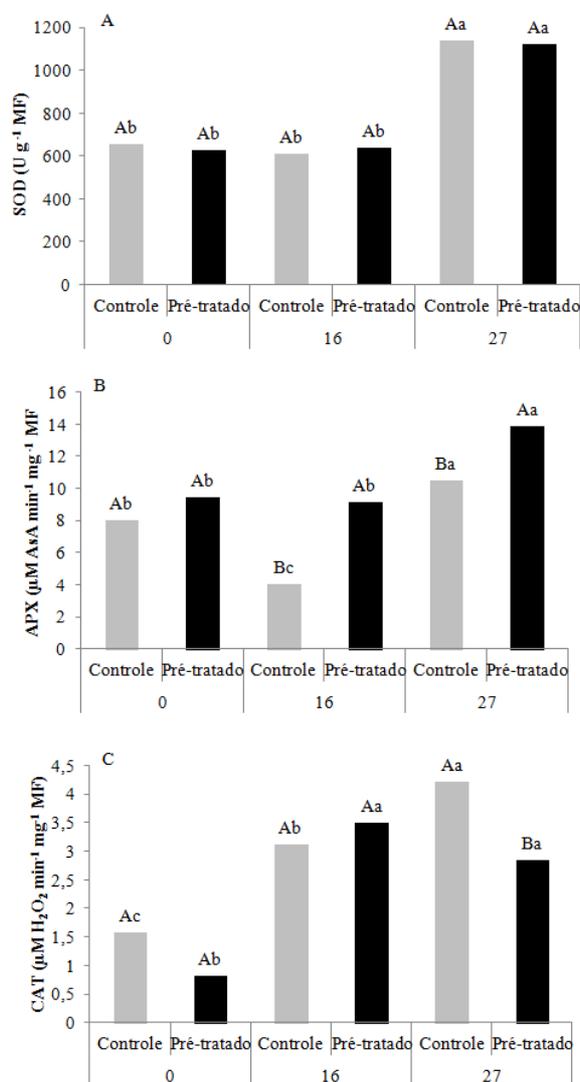


Gráfico 4 Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A), APX (B) e CAT (C) do sistema radicular de plantas de soja, pré-tratadas com H₂O₂ e controle, submetidas ao alagamento

Nota: As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam dentro dos tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Com relação à atividade das enzimas antioxidantes nas folhas das plantas de soja alagadas, a atividade da SOD, assim como nas raízes, apresentou um comportamento semelhante entre os tratamentos. Entretanto, ao longo do tempo, a atividade dessa enzima reduziu-se aos 16 dias de estresse, aumentando aos 27 dias de alagamento, para ambos os tratamentos (Gráfico 5A). Quanto à APX, comparando-se os tratamentos, plantas- controle apresentaram maior atividade dessa enzima antes da imposição do estresse e aos 27 dias, quando comparadas às pré-tratadas. Houve um decréscimo da atividade da APX aos 16 dias, seguido de um aumento, aos 27 dias, em ambos os tratamentos (Gráfico 5B). A atividade da CAT foi sempre maior em plantas pré-tratadas do que em plantas- controle. Ao longo do tempo, houve a manutenção da atividade dessa enzima nas plantas do controle, enquanto as plantas pré-tratadas apresentaram maior atividade aos 16 dias de alagamento (Gráfico 5C).

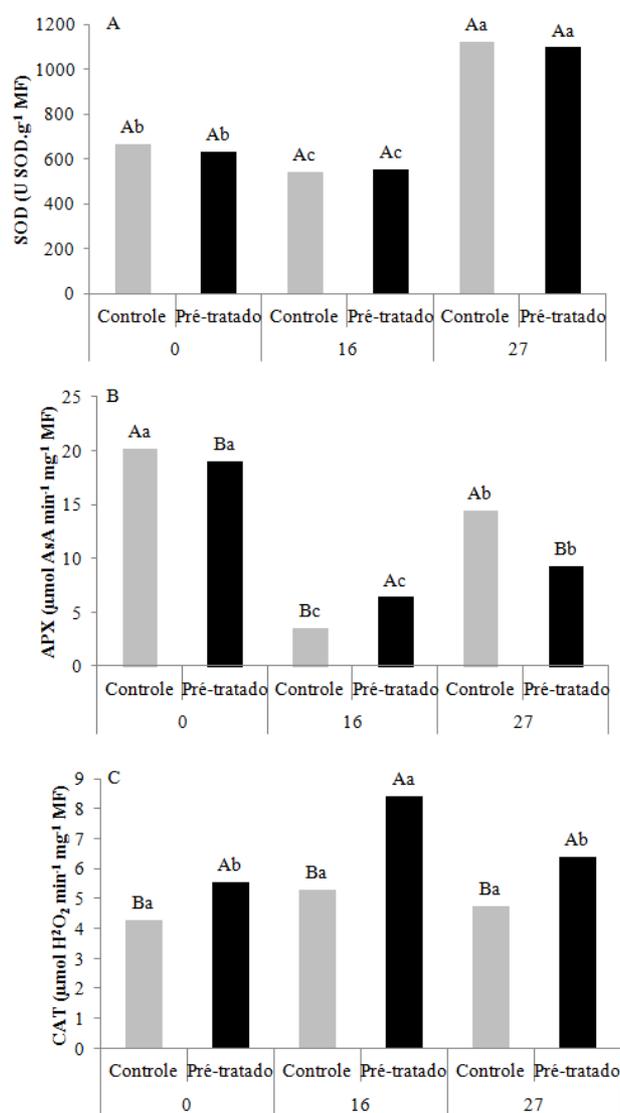


Gráfico 5 Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A), APX (B) e CAT (C) de folhas de plantas de soja, pré-tratadas com H₂O₂ e controle, submetidas ao alagamento

Nota: As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam dentro dos tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.5 Conteúdo de H₂O₂ e peroxidação lipídica

O conteúdo de H₂O₂ nas raízes foi maior em plantas-controle aos 27 dias, quando comparadas às pré-tratadas. Ao longo do tempo, observou-se que plantas- controle apresentaram um aumento nos níveis desse composto com o tempo de alagamento, o que não foi observado em plantas pré-tratadas (Gráfico 6A). A peroxidação lipídica foi menor em plantas pré-tratadas do que nas de controle até os 16 dias de alagamento, a partir de quando não houve diferença entre os tratamentos. Verificou-se que plantas-controle apresentaram uma redução da peroxidação ao longo do tempo, o que não foi observado para plantas pré-tratadas (Gráfico 6B).

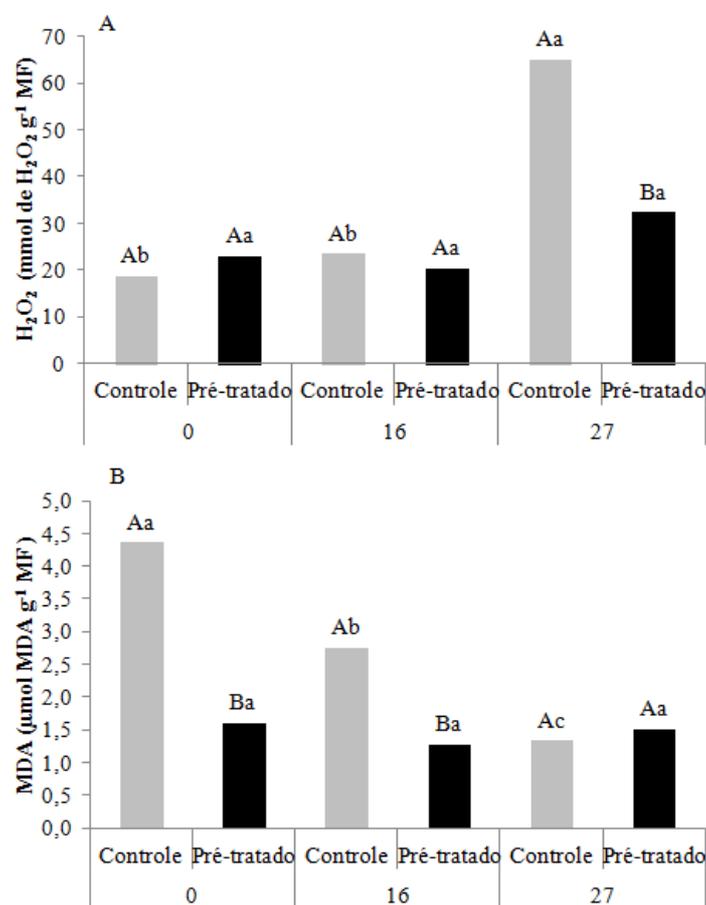


Gráfico 6 Conteúdo de H₂O₂ (A) e MDA (B) em raízes de plantas de soja, pré-tratadas com H₂O₂ e controle, submetidas ao alagamento

Nota: As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam dentro dos tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Para as folhas de soja alagadas, não houve diferença na quantidade de peróxido de hidrogênio entre os tratamentos. Ao longo do tempo, houve um acréscimo no conteúdo dessa molécula em ambos os tratamentos aos 16 dias, mantendo-se constante até os 27 dias de alagamento (Gráfico 7A). Antes da

imposição do estresse, plantas-controle apresentavam maior conteúdo de malondialdeído, porém após as plantas serem submetidas à condição de baixa disponibilidade de oxigênio, esse conteúdo foi semelhante entre os tratamentos. Com o decorrer dos dias de estresse, para plantas- controle observou-se uma redução da peroxidação lipídica, enquanto as pré-tratadas apresentaram um comportamento oposto (Gráfico 7B).

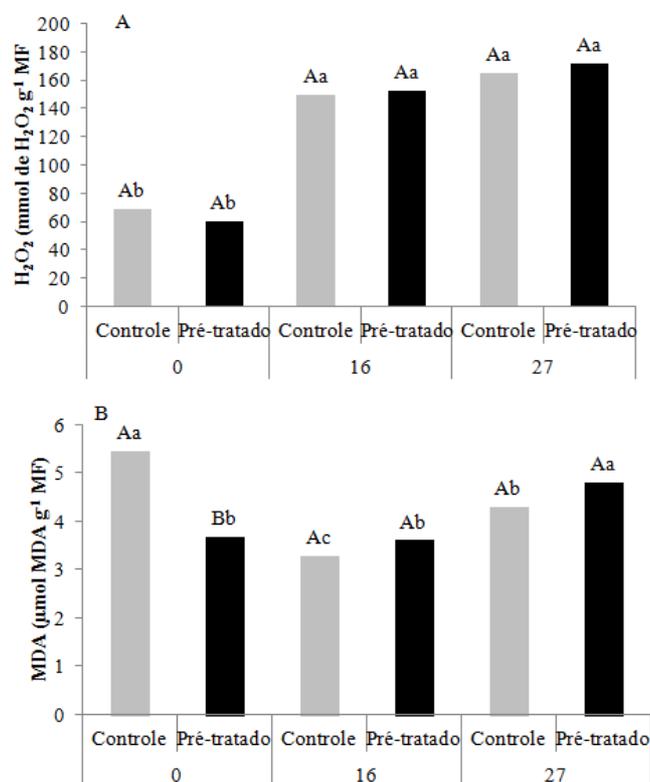


Gráfico 7 Conteúdo de H₂O₂ (A) e MDA (B) em folhas de plantas de soja, pré-tratadas com H₂O₂ e controle, submetidas ao alagamento

Nota: As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam dentro dos tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.6 Diâmetro de caule

O diâmetro do caule foi superior em plantas pré-tratadas após a imposição do estresse, sendo que, ao longo do tempo, aumentou em plantas de ambos os tratamentos (Gráfico 8).

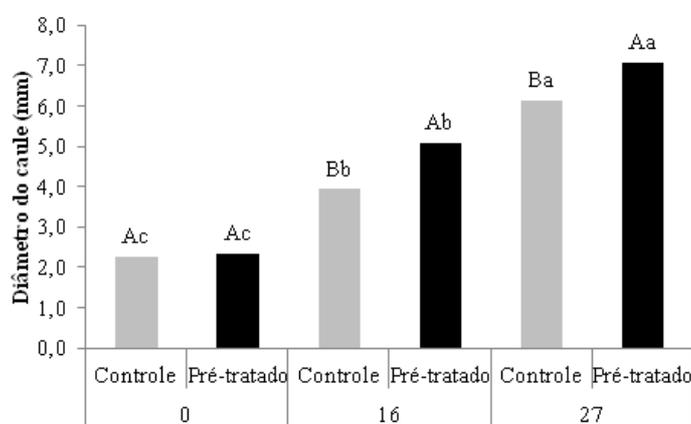


Gráfico 8 Diâmetro de caule de plantas de soja, pré-tratadas com H_2O_2 e controle, submetidas ao alagamento

Nota: As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam dentro dos tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Neste ensaio, verificou-se que o encharcamento acarretou, além de um aumento no diâmetro caulinar, o aparecimento de rachaduras no caule e de uma região esponjosa em plantas de ambos os tratamentos, conforme demonstrado na Figura 2A. Houve também a formação de raízes adventícias em ambos os tratamentos, entretanto as plantas que foram pré-tratadas apresentaram visualmente um maior número dessas raízes, conforme Figura 2B.

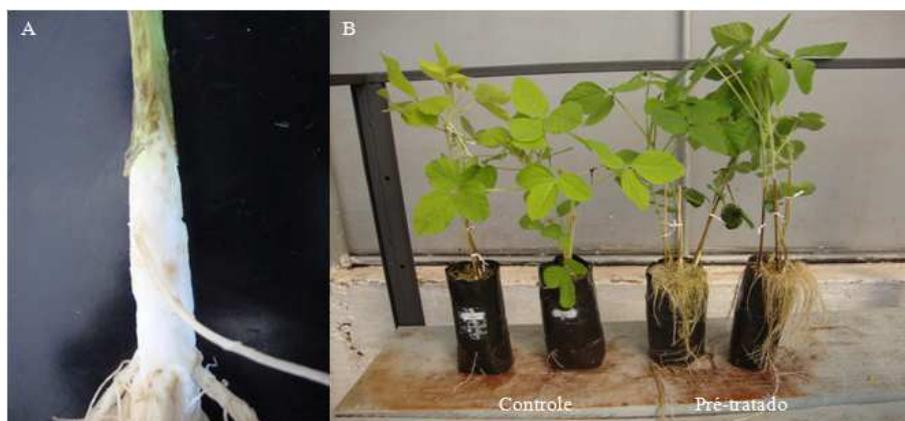


Figura 2 Caule evidenciando o aparecimento de rachaduras (A) e formação de raízes (B) em plantas de soja, pré-tratadas com H_2O_2 e controle, submetidas ao alagamento

Uma das primeiras respostas das plantas ao alagamento é a redução da condutância estomática (ASHRAF et al., 2011; FOLZER et al., 2006). Tal fato ocorre devido ao aumento do nível de ABA, que desencadeia um processo de sinalização para o fechamento dos estômatos (NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2002; VEAL; DAY; MORGAN, 2007). Nesse estudo, as plantas pré-tratadas com H_2O_2 apresentaram maior condutância estomática, quando comparadas com as controle, até os 16 dias de estresse e, nesse mesmo período apresentaram também maior taxa fotossintética. Contudo, embora a condutância estomática das plantas pré-tratadas tenha sido semelhante à das plantas-controle, aquelas mantiveram maior taxa fotossintética até aos 27 dias de alagamento.

O fechamento estomático pode ser um mecanismo de tolerância à inundação uma vez que, além de reduzir a demanda de água, reduz também a absorção de nutrientes, inclusive daqueles potencialmente tóxicos como o ferro e o manganês (JACKSON; DREW, 1984). Possivelmente, variações nos níveis hormonais provocadas pelo alagamento, principalmente aumento do ácido abscísico (ABA) e queda dos níveis de citocininas podem interferir no

movimento estomático e, conseqüentemente, na fixação de carbono (MIELKE et al., 2003).

O fechamento dos estômatos está diretamente relacionado com a fixação de carbono e com a produção de biomassa da planta (GONÇALVES et al., 2013). Embora as plantas pré-tratadas tenham apresentado maior taxa fotossintética durante todo o período experimental, somente aos 27 dias de estresse é que apresentaram maior incremento de massa seca na parte aérea, quando comparadas às controle. Em condições de alagamento, em que há menor disponibilidade de oxigênio, há a ocorrência do chamado “Efeito Pasteur”, que caracteriza a potencialização da glicólise e manutenção da via respiratória anaeróbica (SUMMERS; RATCLIFFE; JACKSON, 2000). Nessa situação, a planta mantém seu metabolismo em níveis basais, visando apenas à sobrevivência ao estresse (GREENWAY; GIBBS, 2003). Em decorrência dessa rota bioquímica, ocorre menor incorporação de biomassa pelas plantas, fato já relatado para soja (FANTE et al., 2010; LANZA; ROSSI; SODEK, 2013). Entretanto, os resultados do presente trabalho sugerem que o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio permitiu à planta tolerar melhor o estresse, culminando com maior investimento em crescimento da parte aérea, quando comparada à controle.

Wahid et al. (2007), trabalhando com plantas de trigo submetidas à salinidade, observaram que o pré-tratamento de sementes com H_2O_2 foi capaz de elevar os valores da taxa fotossintética e condutância estomática, em comparação com plantas não pré-tratadas. Gondim et al. (2011) e Li et al. (2011), trabalhando com milho e trigo, respectivamente, sob estresse salino verificaram que o pré-tratamento impediu o declínio na massa seca dessas plantas.

Uma das conseqüências do alagamento é a redução nos teores de clorofila (BARROS, 2004; LADYGIN, 2004; SILVA, 2009). Silva (2009) e

Thomas e Sodek (2005) verificaram que os teores de clorofila em soja foram reduzidos com o decorrer dos dias de inundação. Corroborando com esses resultados, houve a redução nos teores de clorofila “a”, “b” e total em plantas-controle, ao longo dos dias de estresse. Em contrapartida, o pré-tratamento permitiu a manutenção desses pigmentos durante esse mesmo período (Gráficos 3A, 3B, 3C). Gondim (2012) verificou maiores teores de clorofila, em plantas de milho pré-tratadas com H₂O₂ em relação à plantas controle, quando submetidas ao estresse salino. Neste estudo, entretanto, somente os teores de clorofila “a” foram maiores em plantas pré-tratadas.

Os teores de clorofila estão associados ao conteúdo de nitrogênio, que pode ser influenciado por condições ambientais como a deficiência de oxigênio, uma vez que esse estresse restringe a fixação de nitrogênio. Consequentemente, a eficiência fotossintética diminui em virtude da degradação (HUANG et al., 1994) ou redução na síntese de clorofilas (SENA-GOMES; KOZLOWSKI, 1988), devido ao acúmulo de etileno ou redução na síntese de citocininas (ISHIDA et al., 2002). Neste trabalho, embora a partir dos 16 dias de alagamento, os teores de clorofila total não tenham diferido entre os tratamentos (Gráfico 3C), plantas pré-tratadas apresentaram maior taxa fotossintética (Gráfico 1A) e maiores teores de carotenoides (Gráfico 3D) do que as plantas-controle. Isso sugere que possam existir outros fatores influenciando a eficiência fotossintética dessas plantas.

Carotenoides são pigmentos responsáveis pela fotoproteção das membranas fotossintéticas, atuando como pigmentos acessórios. Atuam também na dissipação do estado excitado da clorofila e neutralização de espécies reativas de oxigênio, uma vez que são antioxidantes de baixo peso molecular (KRESLAVSKI et al., 2013; SHARMA, 2012; YOUNG, 1991). Dessa maneira, a produção de carotenoides está ligada a mecanismos de proteção do aparato fotossintético, prevenindo a fotoinibição sob condições de estresse. Segundo

Young (1991), plantas estressadas realizam a síntese *de novo* da zeaxantina, um tipo de carotenoide, visando prevenir a fotoinibição. No presente estudo, o fato de as taxas fotossintéticas de plantas pré-tratadas terem sido mantidas superiores às das plantas- controle dos 16 aos 27 dias de estresse (Gráfico 1A), período em que os conteúdos de clorofila (Gráfico 3C) eram semelhantes entre os tratamentos, pode ser explicado pela quantidade de carotenoides (Gráfico 3D). O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio manteve os níveis de carotenoides nas plantas, permitindo que mantivessem sua fotossíntese, durante todo o período experimental. Por outro lado, as plantas-controle apresentaram um decréscimo na taxa de carotenoides ao longo dos dias de experimento, com menor fotossíntese.

A extensão do estresse oxidativo em uma célula também é determinada pela atividade das enzimas antioxidantes, que são importantes para o controle dos níveis de EROs. A atividade da SOD, para folhas e raízes, aumentou aos 27 dias de alagamento, demonstrando uma maior atuação do sistema antioxidante na dismutação dos íons superóxido. No entanto, a atividade dessa enzima não sofreu influência pelo pré-tratamento da semente (Gráficos 4A e 5A). Esses resultados estão de acordo com os de Gondim et al. (2010), que não verificaram diferença na atividade da SOD entre plantas de milho pré-tratadas com peróxido de hidrogênio e controle.

A operação da SOD gera H_2O_2 , necessitando da atuação das enzimas APX e CAT, que neutralizam esta molécula, formando produtos atóxicos à célula. Nesse caso, os dados revelaram que em soja pré-tratada, o sistema antioxidante agiu com eficiência, de modo que as enzimas atuaram em equilíbrio, ou seja, uma enzima subsequente (APX e CAT) remove o produto formado (H_2O_2) pela anterior (SOD).

A atividade da APX nas raízes foi induzida pelo pré-tratamento com H_2O_2 , com maiores valores no decorrer dos dias de estresse (Gráfico 4B),

enquanto a CAT apresentou, somente aos 27 dias de alagamento, maior atividade em plantas controle (Gráfico 4C). Esse comportamento das duas enzimas está diretamente relacionado com os níveis de peróxido de hidrogênio, que foram superiores nesse órgão em plantas- controle ao final do experimento. Isso se deve à afinidade diferenciada dessas duas enzimas pelo seu substrato, de modo que a APX, com sua alta afinidade, atua quando o H_2O_2 está presente em baixas concentrações e a CAT, por outro lado, tem comportamento inverso (GILL; TUTEJA, 2010). Tal fato explica a maior atividade da APX para plantas pré-tratadas e CAT para as plantas-controle.

As elevadas concentrações de H_2O_2 em raízes de plantas- controle, aos 27 dias de estresse, evidenciaram maior estresse oxidativo nessas plantas (Gráfico 6A). Por outro lado, a peroxidação lipídica foi maior em plantas controle somente até os 16 dias, não diferindo das plantas pré-tratadas aos 27 dias de alagamento (Gráfico 6B). Isso indica que o estresse oxidativo foi atenuado nas plantas- controle pela maior atividade da CAT. Estudos sobre o acúmulo de H_2O_2 em raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e beringela (*Solanum melongena*), sugerem que a neutralização do H_2O_2 é uma importante via para se adquirir tolerância contra o alagamento (LIN et al., 2004).

Em estudos com arroz (MORITA et al., 1999) e soja (LEE; KANG; OH, 1999), o pré-tratamento com H_2O_2 levou a um aumento significativo na expressão de genes e alteração nos níveis de transcritos da APX citosólica, demonstrando que a expressão do gene APX é regulada em resposta aos níveis celulares de H_2O_2 . Gondim et al. (2012) verificaram que a atividade da CAT está relacionada à aclimação ao estresse salino, em folhas de milho pré-tratadas com peróxido de hidrogênio.

Nas folhas, a atividade da APX, exceto aos 16 dias de estresse, foi maior nas plantas-controle (Gráfico 5B). Embora o pré-tratamento com H_2O_2 não tenha influenciado diretamente na redução dos danos da membrana lipídica, a maior

atividade da catalase em folhas, durante todo o período experimental pode ter atuado, juntamente com os carotenoides, na manutenção dos níveis de clorofila, pela neutralização das espécies reativas de oxigênio geradas em virtude do estresse. Assim sendo, a manutenção do aparato fotossintético operante nas plantas pré-tratadas resultou em maiores taxas fotossintéticas e maior incorporação de massa seca na parte aérea. De acordo com Gao et al. (2010), a maior atividade de enzimas antioxidantes em folhas de pepino pré-tratadas com peróxido de hidrogênio está relacionada à redução de danos ultraestruturais em cloroplastos.

O CAT apresentou maior atividade nas plantas pré-tratadas durante todo o período de experimento (Gráfico 5C). Em contrapartida, os níveis de peróxido de hidrogênio não diferiram entre controle e pré-tratadas, ao longo dos dias de estresse (Gráfico 7A). Danos oxidativos induzidos pelo excesso de água em soja são demonstrados em termos de acumulação de níveis de MDA, que é um produto formado durante a peroxidação lipídica (GILL; TUTEJA, 2010). Na peroxidação lipídica, os valores foram semelhantes entre os tratamentos durante o experimento, exceto antes da imposição do estresse, quando os maiores valores estavam no controle (Gráfico 7B). Contrastando com os resultados obtidos nesse estudo, Gao et al. (2010) e Gondim et al. (2012) verificaram que o pré-tratamento com H_2O_2 em plantas de pepino e milho, respectivamente, resultou em menores conteúdos de MDA.

Segundo Hernandez et al. (2010), plantas que apresentam maior atividade do sistema antioxidante são mais resistentes aos danos oxidativos. Isso foi verificado por Alves et al. (2013), que, em seu estudo com *Sesbania virgata*, espécie tolerantes ao alagamento, observou o aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante ao longo do estresse.

Ao avaliar o diâmetro do caule, verificou-se que plantas pré-tratadas apresentaram maiores valores que as controle a partir dos 16 dias de estresse

(Gráfico 8). Pires, Soprano e Cassol (2002) ao estudarem alterações morfofisiológicas de soja alagada, observaram que o diâmetro do caule é uma característica importante no que se refere à tolerância ao encharcamento, uma vez que com o seu aumento há o aparecimento de rachaduras na região submersa, hipertrofia e formação de uma região esponjosa na base do caule. Esse comportamento provavelmente está relacionado com o desenvolvimento de estruturas adaptativas de tolerância, como formação de vias alternativas para aumentar a aeração do sistema radicular. No presente estudo, os resultados corroboram com os de Pires, Soprano e Cassol (2002), com aparecimento das rachaduras e da região hipertrofica esponjosa em plantas controle e pré-tratadas (Figura 2A). No entanto, os caules das plantas pré-tratadas com peróxido de hidrogênio apresentaram maior hipertrofia, o que pode estar relacionado à maior aeração das raízes dessas plantas para manutenção do seu metabolismo (SHIMAMURA et al., 2010).

Nesta região, onde ocorre o aumento do diâmetro do caule devido às rachaduras, ocorre a formação de um tipo específico de aerênquima, o aerênquima secundário, estrutura que funciona como uma via de transporte de oxigênio do caule para as raízes. Além disso, no local ocorre a formação de raízes adventícias, que é uma alteração morfoanatômica característica de plantas ao encharcamento do solo (SHIMAMURA et al., 2010; YAMAUCHI et al., 2013). Como pode ser observado na Figura 2B, o pré-tratamento com H_2O_2 levou à formação de um maior número de raízes adventícias com relação às plantas- controle. Essas raízes especializadas têm a função de manter o abastecimento contínuo de água e minerais, quando o sistema básico não o fizer (MERGEMANN; SAUTER, 2000).

5 CONCLUSÃO

A maior atividade da catalase em folha, juntamente com maiores teores de carotenoides proporcionaram a manutenção dos níveis de clorofila, maiores taxas fotossintéticas em plantas pré-tratadas, o que culminou com maior acúmulo de massa seca na parte aérea dessas plantas. O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio também levou ao aparecimento de adaptações morfoanatômicas mais evidentes de hipertrofia do caule e maior formação de raízes adventícias.

O pré-tratamento com H_2O_2 desencadeou a tolerância de plantas de soja ao alagamento pela ativação de diferentes vias que atuaram conjuntamente, atenuando os efeitos do estresse prolongado nessas plantas e resultando em um melhor desempenho fisiológico. O peróxido de hidrogênio atuou como molécula sinalizadora para desencadear as respostas fisiológicas de plantas de soja submetidas ao alagamento.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S. et al. Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings. **Plant Science**, London, v. 169, p. 559-570, Aug. 2005.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, E.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, May 2002.
- ALVES, J. D. et al. Antioxidative responses and morpho-anatomical adaptations to waterlogging in *Sesbania virgata*. **Trees**, Berlin, v. 27, p. 717-728, June 2013.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639, June 1999.
- ASHRAF, M. A. et al. Alleviation of waterlogging stress in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by exogenous application of potassium in soil and as a foliar spray. **Crop Pasture Science**, Victoria, v. 62, n. 1, p. 25-38, Mar. 2011.
- AZEVEDO NETO, A. D. et al. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 162, p. 1114-1122, Oct. 2005.
- BARROS, E. C. **Características fisiológicas de plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] sob condições de deficiência de oxigênio**. 2004. 33 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, 2004.
- BIEMELT, S. et al. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 651-658, Feb. 1998.
- BIENERT, G. P.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1758, p. 994-1003, Aug. 2006.

- BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. V. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppl.2010.138.issue-4/issuetoc> 139, n. 4, p. 447-462, Apr. 2010.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, n. 2, p. 179-194, Feb. 2003.
- BORELA, J. et al. Atividade de enzimas fermentativas em raízes e nódulos de soja sob condições de hipóxia e pós-hipóxia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 6, p. 970-977, jun. 2013.
- BREUSEGEM, F. van et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Clare, v. 161, p. 405-414, Aug. 2001.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation methods. **Enzymology**, San Diego, v. 52, p. 302-310, Feb. 1978.
- CAVALCANTI, F. R. et al. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, Hoboken, v. 163, n. 3, p. 563-571, Sept. 2004.
- COSTA, J. A. **Cultura da soja**. Porto Alegre. Evangraf, 1996. 233 p.
- DAT, J. et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Science**, Boston, v. 57, p. 779-795, May 2000.
- DESIKAN, R.; HANCOCK, J. T.; NEILL, S. J. Oxidative stress signaling. **Top Current Genetics**, Wageningen, v. 4, p. 129-149, May 2003.
- DEUNER, S. et al. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Ceres**, Viçosa, MG, v. 55, n. 2, p. 135-140, 2008.
- FANTE, C. A. et al. Respostas fisiológicas los cultivares de soja submetidas ao alagamento em diferentes estádios. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 2, p. 249-252, 2010.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

- FOLZER, H. et al. Response to flooding of sessile oak: an integrative study. **Tree Physiology**, Oxford, v. 26, p. 759-766, June 2006.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 1866-1875, July 2005.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 119, p. 355-364, Nov. 2003.
- GAO, Y. et al. Hydrogen peroxide pretreatment alters the activity of antioxidant enzymes and protects chloroplast ultrastructure in heat-stressed cucumber leaves. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 126, p. 20-26, Aug. 2010.
- GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**, Abingdon, v. 143, n. 1, p. 81-96, Apr. 2009.
- GECHEV, T. S. et al. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Boston, v. 59, p. 708-714, Apr. 2002.
- GECHEV, T. S. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays**, Cambridge, v. 28, p. 1091-1101, Nov. 2006.
- GECHEV, T. S.; HILLE, J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 168, p. 17-20, Jan. 2005.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rochville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, p. 909-930, Dec. 2010.
- GONÇALVES, J. F. C. et al. Crescimento, partição de biomassa e fotossíntese em plantas jovens de *Genipa spruceana* submetidas ao alagamento. **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 2, p. 193-200, abr./jun. 2013.

- GONDIM, F. A. **Pré-tratamento foliar com H₂O₂ como estratégia para minimizar os efeitos deletérios da salinidade em plantas de milho**. 2012. 147 p. Tese (Doutorado Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- GONDIM, F. A. et al. Efeitos do H₂O₂ no crescimento e acúmulo de solutos em plantas de milho sob estresse salino. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 42, n. 2, p. 371-381, mar./abr. 2011.
- GONDIN, F. A. et al. Pretreatment with H₂O₂ in maize seeds: effects on germination and seedling acclimation to salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 22, n. 2, p. 103-112, July 2010.
- GONG, M. et al. Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H₂O₂. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 158, n. 9, p. 1125-1130, Sept. 2001.
- GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 32, n. 6, p. 481-494, June 2005.
- GREENWAY, H.; GIBBS, J. Mechanism of anoxia tolerance in plants: I., growth, survival and anaerobic catabolism. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 30, n. 3, p. 353-353, Mar. 2003.
- HARDIN, S. C. et al. Coupling oxidative signals to protein phosphorylation via methionine oxidation in Arabidopsis. **Biochemical Journal**, London, v. 422, p. 305-312, Aug. 2009.
- HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.
- HENZLER, T.; STEUDEL, E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 353, p. 2053-2066, Dec. 2000.
- HERNANDEZ, M. et al. A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 2, p. 521-535, 2010.

HUANG, B. et al. Root and shoot growth of wheat genotypes in response to hypoxia and subsequent resumption of aeration. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 5, p. 1538-1544, Nov. 1994.

INZÉ, D.; VAM, M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 6, n. 2, p. 153-158, 1995.

ISHIDA, F. Y. et al. Efeitos da Inundação parcial e total sobre o crescimento, teor de clorofila e fluorescência de *Setaria anceps* e *Paspalum repens*. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1152-1159, nov./dez. 2002.

JACKSON, M.; DREW, M. Effects of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants. In: KOZLOWSKI, T. (Ed.). **Flooding and plant growth**. London: Academic, 1984. p. 47-128.

KAUSAR, R. et al. Characterization of ascorbate peroxidase in soybean under flooding and drought stresses. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 12, p. 10573-10579, Dec. 2012.

KOMATSU, S.; HIRAGA, S.; YANAGAWA, Y. Proteomics techniques for the development of flood tolerant crops. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 11, n. 1, p. 68-78, Jan. 2012.

KRESLAVSKI, V. D. et al. Molecular mechanisms of stress resistance of photosynthetic machinery. In: ROUT, G. R.; DAS, A. B. (Ed.). **Molecular stress physiology of plants**. New Delhi: Springer, 2013. p. 21-51.

LADYGIN, V. G. The effect of root hypoxia and iron deficiency on the photosynthesis, biochemical composition, and structure of pea chloroplasts. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 51, n. 1, p. 28-40, Jan. 2004.

LANZA, L. N. M.; ROSSI, S. C.; SODEK, L. Adubação nitrogenada beneficia soja alagada. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 1, p. 2-9, jan./mar. 2013.

LEE, S. C.; KANG, B. C.; OH, S. E. Induction of ascorbate peroxidase by ethylene and hydrogen peroxide during growth of culture soybean cells. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 9, n. 2, p. 166-171, 1999.

LI, C. et al. Waterlogging pretreatment during vegetative growth improves tolerance to waterlogging after anthesis in wheat. **Plant Science**, Clare, v. 180, n. 5, p. 672-678, May 2011.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMAN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E. et al. (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**. Davis: J. Wiley, 2001. p. F4.3.1-F4.3.8.

LIN, K. H. R. et al. Study of the root antioxidative system of tomatoes and eggplants under waterlogged conditions. **Planta Science**, Clare, v. 167, p. 355-365, Aug. 2004.

MANO, S. et al. Stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases are produced by alternative splicing in pumpkin. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 413, n. 1, p. 21-26, Aug. 1997.

MERGEMANN, H.; SAUTER, M. Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 124, p. 609-614, Oct. 2000.

MIELKE, M. S. et al. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Genipa americana* seedlings to soil flooding. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 50, p. 221-231, Dec. 2003.

MILLER, G.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signalling and abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, Gerorgetown, v. 133, p. 481-489, Feb. 2008.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MITTLER, R. et al. ROS signaling: the new wave? **Trends Plant Science**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 300-309, June 2011.

MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 561-591, June 2001.

MORITA, S. et al. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress: the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 417-422, Feb. 1999.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, Aug. 1981.

NANJO, Y. et al. Comparative proteomic analysis of early-stage soybean seedlings response to flooding by using gel and gel-free techniques. **American Chemical Society**, Washington, v. 9, n. 8, p. 3989-4002, Aug. 2010.

NEILL, S. J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 388-395, Oct. 2002.

NEILL, S. J. et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1237-1247, May 2002.

PETROV, V. D.; BREUSEGEM, F. van. Hydrogen peroxide: a central hub for information flow in plant cells. **AoB Plants**, Oxford, v. 2012, p. 1-13, 2012.

PIRES, J. L. F.; SOPRANO, E.; CASSOL, B. Adaptações morfofisiológicas de soja em solo inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 1, p. 41-50, jan. 2002.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway on chloroplasts by metabolic modeling: computer simulations as a step towards flux analysis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 1, p. 445-462, May 2001.

PRASAD, T. K. et al. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 65-74, Jan. 1994.

QUAN, L. et al. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, Victoria, v. 50, p. 2-18, Jan. 2008.

RUTSCHOW, H. L.; BASKIN, T. I.; KRAMER, E. M. Regulation of solute flux through plasmodesmata in the root meristem. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 155, p. 1817-1826, Apr. 2011.

SASAKI, K. et al. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves and its constituents increase the activities of xenobiotic-metabolizing enzymes in mouse liver. **Journal of Medicinal Food**, New York, v. 8, p. 184-189, July 2005.

SENA-GOMES, A. R.; KOZLOWSKI, T. T. Physiological and growth responses to flooding of seedling of *Hevea brasiliensis*. **Biotropica**, Washington, v. 20, p. 286-293, Dec. 1988.

SHARMA, P. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, Georgetown, v. 2012, p. 1-26, Feb. 2012.

SHI, F. et al. Cytosolic ascorbate peroxidase 2 (cAPX 2) is involved in the soybean response to flooding. **Phytochemistry**, London, v. 69, n. 6, p. 1295-1303, Apr. 2008.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1305-1319, May 2002.

SHINAMURA, S. et al. Stem hypertrophic lenticels and secondary aerenchyma enable oxygen transport to roots of soybean in flooded soil. **Annals of Botany**, Oxford, v. 106, n. 2, p. 277-284, Aug. 2010.

SILVA, R. N. **Características fisiológicas e bioquímicas de plantas de soja [*Glycine max* (L.) merrill] sob condições de hipoxia**. 2009. 96 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

SLESIAK, I. et al. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 54, p. 39-50, Feb. 2007.

STEFFENS, B.; STEFFENS-HEINZ, A.; SAUTER, M. Reactive oxygen species mediate growth and death in submerged plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 1-7, June 2013.

SUMMER, J. E.; RATCLIFFE, R. G.; JACKSON, M. B. Anoxia tolerance in the aquatic monocot *Potamogeton pectinatus*: absence of oxygen stimulates elongation in association with an unusually large Pasteur effect. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 349, p. 1413-1422, Aug. 2000.

THOMAS, A. L.; SODEK, L. Development of the nodulated soybean plant after flooding of the root system with different sources of nitrogen. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, p. 291-297, July/Sept. 2005.

UCHIDA, A. et al. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Science**, Clare, v. 163, p. 515-523, Sept. 2002.

VEAL, E. A.; DAY, A. M.; MORGAN, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 26, p. 1-14, Apr. 2007.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, Clare, v. 151, n. 1, p. 59-66, Feb. 2000.

VRANOVÁ, E. et al. Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 16, p. 10870-10875, Aug. 2002.

YAMAUCHI, T. et al. Aerenchyma formation in crop species: a review. **Field Crops Research**, Amsterdam, 2013. In press.

YOUNG, A. J. The photoprotective role of carotenoids in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, n. 4, p. 702-708, Dec. 1991.

WAHID, A. et al. Pretreatment of seed with H₂O₂ improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 164, n. 3, p. 283-294, Mar. 2007.