



KAMILA REZENDE DÁZIO DE SOUZA

**APLICAÇÃO EXÓGENA DE PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO E SACAROSE E TOLERÂNCIA
DE GENÓTIPOS DE SOJA AO EXCESSO DE
MANGANÊS**

LAVRAS – MG

2014

KAMILA REZENDE DÁZIO DE SOUZA

**APLICAÇÃO EXÓGENA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E
SACAROSE E TOLERÂNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA AO EXCESSO
DE MANGANÊS**

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

Orientador

Dr. José Donizeti Alves

LAVRAS – MG

2014

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

Souza, Kamila Rezende Dázio de.

Aplicação exógena de peróxido de hidrogênio e sacarose e
tolerância de genótipos de soja ao excesso de manganês / Kamila
Rezende Dázio de Souza. – Lavras : UFLA, 2014.

74 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: José Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. *Glycine max*. 2. Pré-tratamento s. 3. Peróxido de hidrogênio. 4.
Sacarose. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.348

KAMILA REZENDE DÁZIO DE SOUZA

**APLICAÇÃO EXÓGENA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E
SACAROSE E TOLERÂNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA AO EXCESSO
DE MANGANÊS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doutor

APROVADA em 15 de agosto de 2014.

| | |
|---|-----------------------|
| Dr. Paulo César Magalhães | EMBRAPA Milho e Sorgo |
| Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart | UNILAVRAS |
| Dr. Fabrício José Pereira | UFLA |
| Dr. Marcelo Polo | UNIFAL-MG |

Dr. José Donizeti Alves
Orientador

LAVRAS – MG

2014

Àquele que contava os dias e as horas para
me rever, mas teve que partir, de repente,
sem ao menos me dizer adeus...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, cuja providência está presente em cada pequeno detalhe de minha vida, protegendo-me, amparando e me guiando.

À minha família, pelo amor incondicional e pelo apoio em todos os momentos desta caminhada acadêmica.

À minha mãe, por tanto amor e pelo exemplo de força e fé.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade e por oferecer as instalações para a realização deste trabalho.

À FAPEMIG, pelo financiamento e ao CNPq, pelo financiamento e pela oportunidade de estágio sanduíche.

Ao Setor de Fisiologia Vegetal e aos professores, por todas as oportunidades oferecidas e pela contribuição em meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador, Prof. Jose Donizeti Alves, pela confiança, pelos ensinamentos e pelo apoio durante os meus estudos de mestrado e doutorado.

Aos membros da banca examinadora que, gentilmente, aceitaram contribuir com este trabalho.

À The Ohio State University, pelo acolhimento para o estágio sanduíche, no Laboratory of Soybean Genetics and Breeding.

À Dr^a. Leah McHale, pela oportunidade de aprendizado e aperfeiçoamento profissional.

Aos colegas e amigos do McHale's Lab, pela ajuda e pelos bons momentos de convívio.

Aos Roots, a minha família norte-americana, por todo apoio e pelos momentos tão agradáveis que me proporcionaram. Serei eternamente grata pela bondade e acolhimento de vocês.

Aos amigos brasileiros que foram a minha família e que estiveram ao meu lado em todos os momentos, apoiando -me, confortando-me e também comemorando.

À Amélia, um anjo que Deus colocou em minha vida, pela amizade.

Aos meus amigos, que suportaram a distância, a falta de tempo e as minhas ausências.

Às minhas grandes amigas Amanda, Carla e Fabiane, companheiras de jornada, que sempre estiveram próximas, apesar da distância. Ao Leandro Lino, por fazer parte de minha vida.

Aos colegas da Fisiologia Vegetal, pela convivência e por momentos de descontração.

Aos meus amigos Michele, Jean, Marinês, Tânia, Marília Mércia, Marília Carvalho, Paulo Augusto, Nádia, Christiane, Brenda, por tornarem meus dias mais felizes em Lavras.

Ao Jean pela valiosa ajuda.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, pelo convívio diário, pelos bons momentos vividos e, principalmente, pela ajuda na condução do experimento e nas análises laboratoriais.

Ao André, amor que Deus me deu de presente, pela amizade e companheirismo.

ALena, Joel, Odorêncio, Barrinha, Emanuelle, Daniela e Tanhan, pelo convívio e pela disponibilidade em ajudar sempre.

A todas as pessoas que participaram de qualquer etapa deste trabalho, gratidão!

RESUMO

Investigou-se a relação entre a tolerância ao alagamento e ao excesso de manganês, assim como o efeito dos pré-tratamentos com peróxido de hidrogênio e sacarose na tolerância de genótipos de soja ao excesso de manganês. Para tanto, plantas de soja dos genótipos BRS Taura RR, BMX Apolo RR e AN 8500, em estágio V1, foram transferidas para a solução nutritiva e aclimatadas, por um período de 21 dias. Em seguida, as plantas foram submetidas a quatro tratamentos: normal Mn, excesso Mn, pré-tratamento com H₂O₂ 10 mM por seis horas, seguido de excesso de manganês, pré-tratamento com sacarose 90 mM por seis horas, seguido de excesso de manganês. As concentrações de manganês foram 2 µM, para o tratamento com concentração normal e 1 mM, para o excesso e o pH da solução nutritiva foi 4,5. Após 15 dias de tratamento, quando as plantas se encontravam em V5, foram realizadas as coletas. Avaliou-se a intensidade de sintomas de toxicidade por manganês, acúmulo de massa seca, atividade das enzimas do sistema antioxidante, níveis de ascorbato, peróxido de hidrogênio, teor de pigmentos fotossintéticos, parâmetros ecofisiológicos e quantificação de manganês. Verificou-se uma relação entre tolerância dos genótipos ao alagamento e ao excesso de manganês. BRS Taura RR apresentou respostas fisiológicas típicas de plantas sensíveis ao estresse, enquanto BMX Apolo RR e AN 8500, que se comportaram de maneira semelhante, apresentaram respostas típicas de plantas tolerantes ao estresse. Enquanto o peróxido de hidrogênio teve maior efetividade na promoção de respostas adaptativas nos genótipos BMX Apolo RR e AN 8500, a sacarose foi mais eficiente para o genótipo BRS Taura RR.

Palavras-chave: *Glycine max*. Pré-tratamento. Peróxido de hidrogênio. Sacarose

ABSTRACT

We investigated the relationship between the tolerance to waterlogging and manganese excess, and the effects of the pretreatments with hydrogen peroxide and sucrose in the tolerance of soybeans genotypes to manganese excess. For this, plants of soybeans from BRS Taura RR, BMX Apolo RR and AN 8500 genotypes in V1 stage were transferred to nutrient solution and were acclimated for 21 days. Then, plants were submitted to four treatments: normal Mn, Mn excess, 10 mM H₂O₂ pretreatment for six hours followed by manganese excess, 90 mM sucrose pretreatment for six hours followed by hypoxia with manganese excess. Manganese concentrations were 2 µM for hypoxia and 1 mM for manganese excess treatments and the pH of the nutrient solutions was set for 4.5. After 15 days of treatment, plants that were in V5 stage were harvested for the analysis. We evaluated the intensity of manganese toxicity symptoms, dry matter, activity of antioxidant enzymes, ascorbate and hydrogen peroxide levels, photosynthetic pigments, ecophysiological parameters and manganese quantification. There was a relationship between the tolerance of the genotypes to waterlogging and manganese excess. BRS Taura RR showed physiological responses that are typical of stress sensitive plants, while BMX Apolo RR and AN 8500 had a similar behavior under stress, with typical tolerant responses to manganese excess. Hydrogen peroxide pretreatment was more effective in promoting adaptive responses in BMX Apolo RR and AN 8500, while sucrose was more efficient for BRS Taura RR.

Keywords: *Glycine max.* Pretreatment. Hydrogen peroxide. Sucrose

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 12 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.1 | Intensidade de sintomas | 21 |
| 3.2 | Acúmulo de massa seca | 22 |
| 3.3 | Análises bioquímicas | 22 |
| 3.3.1 | Atividade das enzimas do sistema antioxidante | 22 |
| 3.3.2 | Quantificação de ascorbato | 23 |
| 3.3.3 | Quantificação de peróxido de hidrogênio | 24 |
| 3.3.4 | Quantificação de pigmentos fotossintéticos | 24 |
| 3.4 | Trocas gasosas | 24 |
| 3.5 | Análises de quantificação de manganês | 25 |
| 3.6 | Delineamento experimental e análise estatística | 25 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 4.1 | Caracterização visual dos sintomas de toxicidade por excesso de manganês | 27 |
| 4.2 | Quantificação de manganês | 34 |
| 4.3 | Análises bioquímicas e fisiológicas | 43 |
| 5 | CONCLUSÃO | 65 |
| | REFERÊNCIAS | 66 |

1 INTRODUÇÃO

O manganês é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, uma vez que participa de diversos processos fisiológicos, tais como: fotossíntese, respiração, ativação enzimática, dentre outros. Apesar de sua importância para o vegetal, elevadas concentrações desse elemento podem ser tóxicas, comprometendo a produção.

A absorção de manganês é aumentada em solos ácidos e alagados, pois em decorrência das alterações de pH, potencial redox e potencial eletroquímico, há maior disponibilidade da forma Mn^{+2} , que é absorvida pelas raízes. Elevadas concentrações de Mn nas plantas alteram a homeostase celular, refletindo em alteração da atividade enzimática e maior geração de espécies reativas de oxigênio, dentre outras. Os distúrbios fisiológicos, em virtude do excesso de manganês, causam sintomas como clorose marginal, pontoações marrons, encarquilhamento, engruvinhamento e necrose em folhas, assim como redução do crescimento e escurecimento das raízes. No entanto, existe uma variabilidade intra e interespecífica quanto à toxicidade desse elemento em plantas.

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) constitui uma cultura de grande importância econômica no Brasil e é produzida em solos ácidos. Essa cultura está sendo introduzida no sul do país em solos sujeitos ao alagamento, em consórcio com arroz, visando a maior utilização dos solos. Existem cultivares identificadas como tolerantes ao alagamento e que são indicadas para plantio nas áreas sujeitas ao excesso de água. No entanto, em razão da relação entre a tolerância ao alagamento e ao excesso de manganês, o conhecimento acerca das respostas fisiológicas de plantas de soja ao excesso de manganês podem auxiliar no desenvolvimento de novas cultivares tolerantes a essas condições.

O uso de substâncias exógenas pode auxiliar na indução de tolerância a estresses bióticos e abióticos. Dessa maneira, o pré-tratamento das plantas pode

ser uma alternativa para o aumento da tolerância de cultivares de soja ao excesso de manganês. Tendo-se em vista os efeitos benéficos dos pré-tratamentos, com a aplicação exógena de H_2O_2 e sacarose e a inexistência de trabalhos, relacionando-os com a tolerância ao estresse por manganês, surge a oportunidade de estudar a ação desses pré-tratamentos na indução de tolerância ao excesso desse elemento. Assim sendo, investigou-se a relação entre a tolerância ao alagamento e ao excesso de manganês, assim como o efeito dos pré-tratamentos com peróxido de hidrogênio e sacarose na tolerância de genótipos de soja ao excesso de manganês.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O manganês é um metal e um micronutriente essencial para a sobrevivência, crescimento e produção das plantas (MARSCHNER, 1995). Está envolvido em muitos mecanismos bioquímicos e fisiológicos nas plantas, desde fotossíntese, respiração, atividade enzimática, ativação hormonal, síntese de aminoácidos, síntese de compostos secundários e assimilação do nitrato (FÜHRS et al., 2012; EL JAOUAL; COX, 1998; MILLALEO et al., 2010; MILLALEO et al., 2013; MUKHOPADHYAY; SHARMA, 1991).

Apesar de sua importância no metabolismo vegetal, a quantidade de Mn requerida pelas plantas é baixa, por se tratar de um micronutriente. Dessa maneira, a capacidade de absorção desse elemento facilmente pode ultrapassar a quantidade necessária. O Mn é rapidamente transportado das raízes via xilema para a parte aérea, mas raramente é transportado pelo floema (MILLALEO et al., 2010). O manganês tende a ser acumulado em cloroplastos, vacúolos, retículo endoplasmático e, até mesmo, no complexo de Golgi para ser excretado das células. Diferentes transportadores de Mn já foram identificados e suas funções estão relacionadas ao transporte desse elemento para os diferentes compartimentos celulares (WILLIAMS; PITTMAN, 2010).

Embora tenha inúmeras funções fisiológicas para o metabolismo vegetal, o manganês em excesso pode causar distúrbios fisiológicos aos vegetais. O Mn é absorvido pelas plantas na sua forma reduzida (Mn^{+2}), que está em maior disponibilidade em solos ácidos, permitindo que haja maior absorção do mesmo pelas raízes, levando ao seu acúmulo. Também, em solos inundados, há alteração no pH, potencial redox e condutividade elétrica, disponibilizando, dentre outros elementos, o Mn^{+2} para as raízes (CAMARGO; SANTOS; ZONTA, 1999).

Solos ácidos são típicos de regiões tropicais, em que há elevada produção de grãos, caracterizadas por vastas extensões de cultivo no mundo. Paralelamente, solos alagados também podem ocorrer em diferentes regiões, onde é crescente a prática de cultivo de diferentes espécies vegetais visando, principalmente, à produção de alimentos. No entanto, como o excesso de Mn é tóxico para a maioria dos vegetais, a sensibilidade às elevadas concentrações desse elemento pode ser um fator limitante para a produção vegetal. O excesso de Mn interfere na absorção e disponibilidade de outros elementos, tais como: ferro, cálcio, magnésio, zinco e cobre (KOVÁČIK et al., 2014; LEI; KORPELAINEN; LI, 2007; TEWARI; KUMAR; SHARMA, 2013), o que pode agravar, ainda mais, os sintomas em casos de estresse. Assim, a tolerância ao excesso de manganês, assim como ao excesso de alumínio e ferro está relacionada à maior sobrevivência de plantas em solos ácidos (KHABAZ-SABERI et al., 2010), refletindo em uma maior produção (KHABAZ-SABERI; BARKER; RENGEL, 2011).

O excesso de Mn altera a atividade de diferentes enzimas, desde aquelas cujo elemento atua como cofator enzimático (SRIVASTAVA; DUBEY, 2010), até aquelas relacionadas a processos fisiológicos afetados pelo excesso de Mn. Está relacionado à degradação de clorofilas (REZAI; FARBOODNIA, 2008; ZENGIN, 2013) e redução na fotossíntese (LI et al., 2010b; MILLALEO et al., 2013), maior geração de espécies reativas de oxigênio (LEI; KORPELAINEN; LI, 2007; SRIVASTAVA; DUBEY, 2012), alteração na permeabilidade de membrana (LEI; KORPELAINEN; LI, 2007; LIU et al., 2010a; MORA et al., 2009), redução do crescimento (SRIVASTAVA; DUBEY, 2010) e distúrbio da homeostase celular de modo geral (SHARMA; DIETZ, 2009).

Quando em altas concentrações, o Mn pode levar ao aumento do diâmetro das raízes, redução dos espaços celulares, em razão da vacuolização, desorganização dos tecidos de folhas, espessamento do mesofilo, aumento no

tamanho dos cloroplastos (LAVRES JUNIOR et al., 2008). Os sintomas visuais característicos são manchas cloróticas, clorose marginal, necrose e manchas marrons em folhas, assim como manchas marrons nas raízes (FOY; CHANEY; WHITE, 1978; HEENAN; CARTER, 1976; LAVRES JUNIOR et al., 2008). Ocorre, também, menor biomassa, menor crescimento de raízes e parte aérea, menor produção vegetal e redução na densidade radicular (MOU et al., 2011; OHKI, 1976; OJO; BELLO; ADEYEMO, 2010).

Existem variações genótípicas para as respostas ao excesso de manganês, em diversas espécies, tais como *Populus cathayana* (LEI; KORPELAINEN; LI, 2007), *Lolium perenne* (MORA et al., 2009), *Triticum aestivum* (KHABAZ-SABERI; RENGEL, 2010) e *Glycine Max* (CARTER; ROSE; READING, 1975; LAVRES JUNIOR et al., 2008). Assim sendo, há variação de sensibilidade entre e dentro das espécies vegetais, refletindo na intensidade dos sintomas e nas respostas fisiológicas das plantas ao excesso de Mn.

Com relação às repostas dos genótipos ao excesso de Mn, em geral há redução na fotossíntese e na condutância estomática (LI et al., 2010b). Apresentam alteração na atividade das enzimas antioxidantes (LI et al., 2010b; LIU et al., 2010a; SHI et al., 2006) e nos antioxidantes não-enzimáticos (LIU et al., 2010b; ZENGIN, 2013), além de maior produção de substâncias osmoticamente ativas (LI et al., 2010b; TEWARI; KUMAR; SHARMA, 2013; ZENGIN, 2013) e de hormônios vegetais (LEI; KORPELAINEN; LI, 2007). Dependendo da dose de manganês utilizada, pode haver promoção da atividade das enzimas do sistema antioxidante e das repostas para a manutenção da homeostase. Entretanto, concentrações mais elevadas podem reduzir a atividade dessas enzimas, que juntamente com a maior geração de EROs, causam maiores danos à membrana plasmática (LIU et al., 2010a).

Genótipos tolerantes ao excesso de manganês, quando submetidos ao alagamento, apresentam menores concentrações desse nutriente do que genótipos sensíveis (KHABAZ-SABERI; RENGEL, 2010; LEI; KORPELAINEN; LI, 2007). Essa menor absorção, pode ocorrer, em decorrência de uma maior extrusão de ácidos orgânicos na rizosfera, que formam complexos com Mn^{+2} evitando a entrada do mesmo nas raízes (MORA et al., 2009).

Muito se tem estudado sobre a tolerância ao excesso de manganês em diferentes espécies, tais como *Phaseolus vulgaris* (ZENGIN, 2013), *Vigna unguiculata* (FECHT-CHRISTOFFERS; MAIER; HORST, 2003), *Vitis vinifera* (MOU et al., 2011), *Cucumis sativus* (SHI et al., 2005), *Oryza sativa* (SRIVASTAVA; DUBEY, 2010) culturas que estão sujeitas a solos ácidos. No caso de *Glycine max*, diversos estudos já foram realizados com relação ao excesso de Mn (CARTER; ROSE; READING, 1975; HEENAN; CARTER, 1976; HEENAN; CARTER, 1977; LAVRES JUNIOR et al., 2008; MASCARENHAS et al., 1985; OHKI, 1976; SULLIVAN et al., 2001). Existe uma variação intraespecífica para a tolerância de soja ao excesso de manganês (CARTER; ROSE; READING, 1975; HEENAN; CARTER, 1976; LAVRES JUNIOR et al., 2008), sendo esta uma característica que pode ser herdada (BROWN; DEVINE, 1980).

No Brasil, o plantio da soja está se expandindo para áreas de várzea, em que há o consórcio com a cultura do arroz (PIRES; SOPRANO; CASSOL, 2002). As áreas de plantio estão se expandindo anualmente e têm apresentado elevada produtividade, de modo que a estimativa de área de plantio de soja em rotação com o arroz para a safra 2013/2014 foi de 296.442 mil hectares, uma área 9% maior, em relação à safra anterior (INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ, 2013). Diante dessa expansão no cultivo da soja, há a necessidade de cultivares que sejam próprias a essas áreas, por tolerarem, por exemplo,

condições de baixa disponibilidade de oxigênio. Em decorrência da relação entre tolerância ao excesso de manganês e ao alagamento, o conhecimento acerca das respostas das cultivares ao excesso de manganês pode auxiliar no desenvolvimento de novas cultivares para plantio nessas áreas.

Na tentativa de aumentar a tolerância de diferentes espécies ao excesso de manganês, pré-tratamentos ou aplicação de compostos tem sido realizados. A aplicação de ácido ascórbico aumentou a tolerância de plantas ao manganês pelo aumento do conteúdo de clorofila, das taxas fotossintética e transpiratória, maior atividade das enzimas do sistema antioxidante e maiores níveis de prolina. Com isso, houve menor geração de H_2O_2 , menor peroxidação lipídica e maior crescimento (PARASHAR et al., 2014).

O óxido nítrico (NO) é outro composto que é utilizado no aumento da tolerância ao manganês, uma vez que reduz a geração de H_2O_2 e a peroxidação lipídica, assim como reduz a atividade das enzimas antioxidantes para níveis mais baixos (SRIVASTAVA; DUBEY, 2012). NO exógeno, aumentou a tolerância das plantas de camomila ao excesso de Mn pela redução do estresse oxidativo (KOVÁČIK et al., 2014).

A aplicação de silício em plantas sob excesso de manganês reduziu a geração de H_2O_2 e peroxidação lipídica, além de elevar as atividades das enzimas do sistema antioxidante, levando ao acúmulo de massa seca em raízes e parte aérea (SHI et al., 2005). A aplicação de silício aumentou a tolerância de *Vigna unguiculata* ao excesso de manganês, pela alteração do perfil metabolômico, que resultou em menor aparecimento de sintomas nos genótipos sensíveis (FÜHRS et al., 2012).

Embora tenham sido aplicações pontuais, os resultados destes estudos demonstram que há possibilidades de pré-tratamentos, visando ao aumento da tolerância de plantas ao excesso de manganês. No entanto, até o momento não

há estudos relacionando a utilização de compostos como peróxido de hidrogênio ou açúcares aplicados de maneira exógena para maior tolerância ao manganês.

Nesse contexto, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um composto que tem sido amplamente utilizado como pré-tratamento em diferentes espécies vegetais para a indução de tolerância a diferentes tipos de estresses. O peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa de oxigênio que apresenta baixa reatividade, podendo ser, facilmente, transportado através das membranas celulares (GILL; TUTEJA, 2010). Essa ERO atua como molécula sinalizadora, sendo fundamental nas cascatas de sinalização para a resposta de plantas a diferentes tipos de estresse (PETROV; VAN BREUSEGEM, 2012). Diante do papel do peróxido de hidrogênio na resposta ao estresse e da facilidade de difusão do mesmo pelas membranas celulares, o pré-tratamento com H_2O_2 tem, justamente, o intuito de preparar o aparato de defesa antioxidante celular para a resposta a um estresse mais severo que será aplicado em seguida.

A aplicação de peróxido de hidrogênio em baixas concentrações, como pré-tratamento antes da submissão de plantas a estresses bióticos, tem funcionado na ativação de respostas fisiológicas que permitam a tolerância das mesmas à seca (ABASS; MOHAMED, 2011; ISHIBASHI et al., 2011), frio (İŞERI et al., 2013), calor (GAO et al., 2010), salinidade (LI et al., 2010a), estresse osmótico (TERZI et al., 2014), dentre outros. O H_2O_2 também pode ser aplicado em casos onde não há submissão a estresses, apenas como indutor da performance fisiológica da planta, resultando em maior produção (AFTAB et al., 2011; AHMAD et al., 2013).

Em geral, o pré-tratamento com H_2O_2 melhora a capacidade do sistema antioxidante das plantas que, rapidamente, atua sobre as EROs produzidas pelo estresse, neutralizando a ação ou prevenindo a geração das mesmas, resultando em menores concentrações de EROs e, conseqüentemente, menores danos celulares e maior sobrevivência em tais condições (GAO et al., 2010; LI et al.,

2010a; İŞERI et al., 2013). O peróxido de hidrogênio também está envolvido no aumento da produção de compostos osmoticamente ativos (ABASS; MOHAMED, 2011; TERZI et al., 2014) e compostos do metabolismo secundário (AFTAB et al., 2011).

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio pode aumentar a condutância estomática (TERZI et al., 2014), a fotossíntese e os teores de clorofila (AFTAB et al., 2011; AHMAD et al., 2013), além de atuar na proteção das membranas dos cloroplastos (GAO et al., 2010). Com isso, plantas pré-tratadas, em geral, apresentam maior crescimento e acúmulo de massa seca (AFTAB et al., 2011; AHMAD et al., 2013).

A aplicação de açúcares é uma outra técnica que, também, vem sendo empregada visando a otimizar a tolerância de plantas a estresses. Os açúcares, além dos inúmeros papéis que desempenham no metabolismo vegetal, também tiveram sua função antioxidante elucidada nos últimos anos (KEUNEN et al., 2013; ROLLAND; BAENA-GONZALEZ; SHEEN, 2006; VAN DEN ENDE; EL-ESAWI, 2014). Açúcares solúveis, tais como dissacarídeos (sacarose), oligossacarídeos da classe rafínósica e frutanos são os principais açúcares com função antioxidante (KEUNEN et al., 2013). Esses carboidratos têm seus níveis elevados em casos de estresse e estão, intimamente, ligados à manutenção da homeostase celular pelo controle das EROs geradas (COUÉE et al., 2006). Dessa maneira, o acúmulo de açúcares solúveis está relacionado ao aumento da tolerância a diferentes estresses abióticos (revisado por KEUNEN et al., 2013). A função antioxidante dos açúcares está relacionada à neutralização de EROs, principalmente radicais hidroxila. Os açúcares solúveis estão localizados em diferentes organelas, inclusive no vacúolo celular, onde desempenham sua função auxiliando na tolerância aos estresses (KEUNEN et al., 2013).

A aplicação exógena de sacarose aumentou a expressão de genes relacionados à síntese de amido (AHN et al., 2010) e estimulou a formação de

raízes adventícias (BAUD; PEZESHKI, 2013). Também a aplicação foliar de oligossacarídeos sintéticos aumenta o conteúdo de clorofila, a taxa fotossintética, a transpiração e a condutância estomática em plantas de *Cucumis sativus* (MENG et al., 2013). Também leva ao aumento de açúcares solúveis e amido e promove a resistência contra ataque de fungos (MENG et al., 2013).

Aplicação de manitol em folhas de milho aumentou o conteúdo de clorofilas, além de reduzir o conteúdo de prolina, a geração de H₂O₂, o extravasamento de eletrólitos e a atividade das enzimas do sistema antioxidante. Finalmente, o manitol estimulou o crescimento e acúmulo de massa seca em plantas de milho sob estresse salino e alterou a absorção de nutrientes minerais (KAYA et al., 2013).

O pré-tratamento com sacarose melhorou a performance de plantas sob estresse salino, com aumento na concentração de clorofila, ativação dos mecanismos de osmorregulação e consequente manutenção do crescimento (KONGAKE et al., 2012). Sob estresse de seca, a aplicação de trealose aumentou o acúmulo de massa em milho, em razão da mitigação do efeito do estresse sobre os parâmetros de trocas gasosas (ALI; ASHRAF, 2011) e melhorando os mecanismos de ajustamento osmótico. Manteve a atividade das enzimas do sistema antioxidante e os níveis de MDA formado (ALI; ASHRAF, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA, em que foram utilizados genótipos de *Glycine max* (L.) Merrill cedidos pela Embrapa Clima Temperado e pelo Setor de Sementes da UFLA. Desse modo, utilizou-se um genótipo tolerante ao alagamento (BMX Apolo RR), um genótipo sensível (BRS Taura RR) e um genótipo cuja tolerância ao alagamento é desconhecida (AN 8500).

As sementes foram colocadas para germinar em casa de vegetação em substrato comercial para o cultivo de mudas. Quinze dias após sementeira, quando as plântulas se encontravam em estágio V1, as mesmas foram transferidas para recipientes de polipropileno, contendo solução nutritiva para iniciar o período de aclimação. As plântulas foram submetidas às soluções nutritivas com $\frac{1}{4}$ de força, $\frac{1}{2}$ força e força completa, com pH $5,5 \pm 0,5$, sendo as trocas de soluções realizadas semanalmente.

As soluções nutritivas foram constituídas por macronutrientes: KCl (5,0 mM), K_2HPO_4 (0,1 mM), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (2,0 mM), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0 mM), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,07 mM), Fe-EDTA (92 μ M) e por micronutrientes: $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (2 μ M), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,8 μ M), H_3BO_3 (4,5 μ M), $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ (0,7 μ M), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,7 μ M), $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,8 μ M) (IMSANDE; RALSTON, 1981), acrescidas de $NH_4 \cdot NO_3$ (4mM).

Após o período de três semanas de aclimação, as plântulas foram submetidas aos tratamentos. Utilizou-se a mesma solução nutritiva de força completa utilizada no período de aclimação das plantas, no entanto, o pH da solução nutritiva foi mantido em 4,5, para garantir maior disponibilidade de manganês para absorção, sendo corrigido pelo uso de HCl 1M ou NaOH 1M. As soluções nutritivas foram trocadas semanalmente e o pH medido em dias

alternados para a manutenção das condições. As soluções não foram aeradas para simular uma condição de hipoxia.

Os tratamentos foram os seguintes: **Normal Mn**, em que as plantas foram submetidas à solução nutritiva completa com 2 μM de manganês. **Excesso de Mn**, em que as plantas foram submetidas à solução nutritiva completa acrescida de 1mM de manganês. **H₂O₂ + excesso de Mn**, em que as plantas foram pré-tratadas nas raízes com 10 mM de H₂O₂ por 6 horas e, em seguida, foram acondicionadas em solução nutritiva com excesso de Mn. **Sacarose + excesso de Mn**, em que as plantas foram pré-tratadas nas raízes com 90 mM de sacarose por 6 horas e, em seguida, foram submetidas à solução nutritiva com excesso de manganês. Para o pré-tratamento, as raízes das plantas foram mergulhadas nas respectivas soluções aquosas de H₂O₂ ou sacarose, onde foram mantidas por seis horas. Depois dos pré-tratamentos, as plantas foram novamente acondicionadas nas soluções nutritivas dos tratamentos a que foram submetidas.

Após 15 dias de tratamentos, quando houve agravamento dos sintomas de toxicidade por manganês, as plantas em estágio V5 foram coletadas para as análises.

3.1 Intensidade de sintomas

Foram avaliados os sintomas decorrentes da toxicidade por manganês pela visualização de clorose, engruvinhamento, encarquilhamento, manchas marrons e pontos necróticos nas folhas. Nas raízes, observou-se a intensidade das manchas marrons e o volume das mesmas.

3.2 Acúmulo de massa seca

O acúmulo de massa seca foi avaliado nas raízes e na parte aérea de plantas de soja, após a secagem em estufa de circulação forçada a 65° C até peso constante.

3.3 Análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas, foram utilizadas raízes e folhas devidamente coletadas, lavadas, acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer a -80° C.

3.3.1 Atividade das enzimas do sistema antioxidante

Para a determinação da atividade das enzimas do sistema antioxidante, o extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 50 mg de material vegetal, procedendo-se ao protocolo de extração segundo Biemelt, Keetman e Albrecht (1998). Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio, proposta por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Diferentes alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 7,8, metionina 70 mM, EDTA 10 µM, NBT 1 mM, Riboflavina 0,2 mM e água. Os tubos contendo o meio de incubação mais a amostra ou somente o meio de incubação com água (branco) foram iluminados com lâmpada fluorescente de 20 W por 7 minutos. As leituras foram realizadas a 560 nm. Uma unidade da

SOD corresponde à quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições do ensaio.

A CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1987). Diferentes alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de incubação, contendo tampão fosfato de potássio 200 mM e pH 7,0, peróxido de hidrogênio 250 mM e água. 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 $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos (NAKANO; ASADA, 1981). Para isso, diferentes alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 200 mM e pH 7,0, ácido ascórbico 10 mM, peróxido de hidrogênio 4 mM e água. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3.2 Quantificação de ascorbato

A concentração de ascorbato foi determinada de acordo com Arakawa et al. (1981), em que 50 mg de material vegetal foram macerados em TCA 5% (m/v) e o homogeneizado centrifugado a 10.000 g, por 15 minutos, a 4°C. Uma alíquota do sobrenadante foi adicionada ao meio de reação composto por TCA 5% (m/v), etanol 99,8% (v/v), ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,4% em etanol (v/v), bathophenantrolina 0,5% em etanol (p/v) e FeCl_3 0,03% em etanol (m/v). A mistura foi homogeneizada e incubada, a 30°C, por 90 minutos. A concentração de ascorbato foi determinada de acordo com a absorbância das amostras a 534 nm e com base na curva-padrão com concentrações conhecidas.

3.3.3 Quantificação de peróxido de hidrogênio

Para a quantificação de peróxido de hidrogênio, 100 mg de tecido vegetal foram macerados em nitrogênio líquido, homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação composto por tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e iodeto de potássio 1 M. A concentração de H₂O₂ foi determinada pela absorbância das amostras a 390 nm, com base na curva-padrão de peróxido de hidrogênio (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

3.3.4 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Para a determinação dos teores de pigmentos, foram macerados 50 mg de tecido foliar em acetona 80%. Após filtração, o volume final foi completado para 10 mL e, em seguida, foram realizadas as leituras espectrofotométricas a 445, 645 e 663 nm. A partir dos valores de leituras, foram calculadas as concentrações de carotenoides e de clorofilas a, b e total (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001).

3.4 Trocas gasosas

As avaliações ecofisiológicas foram realizadas com um analisador de gás por infravermelho (LI-6400XT Portable Photosynthesis System, LI-COR, Lincoln, USA) em folhas completamente expandidas, no 3º ou 4º pares de folhas, no folíolo central. As características avaliadas foram: taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs) e transpiração (E). Também calculou-se a razão entre carbono interno e carbono externo (C_i/C_a). 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 $1500 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Blue + Red LED LI-6400-02B, LI-COR, Lincoln, USA). A taxa de assimilação de CO_2 na câmara foi medida com a concentração ambiente de CO_2 que foi de $380 \pm 3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$.

3.5 Análises de quantificação de manganês

A concentração de manganês nas folhas e raízes foi determinada de acordo com Malavolta, Vitti e Oliveira (1989). Para isso, 500 mg de material seco e moído foram acondicionados em tubos de digestão aos quais foram adicionados 6 ml de uma mistura de HNO_3 e HClO_4 na proporção de 2:1 (v/v). Em seguida, as amostras foram levadas ao bloco digestor, cuja temperatura foi aumentada, gradativamente, até 150°C . As amostras foram mantidas nessas condições até a redução do seu volume pela metade. Em seguida, a temperatura foi elevada a 210°C , sendo mantida até que se fossem obtidos fumos brancos de HClO_4 . Após resfriamento, o extrato teve seu volume completado para 15 mL com água deionizada e foi armazenado até as análises. A determinação do conteúdo de manganês foi realizada por espectrometria de absorção atômica.

3.6 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial, com três genótipos e quatro tratamentos, com três repetições cada. As variáveis foram analisadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($p \geq 0,05$). Aquelas variáveis que não se enquadravam na normalidade foram transformadas pelo método de Box-Cox e submetidas à análise de variância e teste de médias por Scott-Knott ($p \leq 0,05$),

análise de componentes principais. As variáveis não-paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis paraa verificação da diferença entre os tratamentos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização visual dos sintomas de toxicidade por excesso de manganês

Aos 15 dias de estresse, BRS Taura RR no tratamento de normal Mn apresentou folíolos jovens com sintomas de encarquilhamento e engruvinhamento, assim como início de clorose (Figura 1A). Os folíolos completamente expandidos não apresentaram sintomas (Figura 1B) e as raízes estavam espessas e com coloração escura (Figura 1C). O tratamento de excesso de Mn levou ao agravamento da clorose, do encarquilhamento e engruvinhamento nos folíolos jovens (Figura 1D), início de clorose, encarquilhamento e manchas marrons marginais nos folíolos completamente expandidos (Figura 1E) e as raízes apresentavam espessamentos e maior número de raízes absorventes (Figura 1F) e com coloração escura.

Comparando-se a ação dos pré-tratamentos com os sintomas encontrados no tratamento de excesso de Mn, o H₂O₂ atenuou os sintomas de encarquilhamento e engruvinhamento nos folíolos jovens (Figura 1G). Os folíolos completamente expandidos apresentaram maior intensidade de clorose, encarquilhamento, engruvinhamento e manchas marrons (Figura 1H). As raízes estavam mais claras, e havia mais raízes adventícias e absorventes (Figura 1I). Já, no pré-tratamento com sacarose, os folíolos jovens tiveram menor intensidade de sintomas, apresentando início de encarquilhamento e de clorose (Figura 1J). Os folíolos completamente expandidos não apresentaram encarquilhamento nem clorose, mas observou-se a presença de pontoações marrons (Figura 1K). Quanto às raízes, houve maior formação de raízes absorventes e estas estavam mais claras.

Em relação aos pré-tratamentos, a sacarose manteve a integridade dos folíolos jovens e completamente expandidos, além de proporcionar maior número de raízes absorventes e redução na coloração escura das raízes, indicando menor aparecimento de sintomas de excesso de Mn, quando comparada com o pré-tratamento com H_2O_2 .

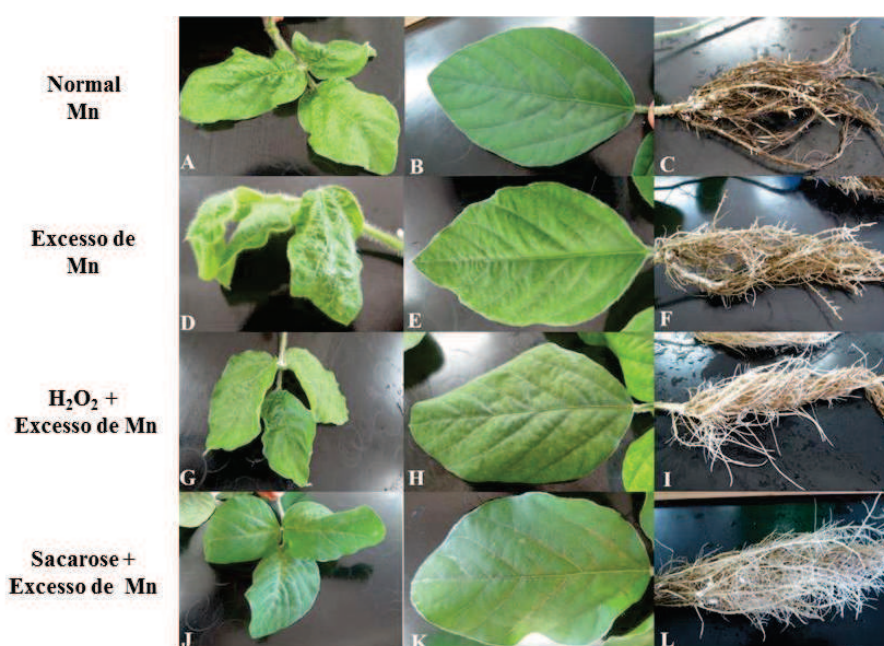


Figura 1 Caracterização de sintomas em BRS Taura RR: em folíolos jovens (A, D, G, J), completamente expandidos (B, E, H, K) e raízes (C, F, I, L) de plantas submetidas aos tratamentos normal Mn; excesso de Mn; H_2O_2 + excesso de Mn e sacarose + excesso de Mn.

No que se refere ao genótipo BMX Apolo RR, a plantas submetidas às concentrações normais de manganês apresentaram clorose nos folíolos jovens (Figura 2A). Os folíolos completamente expandidos não apresentaram sintomas (Figura 2B), as raízes estavam claras e a raiz principal apresentava espessamento (Figura 2C). No tratamento de excesso de Mn, os folíolos jovens apresentaram clorose e encarquilhamento (Figura 2D) e nos folíolos completamente expandidos verificaram-se manchas cloróticas com pouca intensidade (Figura 2E). As raízes estavam escurecidas, apresentavam espessamento, que foi mais pronunciado na raiz principal (Figura 2F).

Quanto ao efeito dos pré-tratamentos em relação ao tratamento de excesso de Mn, o H_2O_2 provocou encarquilhamento, engruvinhamento e manchas necróticas nos folíolos jovens (Figura 2G). Nos folíolos completamente expandidos houve início de clorose (Figura 2H). As raízes estavam mais claras, com maior volume e espessamento (Figura 2I). Com relação à sacarose, houve maior clorose e encarquilhamento nos folíolos jovens (Figura 2J). Os folíolos completamente expandidos apresentaram clorose marginal e início de necrose (Figura 2K). Quanto às raízes, estavam com maior quantidade de raízes absorventes, mais claras e com espessamento da raiz principal (Figura 2L).

Os pré-tratamentos tiveram efeitos semelhantes quanto à promoção de crescimento das raízes de BMX Apolo RR sob excesso de manganês. Não foram observadas pontuações marrons nos folíolos jovens e completamente expandidos.

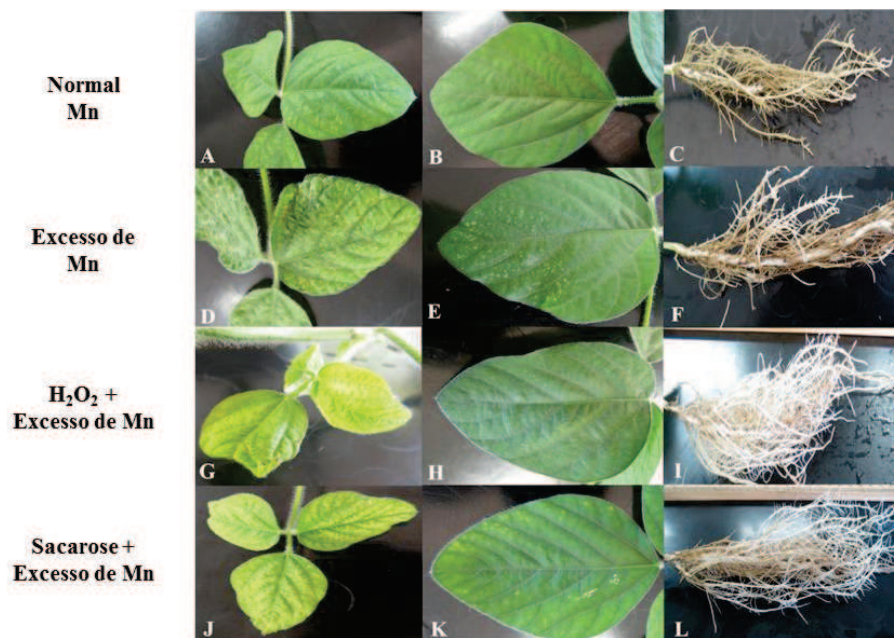


Figura 2 Caracterização do aparecimento de sintomas em BMX Apollo RR em folíolos jovens (A, D, G, J), completamente expandidos (B, E, H, K) e em raízes (C, F, I, L) de plantas submetidas aos tratamentos normal Mn; excesso de Mn; H_2O_2 + excesso de Mn e sacarose + excesso de Mn.

No genótipo AN 8500 não se verificou aparecimento de sintomas em folíolos jovens (Figura 3A) e completamente expandidos (Figura 3B), enquanto as raízes estavam claras e com maior quantidade de raízes absorventes (Figura 3C). Quando submetidos ao excesso de Mn, os folíolos jovens não apresentaram sintomas (Figura 3D), entretanto, nos folíolos completamente expandidos verificou-se o aparecimento de pontoações marrons e manchas necróticas (Figura 3E). As raízes apresentaram coloração mais escura e houve espessamento da raiz principal (Figura 3F).

No que se refere à ação dos pré-tratamentos em relação ao excesso de manganês, o H_2O_2 levou ao aparecimento de clorose e manchas marrons nos folíolos jovens, não havendo encarquilhamento (Figura 3G). Nos folíolos completamente expandidos houve apenas o aparecimento de pontoações marrons (Figura 3H). As raízes estavam mais claras e com maior quantidade de raízes absorventes (Figura 3I). O pré-tratamento com sacarose causou leve clorose e encarquilhamento nos folíolos jovens (Figura 3J), pontoações marrons e inícios de manchas necróticas nos folíolos completamente expandidos, que apresentaram leve encarquilhamento (Figura 3K). As raízes estavam mais claras e com maior quantidade de raízes absorventes (Figura 3L).

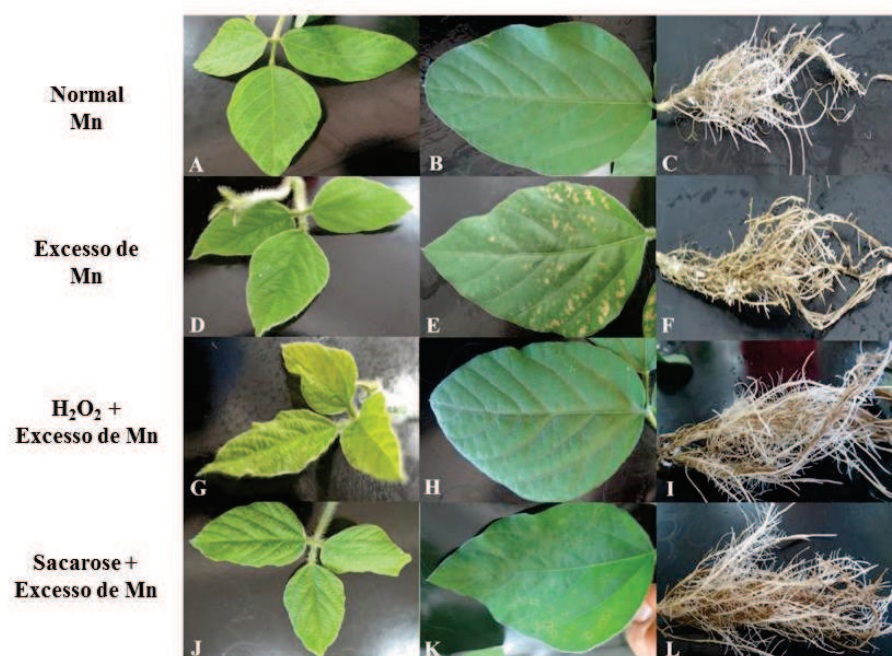


Figura 3 (A, D, G, J), completamente expandidos (B, E, H, K) e em raízes (C, F, I, L) de plantas submetidas aos tratamentos normal Mn; excesso de Mn; H₂O₂ + excesso de Mn e sacarose + excesso de Mn.

Os pré-tratamentos com H_2O_2 e sacarose aumentaram o espessamento do caule nesse genótipo. BMX Apolo não apresentou variação no diâmetro do caule entre os tratamentos. Os caules de AN 8500 apresentaram maior espessamento no tratamento de excesso de Mn do que nos outros tratamentos, de modo que os pré-tratamentos não aumentaram o diâmetro do caule nesse genótipo.



Figura 4 Modificações morfológicas em plantas de AN 8500 pré-tratadas com sacarose. Presença de rachaduras e espessamento do caule e raízes adventícias estão apontados pelas setas.

A caracterização visual dos genótipos fornece indícios de sua sensibilidade ao alagamento e ao excesso de manganês. Enquanto BRS Taura RR apresentou maior intensidade de sintomas visuais do estresse no tratamento com concentrações normais de manganês, BMX Apolo RR apresentou poucos sintomas e AN 8500 não sofreu danos causados pela hipoxia. Quanto ao sistema radicular, raízes de BRS Taura RR apresentaram escurecimento e menor número de raízes absorventes que os outros genótipos. Esses comportamentos demonstram a maior sensibilidade de BRS Taura à hipoxia e, por outro lado, a menor sensibilidade de AN 8500 a esse estresse. BMX Apolo RR apresentou menor sensibilidade à hipoxia do que BRS Taura, confirmando sua tolerância ao alagamento.

Houve uma variação de resposta dos genótipos diante dos pré-tratamentos a que foram submetidos. Todos os genótipos apresentaram sintomas de excesso de manganês, que foram atenuados pelos pré-tratamentos. Enquanto ambos os pré-tratamentos foram efetivos na atenuação dos sintomas de estresse em BMX Apolo RR e em AN 8500, em BRS Taura RR o pré-tratamento com sacarose foi mais eficiente na redução dos sintomas de excesso de manganês. O genótipo AN 8500 apresentou poucas variações na estrutura radicular nos diferentes tratamentos quando comparado aos demais genótipos.

O espessamento do caule, assim como o aparecimento de raízes adventícias são modificações morfológicas desenvolvidas por plantas submetidas ao alagamento como forma de sobrevivência sob estresse (PIRES; SOPRANO; CASSOL, 2002; VOESENEK; BAILEY-SERRES, 2013). Nesse sentido, verifica-se a importância dos pré-tratamentos na indução de raízes adventícias em todos os genótipos, assim como aumento no espessamento do caule em BRS Taura RR.

4.2 Quantificação de manganês

Após a análise dos sintomas apresentados pelos genótipos submetidos aos diferentes tratamentos, realizou-se a quantificação de manganês (Tabela 1) para conhecimento das concentrações e dos padrões de distribuição desse elemento nas plantas. A imposição do excesso de Mn elevou os conteúdos do mesmo nas plantas e o genótipo BMX Apolo RR apresentou menores valores do que os outros genótipos, à exceção do pré-tratamento com H₂O₂. Em relação ao tratamento de excesso de Mn, o pré-tratamento com H₂O₂ elevou o conteúdo de Mn em BMX Apolo RR e manteve praticamente constante nos outros genótipos. Já, o pré-tratamento com sacarose reduziu o conteúdo de Mn em BRS Taura RR e aumentou em BMX Apolo RR e AN 8500. No que se refere à concentração de

Mn, as plantas deste estudo apresentaram maiores valores nas raízes do que na parte aérea. A imposição do excesso de manganês elevou a concentração desse elemento nas plantas, de modo geral. O pré-tratamento com H_2O_2 aumentou a concentração de Mn na parte aérea e reduziu nas raízes de BRS Taura RR e BMX Apolo RR. A sacarose levou a uma maior concentração na parte aérea dos genótipos BRS Taura RR e AN 8500, entretanto, nas raízes, esse acréscimo ocorreu em todos os genótipos. Analisando-se o particionamento de Mn nas plantas, o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio levou a um maior particionamento de manganês para a parte aérea, enquanto o pré-tratamento com sacarose manteve em níveis semelhantes ao tratamento com excesso de Mn, exceto para BRS Taura RR.

Tabela 1 Concentração, conteúdo e porcentagem de manganês em parte aérea e raízes de plantas de soja submetidas aos tratamentos: normal Mn, excesso de Mn, H₂O₂ + excesso de Mn, Sacarose + excesso de Mn

| Tratamento | Genótipo | Concentração de Mn (mg. Kg MS ⁻¹) | | | Conteúdo de Mn (µg. parte planta ⁻¹) | | | Particionamento de Mn (%) | |
|--|--------------|--|-------|--------|---|--------|----------|---------------------------|------|
| | | Parte aérea | Raiz | Total | Parte aérea | Raiz | Total | Parte aérea | Raiz |
| Normal Mn | BRS Taura RR | 19,7 | 99,6 | 119,3 | 47,28 | 37,84 | 85,12 | 55% | 45% |
| | BMX Apolo RR | 28,1 | 62,3 | 90,4 | 31,40 | 15,62 | 47,03 | 67% | 33% |
| | AN 8500 | 34,5 | 103,6 | 138,1 | 61,07 | 31,08 | 92,15 | 66% | 34% |
| Excesso de Mn | BRS Taura RR | 529,8 | 624,7 | 1154,5 | 957,49 | 237,38 | 1.194,87 | 80% | 20% |
| | BMX Apolo RR | 492,6 | 541,7 | 1034,3 | 596,04 | 178,86 | 774,80 | 77% | 23% |
| | AN 8500 | 517,2 | 613,6 | 1130,8 | 812,00 | 196,35 | 1.008,35 | 81% | 19% |
| H ₂ O ₂ + Excesso de Mn | BRS Taura RR | 604,5 | 553,8 | 1158,3 | 955,11 | 188,29 | 1.143,40 | 84% | 16% |
| | BMX Apolo RR | 591,3 | 525,8 | 1117,1 | 928,34 | 231,35 | 1.159,69 | 80% | 20% |
| | AN 8500 | 504,2 | 615,2 | 1119,4 | 821,00 | 252,23 | 1.073,23 | 76% | 24% |
| Sacarose+Exc esso de Mn | BRS Taura RR | 629,3 | 651,6 | 1280,9 | 717,40 | 345,34 | 1.062,74 | 68% | 32% |
| | BMX Apolo RR | 496,1 | 604,6 | 1100,7 | 644,93 | 211,61 | 856,54 | 75% | 25% |
| | AN 8500 | 537,7 | 683,9 | 1221,6 | 978,61 | 266,72 | 1.245,33 | 79% | 21% |

A maioria das espécies vegetais requer um mínimo de $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de Mn para completar seu crescimento e desenvolvimento (MARSCHNER, 1995), no entanto, essa quantidade ótima varia entre as espécies. O suprimento de manganês para as plantas sob concentrações normais de Mn foi adequado, uma vez que a concentração de Mn foi próxima ou superior a $20\mu\text{g g}^{-1}$ de Mn. Com relação às concentrações de Mn consideradas tóxicas para as espécies, existem valores variáveis na literatura (Revisado por MILLALEO et al., 2010). Em soja, a susceptibilidade diferencial das variedades já foi descrita em vários trabalhos (BROWN; DEVINE, 1980; CARTER; ROSE; READING, 1975; HEENAN; CARTER, 1977; LAVRES JUNIOR et al., 2008).

Foram reportados sintomas de toxicidade por excesso de manganês em soja em concentrações desse elemento entre $400\text{-}500 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (BROWN; DEVINE, 1980) em parte aérea, enquanto para folhas as concentrações tóxicas desse elemento foram determinadas entre $113\text{-}1148 \text{ mg.Kg}^{-1}$. Para raízes, os sintomas foram encontrados nas concentrações acima de 502 mg.Kg^{-1} (LAVRES JUNIOR et al., 2008). Assim sendo, os genótipos deste estudo apresentaram concentrações de Mn que estavam acima daquelas consideradas como tóxicas.

A maior concentração de manganês em raízes em comparação com a parte aérea foi verificada em diferentes espécies (LAVRES JUNIOR et al., 2008; LI et al., 2010b; MORA et al., 2009). Em geral, as cultivares tolerantes apresentam maiores concentrações de manganês nas raízes, evitando que maiores danos sejam causados à parte aérea (LAVRES JUNIOR et al., 2008; MORA et al., 2009). Algumas plantas tolerantes possuem mecanismos que as permitem suportar elevadas concentrações de Mn na parte aérea (HEENAN; CARTER, 1976). Genótipos de soja tolerantes tendem a acumular Mn no apoplasto, enquanto os sensíveis acumulam no simplasto (LAVRES JUNIOR et al., 2008). Com isso, o acúmulo apoplástico de manganês está relacionado ao menor aparecimento de sintomas nas plantas.

O maior acúmulo de manganês na parte aérea está relacionado ao maior aparecimento de sintomas visuais nas folhas. Dessa maneira, plantas com elevadas concentrações de manganês na parte aérea tendem a apresentar sintomas mais acentuados e caracterizados por clorose, encarquilhamento, engruvinhamento e necrose. Um sintoma marcante do excesso de manganês é o aparecimento de pontoações marrons (FECHT-CHRISTOFFERS; MAIER; HORST, 2003; HEENAN; CARTER, 1977; KHABAZ-SABERI et al., 2010; LAVRES JUNIOR et al., 2008; LEI; KORPELAINEN; LI, 2007) que são resultados de complexos de compostos orgânicos com manganês (MILLALEO et al., 2010). Esses complexos formados tendem a inativar ou neutralizar o manganês, evitando que cause maiores distúrbios à homeostase celular. Em determinadas espécies o Mn pode ser excretado para a superfície foliar, formando cristais localizados próximos aos tricomas (MOU et al., 2011), como forma de evitar o estresse.

BRS Taura RR foi o genótipo que apresentou as maiores concentrações de manganês na parte aérea, o que está relacionado ao maior aparecimento de sintomas nas folhas deste genótipo (Figura 1) do que nos demais. No entanto, plantas pré-tratadas com sacarose apresentaram menos sintomas de toxicidade (Figura 1 J-L), o que pode estar relacionado ao menor particionamento desse elemento para a parte aérea (68%), quando comparado aos outros tratamentos com excesso de manganês. No caso do pré-tratamento com H₂O₂, observaram-se maiores sintomas (Figura 1 G-I), que podem ser associados à maior translocação de Mn para a parte aérea (84%). Assim, a sacarose induziu a manutenção de maiores quantidades de Mn nas raízes, que é uma estratégia utilizada por plantas tolerantes.

O genótipo BMX Apolo RR teve menores concentrações de Mn na parte aérea do que os outros genótipos quando submetidos ao excesso de Mn e ao pré-tratamento com sacarose. Os pré-tratamentos mantiveram as plantas com

características bem próximas às aquelas submetidas ao excesso de Mn. Esse genótipo apresentou menor incorporação de Mn do que os demais para todos os tratamentos. Essa menor incorporação de Mn pode ser parte de um mecanismo de tolerância do genótipo (KHABAZ-SABERI; RENGEL, 2010; LEI; KORPELAINEN; LI, 2007). Apesar da maior concentração e translocação de Mn para a parte aérea em plantas pré-tratadas, o H₂O₂ protegeu as folhas contra os danos causados pela elevada concentração de metal, evitando o aparecimento de sintomas com maior intensidade. Dessa maneira, o peróxido de hidrogênio pode estar relacionado a algum processo de transporte e armazenamento do Mn em locais específicos na célula, para evitar a quebra da homeostase pelo excesso de metal. O pré-tratamento com sacarose apenas manteve a concentração e translocação de Mn próximas aos valores do tratamento de elevadas concentrações de Mn.

No genótipo AN 8500, o pré-tratamento com H₂O₂ reduziu e com sacarose aumentou a concentração de Mn na parte aérea em comparação com as plantas não pré-tratadas. Os pré-tratamentos levaram a uma menor translocação de Mn para a parte aérea, o que está relacionado ao menor aparecimento de sintomas do que no tratamento de excesso de Mn. A menor translocação para a parte aérea representa um mecanismo de tolerância das plantas no excesso de Mn.

Quanto às raízes, os pré-tratamentos induziram a formação de raízes laterais e adventícias nos três genótipos. O excesso de manganês leva à redução na área, volume e na viabilidade das raízes (MOU et al., 2011). Nesse sentido, a manutenção ou melhoria do sistema radicular pelos pré-tratamentos indica o desenvolvimento de uma modificação morfológica que possibilitará melhor desempenho das plantas sob estresse. Os pré-tratamentos com H₂O₂ e sacarose promoveram o aparecimento de raízes adventícias em *Arabidopsis thaliana* (TAKAHASHI et al., 2003), *Malus domestica* (CALAMAR; KLERK, 2002),

Salix nigra (BAUD; PEZESHKI, 2013), *Cucumis sativus* (LI et al., 2007) e *Phaseolus vulgaris* (LI et al., 2009).

Quanto à diferença de sensibilidade ao excesso de Mn, BRS Taura RR teve comportamento de plantas sensíveis, em que houve maior translocação para a parte aérea. Os demais genótipos tiveram comportamento de plantas tolerantes, em que houve menor incorporação de Mn em BMX Apolo RR e tolerância a maiores concentrações de Mn em AN 8500.

Analisando-se o acúmulo de massa seca em parte aérea, plantas de BRS Taura cresceram mais no tratamento normal Mn, enquanto em BMX Apolo e AN 8500 o acúmulo de massa seca foi semelhante para os tratamentos de normal e excesso de Mn (Figura 5). O pré-tratamento com H₂O₂ promoveu o acúmulo de massa seca em BMX Apolo e manteve em BRS Taura e AN 8500, em relação ao tratamento de excesso de Mn. O pré-tratamento com sacarose reduziu o acúmulo de massa seca em BRS Taura e manteve nos outros genótipos, quando comparados com as plantas submetidas a elevadas concentrações de Mn.

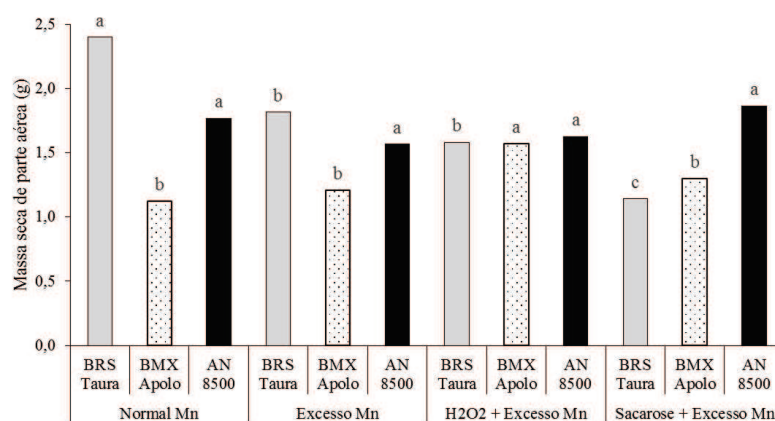


Figura 5 Massa seca da parte aérea de soja sob diferentes tratamentos: normal Mn, excesso de Mn, pré-tratamento com H_2O_2 + excesso de manganês (H_2O_2 + excesso de manganês) e pré-tratamento com sacarose + excesso de manganês (Sacarose + Excesso Mn). As letras comparam o efeito dos tratamentos em cada genótipo, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A massa seca de raízes, de modo geral, foi mais elevada em plantas pré-tratadas com sacarose ou H_2O_2 . Comparando-se os tratamentos de normal Mn e excesso de Mn (Figura 6), o acúmulo de massa seca nas raízes de todos os genótipos foi semelhante em ambos os tratamentos. O pré-tratamento com H_2O_2 permitiu maior acúmulo de massa seca em raízes de BMX Apolo, enquanto não promoveu diferenças em raízes dos genótipos BRS Taura e AN 8500, quando comparadas ao excesso de Mn. Por outro lado, o pré-tratamento com sacarose levou ao maior acúmulo de massa seca em BRS Taura e manteve nos demais genótipos em relação ao tratamento de altas concentrações de Mn.

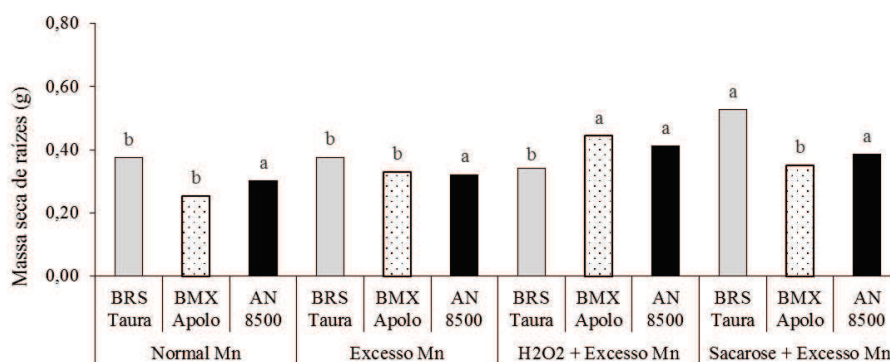


Figura 6 Massa seca das raízes de soja sob diferentes tratamentos: normal Mn, excesso de Mn, pré-tratamento com H_2O_2 + excesso de manganês (H_2O_2 + excesso de manganês) e pré-tratamento com sacarose + excesso de manganês (Sacarose + Excesso Mn). As letras comparam o efeito dos tratamentos em cada genótipo, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

O excesso de Mn reduziu o crescimento da parte aérea de BRS Taura RR, enquanto não afetou os demais genótipos. O pré-tratamento com H_2O_2 levou ao maior acúmulo de biomassa em BMX Apolo RR, enquanto AN 8500 não sofreu variações na massa seca entre os tratamentos a que foram submetidos. Quanto às raízes, o excesso de Mn não levou a uma redução no acúmulo de massa seca das plantas. No entanto, os genótipos BMX Apolo RR e BRS Taura RR tiveram o acúmulo de massa seca em raízes otimizado pelos pré-tratamentos com H_2O_2 e sacarose, respectivamente.

O estresse pelo excesso de manganês está relacionado à redução do crescimento de parte aérea e raízes (LEI; KORPELAINEN; LI, 2007; LI et al., 2010b; PARASHAR et al., 2014). No entanto, plantas mais tolerantes ao excesso de manganês tendem a apresentar menor redução no acúmulo de massa seca quando submetidas ao estresse (LAVRES JUNIOR et al., 2008; MOU et al., 2011). Em plantas hiperacumuladoras esta redução do crescimento é mínima, mesmo sob elevadas concentrações de Mn (LIU et al., 2010b). Nesse sentido, o

pré-tratamento com H_2O_2 e sacarose trouxeram benefícios aos genótipos, independentemente de sua tolerância ao alagamento, uma vez que permitiram a manutenção ou até mesmo o aumento do crescimento de parte aérea e raízes quando submetidos a elevadas concentrações de manganês.

O acúmulo de biomassa é um indicativo importante de tolerância ao estresse. Embora o excesso de Mn não tenha causado variação no acúmulo de massa seca dos genótipos deste estudo, o pré-tratamento com H_2O_2 favoreceu o acúmulo de massa seca na parte aérea e nas raízes de BMX Apolo RR e o pré-tratamento com sacarose levou ao maior acúmulo de massa seca em raízes de BRS Taura RR. A utilização de H_2O_2 exógeno proporcionou maior crescimento em diferentes espécies, submetidas a estresses (AFTAB et al., 2011; AHMAD et al., 2013; LI et al., 2010a). Também a utilização de açúcares solúveis exógenos promoveu o crescimento de espécies submetidas à salinidade (KAYA et al., 2013) e à seca (ALI; ASHRAF, 2011). Com relação ao excesso de Mn, a aplicação exógena de óxido nítrico (SRIVASTAVA; DUBEY, 2010) e silício (SHI et al., 2005) levaram, dentre outros fatores, ao maior acúmulo de massa seca em plantas sob estresse.

4.3 Análises bioquímicas e fisiológicas

A concentração de manganês, assim como o conteúdo desse elemento nas plantas, pode influenciar a resposta das mesmas ao excesso de manganês e ao pré-tratamento a que foram submetidas. A manutenção do crescimento em situações de estresse pode ser um bom indicador para a sensibilidade das plantas. Nesse sentido, visando a conhecer o padrão de resposta fisiológica apresentado pelos genótipos deste estudo, as variáveis analisadas foram submetidas à análise de componentes principais (Figura 7). As variáveis que apresentaram maior influência sobre a componente de maior variação (Comp. 1)

foram a concentração de clorofilas a, b e total, carotenoides e taxas fotossintética líquida e transpiratória. As taxas fotossintética líquida e transpiratória, assim como a concentração de carotenoides, influenciaram também a segunda componente de maior variação (Comp. 2). A concentração de pigmentos fotossintéticos está diretamente relacionada com a variação da componente 1. A taxa fotossintética líquida e a taxa transpiratória possuem uma relação direta com a variação das componentes 1 e 2, enquanto o conteúdo de carotenoides tem uma relação inversa com a componente 2.

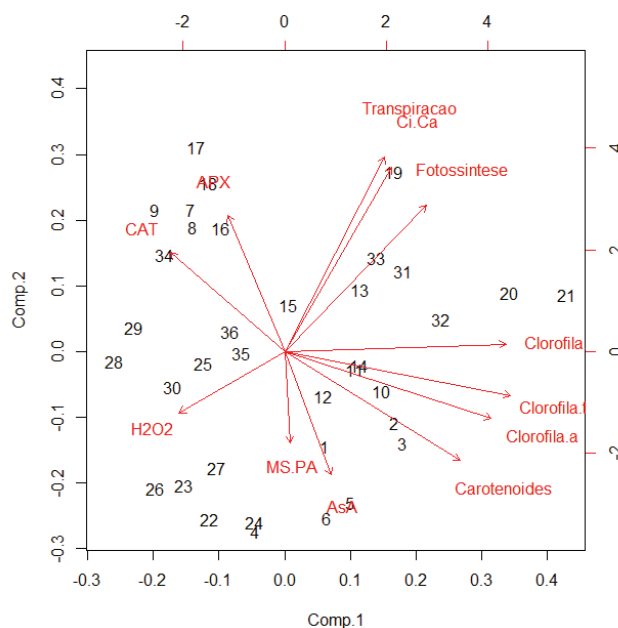


Figura 7 Análise de componentes principais das variáveis paramétricas relacionadas à variação da resposta de folhas de plantas soja submetidas aos tratamentos normal Mn, excesso de Mn, pré-tratamento com H_2O_2 + excesso de manganês pré-tratamento com sacarose + excesso de manganês.

Avaliando-se os teores de clorofila total, BRS Taura RR apresentou maior concentração de clorofila sob concentrações normais de Mn, enquanto em BMX Apolo RR e AN 8500 não houve diferença com o tratamento de excesso de Mn (Figura 8). Com relação ao pré-tratamento com H_2O_2 , este proporcionou maiores concentrações de clorofila total em BMX Apolo RR e AN 8500, e menores em BRS Taura, quando comparadas com o tratamento de elevadas concentrações de Mn. O pré-tratamento com sacarose aumentou os teores de clorofila em BRS Taura e manteve em BMX Apolo RR e AN 8500, em relação àquelas submetidas ao excesso de manganês. BRS Taura RR apresentou as maiores concentrações de clorofila sob concentração normal de Mn e no pré-tratamento com sacarose. No pré-tratamento com H_2O_2 BRS Taura RR apresentou a menor concentração e no tratamento de excesso de Mn não houve diferença entre os genótipos.

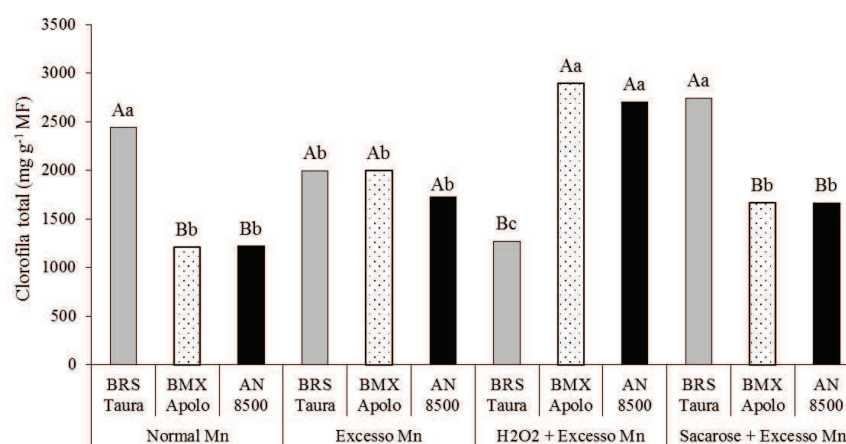


Figura 8 Concentração de clorofila total em folhas de soja sob diferentes tratamentos: normal Mn, excesso de Mn, pré-tratamento com H_2O_2 + excesso de manganês (H_2O_2 + excesso de manganês) e pré-tratamento com sacarose + excesso de manganês (Sacarose + Excesso Mn). As letras maiúsculas comparam os genótipos em cada tratamento, enquanto as letras minúsculas comparam os tratamentos em cada genótipo, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Plantas sob o tratamento normal Mn, em geral, apresentaram menores teores de clorofila total do que aquelas submetidas ao excesso de manganês. Plantas submetidas aos estresses por alagamento (YIN et al., 2010) e ao excesso de Mn (LEI; KORPELAINEN; LI, 2007; REZAI; FARBOODNIA, 2008), em geral, apresentam conteúdo de clorofila reduzido. Plantas de diferentes espécies, quando submetidas ao excesso de manganês, apresentam teores de clorofila menores (LEI; KORPELAINEN; LI, 2007; ZENGIN, 2013) ou semelhantes (LI et al., 2010b) aos controles. No entanto, em geral, os controles utilizados são aerados, o que difere deste estudo, em que as plantas foram mantidas sob hipoxia.

Nos genótipos BMX Apolo RR e AN 8500 houve manutenção das concentrações de clorofila entre os tratamentos normal Mn e excesso de Mn, demonstrando que o excesso de Mn não foi suficiente para a indução de degradação dos pigmentos nessas plantas. Esses resultados corroboram com os encontrados em citrus, cujos teores de pigmentos foram semelhantes em plantas sob excesso de manganês e as plantas controle aeradas normalmente (LI et al., 2010b). Por outro lado, em BRS Taura RR o excesso de manganês atuou na degradação de clorofila, assim como descrito em *Populus cathayana* (LEI; KORPELAINEN; LI, 2007) e em *Phaseolus vulgaris* (ZENGIN, 2013).

O excesso de Mn na parte aérea está relacionado aos menores teores de clorofila, uma vez que a degradação desse pigmento é um dos primeiros sintomas desse estresse em plantas (MILLALEO et al., 2010). A concentração de clorofila variou na BRS Taura RR, de acordo com o tratamento a que as plantas foram submetidas, porém ocorreram pequenas variações nos outros genótipos. Em BRS Taura RR, maiores teores de clorofila foram encontrados nos tratamentos em que houve menores conteúdos de Mn na parte aérea das plantas (normal Mn e pré-tratamento com sacarose) e menores sintomas de toxicidade na parte aérea (Figura 1). Contudo, houve pequena variação na concentração de

clorofila dos genótipos BMX Apolo RR e AN 8500 nos diferentes tratamentos, independentemente dos conteúdos de Mn encontrados na parte aérea. Também houve um incremento nas concentrações de clorofila dos genótipos BMX Apolo RR e AN 8500 pelo pré-tratamento com H_2O_2 , onde encontrou-se maior conteúdo de Mn na parte aérea desses genótipos. Essa maior concentração de clorofila no BMX Apolo RR para o pré-tratamento com H_2O_2 parece não ter correlação com o conteúdo de Mn, uma vez que a maior incorporação de Mn ocorreu nesse genótipo. Esses resultados sugerem que BMX Apolo RR e AN 8500 possuem um aparato fisiológico que melhor se ajusta a elevadas concentrações de Mn, mantendo concentração de clorofilas e contribuindo para a homeostase. Entretanto, em BRS Taura RR não há esse preparo fisiológico para a manutenção da homeostase quando sob excesso de Mn.

A concentração de carotenoides (Figura 9), em BMX Apolo RR foi maior em plantas sob excesso de Mn do que naquelas sob concentração normal de Mn, enquanto não houve diferenças para os genótipos BRS Taura RR e AN 8500. Os pré-tratamentos com H_2O_2 e sacarose, de maneira geral, mantiveram os teores de carotenoides para BMX Apolo RR e AN 8500, porém reduziram em BRS Taura RR, quando comparadas ao tratamento de excesso de manganês. BRS Taura RR apresentou maiores concentrações de carotenoides sob normal Mn e menores sob pré-tratamento com H_2O_2 , quando comparadas com os demais tratamentos.

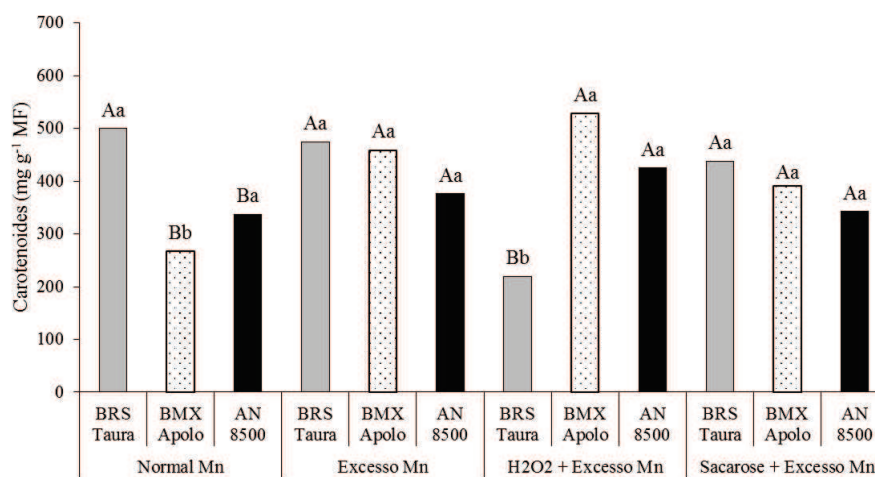


Figura 9 Concentração de carotenoides em folhas de soja sob diferentes tratamentos: normal Mn, excesso de Mn, pré-tratamento com H₂O₂ + excesso de manganês (H₂O₂ + excesso de manganês) e pré-tratamento com sacarose + excesso de manganês (Sacarose + Excesso Mn). As letras maiúsculas comparam os genótipos em cada tratamento, enquanto as letras minúsculas comparam os tratamentos em cada genótipo, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Novamente verificou-se que houve uma maior variação nas concentrações de carotenoides em BRS Taura RR, em que maiores concentrações foram encontradas no tratamento normal Mn (menor conteúdo de Mn) e as menores foram observadas no pré-tratamento com H₂O₂ (maior conteúdo de Mn). No entanto, para BMX Apolo RR e AN 8500 houve manutenção nas concentrações de carotenoides, à exceção de BMX Apolo RR sob concentração normal de Mn. De modo geral, o excesso de Mn levou a um aumento na concentração de carotenoides em BMX Apolo RR, enquanto em AN 8500 houve manutenção dessas concentrações. Somente o pré-tratamento com H₂O₂ reduziu as concentrações de carotenoides em BRS Taura RR.

Os carotenoides participam do processo de fotossíntese, atuando como protetores do aparato fotossintético, antioxidantes e estabilizadores do

fotossistema I (FOYER; SHIGEOKA, 2011; GILL; TUTEJA, 2010). Nesse sentido, níveis mais elevados de carotenoides podem ter contribuído, também, para a manutenção dos níveis de clorofila em plantas sob estresse por excesso de manganês, uma vez que essas substâncias atuam na dissipação de energia e proteção do aparato fotossintético na situação de estresse (GILL; TUTEJA, 2010). Plantas com superexpressão de genes relacionados à síntese de carotenoides apresentaram maior tolerância à salinidade (KIM et al., 2012) e à seca (DU et al., 2010), uma vez que, além de terem a síntese de carotenoides aumentada, apresentaram maior tolerância ao estresse oxidativo e manutenção do aparato fotossintético. Ao contrário dos resultados deste trabalho, em *Citrus grandis* houve a manutenção dos teores de carotenoides em plantas sob excesso de manganês (LI et al., 2010b), que foi acompanhado pela manutenção dos níveis de clorofila.

Com relação à taxa assimilatória líquida, não houve diferença entre os tratamentos com concentração normal e excesso de Mn para BRS Taura RR e BMX Apolo RR, enquanto menores valores foram encontrados para AN 8500 sob excesso de Mn. O pré-tratamento com H₂O₂ elevou A nos genótipos BMX Apolo RR e AN 8500 e manteve em BRS Taura, quando comparados com as plantas não pré-tratadas e submetidas ao excesso de manganês. Por outro lado, o pré-tratamento com sacarose elevou A em AN 8500 e reduziu em BRS Taura RR e BMX Apolo RR em relação àquelas sob excesso de Mn. AN 8500 apresentou menores valores de A nos tratamentos de normal Mn e excesso de Mn, BMX Apolo RR apresentou os maiores valores no pré-tratamento com H₂O₂ e os menores no pré-tratamento com sacarose.

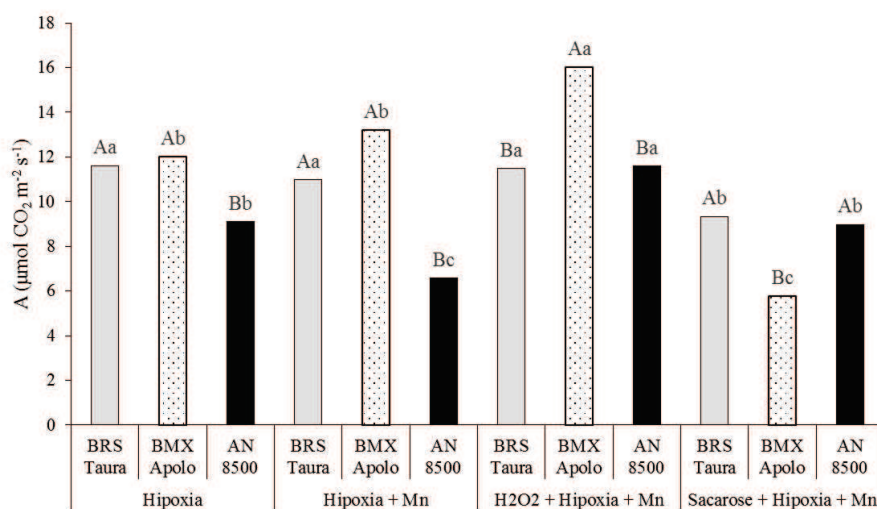


Figura 10 Taxa assimilatória líquida (A) de plantas de soja sob diferentes tratamentos: normal Mn, excesso de Mn, pré-tratamento com H₂O₂ + excesso de manganês (H₂O₂ + excesso de manganês) e pré-tratamento com sacarose + excesso de manganês (Sacarose + Excesso Mn). As letras maiúsculas comparam os genótipos em cada tratamento, enquanto as letras minúsculas comparam os tratamentos em cada genótipo, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A taxa transpiratória foi mais elevada em BMX Apolo RR e AN 8500 sob concentrações normais do que sob excesso Mn, enquanto para BRS Taura não houve diferenças entre os dois tratamentos. Quanto à influência dos pré-tratamentos, o H₂O₂ exógeno aumentou a transpiração dos três genótipos, enquanto a sacarose manteve E em BRS Taura RR, reduziu em BMX Apolo RR e aumentou em AN 8500. A taxa transpiratória foi mais elevada em BMX Apolo RR nos tratamentos normal Mn e pré-tratamento com H₂O₂, enquanto as menores taxas no pré-tratamento com sacarose também foram encontradas nesse genótipo. Para o tratamento de excesso de Mn menores taxas ocorreram em AN 8500.

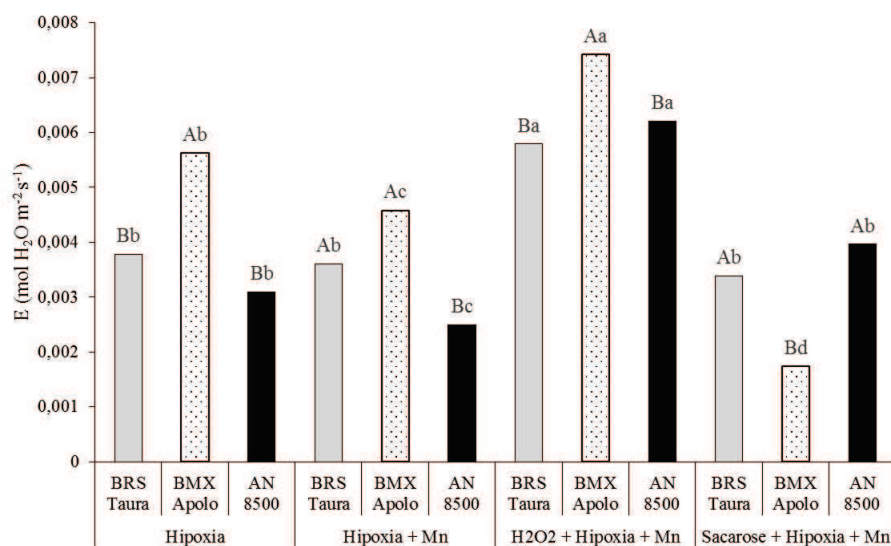


Figura 11 Taxa transpiratória (E) de plantas de soja sob diferentes tratamentos: normal Mn, excesso de Mn, pré-tratamento com H₂O₂ + excesso de manganês (H₂O₂ + excesso de manganês) e pré-tratamento com sacarose + excesso de manganês (Sacarose + Excesso Mn). As letras maiúsculas comparam os genótipos em cada tratamento, enquanto as letras minúsculas comparam os tratamentos em cada genótipo, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

O excesso de Mn, bem como os pré-tratamentos com H₂O₂ e sacarose causaram variações nas taxas assimilatória líquida e transpiratória dos genótipos deste estudo. O pré-tratamento com H₂O₂ levou à ocorrência de maiores taxas de A e E. O excesso de Mn está relacionado à redução nos teores de clorofila, seguida de redução nas taxas assimilatória líquida e transpiratória e na condutância estomática (LI et al., 2010b; MILLALEO et al., 2010). O Mn prejudica a etapa fotoquímica, reduzindo o número de equivalentes redutores formados e, conseqüentemente, comprometendo a assimilação de CO₂. A etapa fotoquímica é limitada pela maior dissipação de energia e é seguida de menores atividades carboxilase e oxigenase da Rubisco (LI et al., 2010b; SAINT CLAIR; LYNCH, 2004). O fotossistema I é mais afetado pelo excesso de Mn, uma vez

que apresenta menor taxa de fotoxidação em virtude do número reduzido de polipeptídeos dos centros de reação e redução no fluxo cíclico de elétrons. Esse comprometimento do PS I gera uma redução na atividade do PS II (MILLALEO et al., 2013).

O pré-tratamento com H_2O_2 promove o aumento na condutância estomática, taxa fotossintética líquida, concentração interna de CO_2 (AFTAB et al., 2011; AHMAD et al., 2013; ISHIBASHI et al., 2011; TERZI et al., 2014). Assim sendo, a aplicação de H_2O_2 exógeno vem sendo utilizada tanto para melhorar a produção de espécies vegetais quanto para aumentar a tolerância a diferentes tipos de estresse, tais como salinidade, seca, dentre outros.

A aplicação de açúcares também é utilizada visando ao aumento na assimilação de carbono para otimizar a produção ou a tolerância de espécies vegetais a estresses bióticos e abióticos. A aplicação de P6, um oligossacarídeo sintético, aumentou o conteúdo de clorofila, taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática em plantas de *Cucumis sativus* (MENG et al., 2013). Também a aplicação de manitol aumentou os níveis de clorofilas em plantas de milho sob estresse salino (KAYA et al., 2013). Trealose exógena levou a um aumento na taxa fotossintética líquida e manutenção da taxa transpiratória e da condutância estomática em milho sob estresse por seca (ALI; ASHRAF, 2011). Nesse sentido, a atuação dos açúcares é exatamente proteger o aparato fotossintético (ALI; ASHRAF, 2011) contra o estresse oxidativo gerado pelo excesso de Mn.

Neste estudo, para plantas de soja submetidas ao excesso de Mn, os pré-tratamentos com H_2O_2 e sacarose foram válidos no sentido de aumentar a taxa assimilatória líquida em dois dos três genótipos em estudo (BMX Apolo RR e AN 8500).

A fotossíntese dos genótipos BRS Taura RR e BMX Apolo RR não variou entre concentrações normais e excesso de Mn, enquanto AN 8500 teve

uma redução na fotossíntese sob excesso de manganês. No entanto, as variações na taxa assimilatória líquida em AN 8500 não causaram alterações no padrão de acúmulo de massa seca entre os tratamentos, uma vez que esse acúmulo foi constante (Figura 5). No caso de BMX Apolo RR o incremento de A resultou em maior acúmulo de massa seca no pré-tratamento com H_2O_2 . Em BRS Taura RR, a manutenção da taxa assimilatória líquida nos tratamentos de excesso de Mn e pré-tratamento com H_2O_2 não refletiu no acúmulo de massa seca, que foi menor quando comparado às plantas submetidas a concentrações normais de Mn. Embora o pré-tratamento com sacarose tenha reduzido a taxa assimilatória líquida de BRS Taura, houve maior crescimento de raízes em comparação com excesso de Mn.

As variáveis que estiveram mais relacionadas à variação dos dados de parte aérea deste estudo foram os teores de pigmentos fotossintéticos e taxas assimilatória líquida e transpiratória. As variáveis ligadas ao sistema antioxidante não estiveram relacionadas com a maior fonte de variação dos dados, mas contribuíram para a variação de outras componentes.

Em geral, a atividade do sistema antioxidante com as enzimas SOD, APX, CAT e concentrações de ascorbato e peróxido de hidrogênio é influenciada por estresses bióticos e abióticos (MITTLER, 2002; SUZUKI et al., 2012). Espécies tolerantes respondem ao estresse com um incremento na atividade do sistema antioxidante para a manutenção da homeostase celular. A neutralização das EROs geradas pode resultar em menos danos à célula, representados por menores níveis de peroxidação lipídica (GECHEV et al., 2006). Nesse sentido, embora a atividade do sistema antioxidante tenha contribuído para a proteção dos genótipos submetidos aos estresses, os parâmetros relacionados à fotossíntese foram os que mais contribuíram para a variação dos dados.

A atividade de enzimas do sistema antioxidante é influenciada pelos tratamentos com excesso de Mn em diferentes espécies, sendo que, geralmente, há aumento na atividade das enzimas antioxidantes e redução na concentração de antioxidantes não-enzimáticos (LIU et al., 2010a; MORA et al., 2009; REZAI; FARBOODNIA, 2008; SHI et al., 2006; SRIVASTAVA; DUBEY, 2012; WILLIAMS; PITTMAN, 2010). Em geral, genótipos tolerantes apresentam maior incremento na atividade das enzimas antioxidantes, conseguindo manter a homeostase celular (MORA et al., 2009) e suportar o estresse.

De acordo com o exposto, é possível observar que houve uma variedade de respostas dos genótipos ao excesso de manganês. O genótipo BMX Apolo RR apresentou respostas semelhantes entre normal Mn e excesso de Mn, fornecendo indícios de sua tolerância a ambos os estresses. O pré-tratamento com H₂O₂ melhorou ainda mais a resposta dessas plantas ao excesso de manganês. AN 8500 apresentou respostas semelhantes para todos os tratamentos e os pré-tratamentos melhoraram parte das respostas fisiológicas ao excesso de manganês. BRS Taura RR mostrou-se menos tolerante ao excesso de manganês e os pré-tratamentos não mantiveram a atividade fotossintética desse genótipo.

Após a avaliação das respostas da parte aérea dos genótipos ao excesso de manganês e aos pré-tratamentos, as respostas das raízes também foram estudadas. Assim, as variáveis foram submetidas à análise de componentes principais (Figura 12).

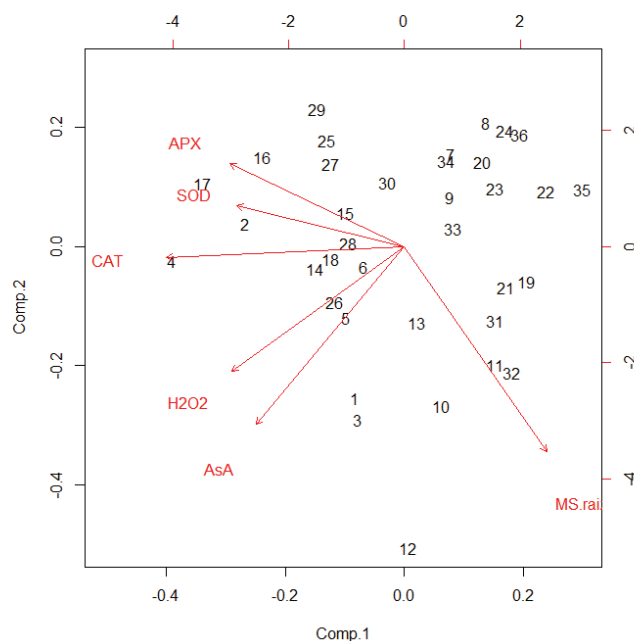


Figura 12 Análise de componentes principais das variáveis paramétricas relacionadas à variação da resposta de raízes de plantas soja submetidas aos tratamentos normal Mn, excesso de Mn, pré-tratamento com H_2O_2 + excesso de manganês (H_2O_2 + excesso de manganês) e pré-tratamento com sacarose + excesso de manganês (Sacarose + Excesso Mn).

As variáveis que apresentaram maior influência sobre a componente de maior variação (Comp. 1) foram massa seca de raízes, atividade da CAT, atividade da SOD, atividade da APX e peróxido de hidrogênio. A concentração de H_2O_2 , assim como a atividade da APX também influenciou a segunda componente de maior variação (Comp. 2). Os resultados da análise de componentes principais de raízes se diferiram daqueles encontrados para a parte aérea. Enquanto na parte aérea a atividade das enzimas antioxidantes apresentaram menor influência sobre a variação dos dados, nas raízes a resposta antioxidante foi responsável por essa variação.

Quanto à resposta das enzimas antioxidantes, a atividade da SOD nos genótipos BMX Apolo RR e AN 8500 foi maior em plantas submetidas ao excesso de Mn, enquanto em BRS Taura RR a maior atividade ocorreu sob concentração normal de Mn (Figura 13). Os pré-tratamentos reduziram a atividade da SOD em relação ao tratamento de excesso de Mn. Somente em BRS Taura RR o pré-tratamento com H₂O₂ manteve a atividade da SOD semelhante àquela do tratamento de elevada concentração de Mn.

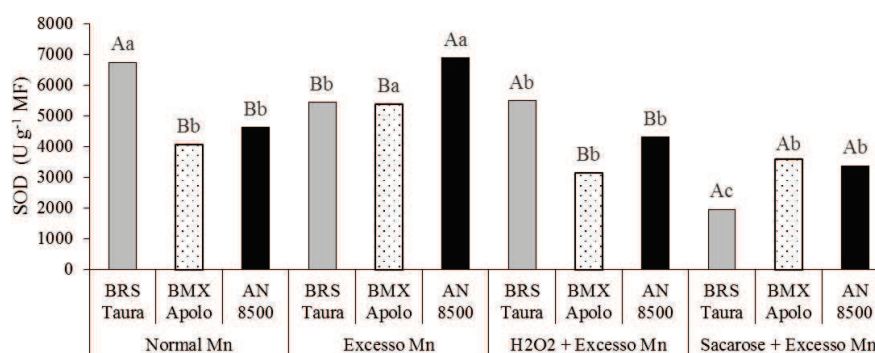


Figura 13 Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em raízes de soja sob diferentes tratamentos: normal Mn, excesso de Mn, pré-tratamento com H₂O₂ + excesso de manganês (H₂O₂ + excesso de manganês) e pré-tratamento com sacarose + excesso de manganês (Sacarose + Excesso Mn). As letras maiúsculas comparam os genótipos em cada tratamento, enquanto as letras minúsculas comparam os tratamentos em cada genótipo, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A SOD é a primeira linha de defesa do sistema antioxidante, fazendo a dismutação de radicais superóxido e produzindo H₂O₂, que será neutralizado pela ação das enzimas CAT e APX (GILL; TUTEJA, 2010).

Nesse contexto, a atividade da CAT em plantas de todos os genótipos não se diferiu entre os tratamentos de concentração normal e excesso de manganês (Figura 14). Os pré-tratamentos com H₂O₂ e sacarose reduziram a

atividade da CAT em todos os genótipos, quando comparados ao tratamento ao excesso de Mn, exceto para sacarose na BRS Taura RR, que manteve a atividade dessa enzima.

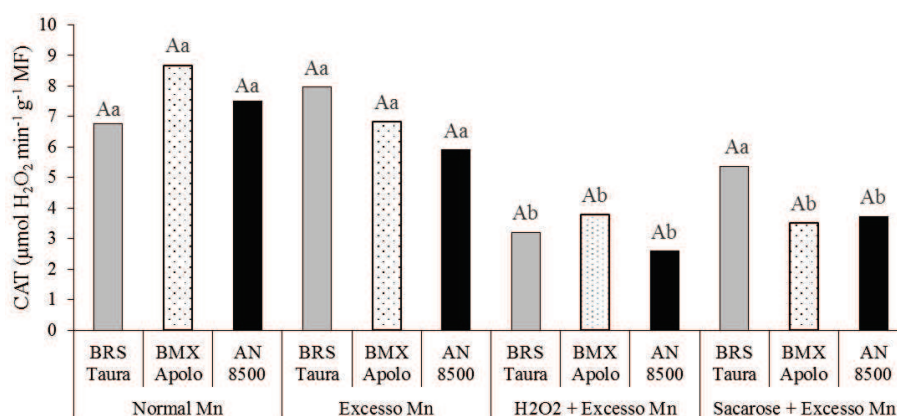


Figura 14 Atividade da catalase (CAT) em raízes de soja sob diferentes tratamentos: normal Mn, excesso de Mn, pré-tratamento com H₂O₂ + excesso de manganês (H₂O₂ + excesso de manganês) e pré-tratamento com sacarose + excesso de manganês (Sacarose + Excesso Mn). As letras maiúsculas comparam os genótipos em cada tratamento, enquanto as letras minúsculas comparam os tratamentos em cada genótipo, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Com relação à APX, para os genótipos BRS Taura RR e BMX Apolo RR a atividade foi maior em excesso de Mn do que em normal Mn, enquanto em AN 8500 não houve diferença entre os dois tratamentos (Figura 15). Em geral, os pré-tratamentos com H₂O₂ e sacarose reduziram a atividade da APX em relação ao tratamento de elevada concentração de Mn, exceto para AN 8500 pré-tratada com sacarose, em que houve manutenção da atividade dessa enzima.

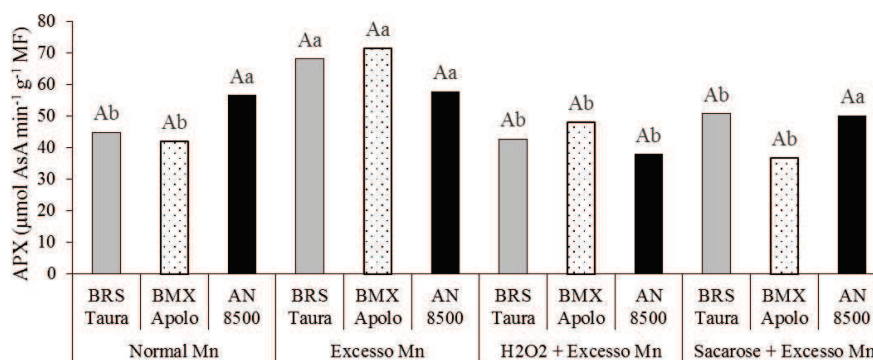


Figura 15 Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em raízes de soja sob diferentes tratamentos: normal Mn, excesso de Mn, pré-tratamento com H₂O₂ + excesso de manganês (H₂O₂ + excesso de manganês) e pré-tratamento com sacarose + excesso de manganês (Sacarose + Excesso Mn). As letras maiúsculas comparam os genótipos em cada tratamento, enquanto as letras minúsculas comparam os tratamentos em cada genótipo, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

O comportamento dos genótipos foi diferenciado quanto à atividade das enzimas SOD, CAT e APX em resposta aos diferentes tratamentos. Enquanto a atividade das enzimas foi semelhante para os genótipos BMX Apolo RR e AN 8500, houve uma tendência de BRS Taura RR em apresentar um comportamento diferente dos outros genótipos.

As enzimas antioxidantes agiram em sincronia em resposta ao estresse. As atividades da SOD e da APX foram elevadas em resposta ao excesso de Mn, enquanto a atividade da CAT não se diferiu das concentrações normais de Mn. Esse sincronismo entre as três enzimas do sistema antioxidante favorece a neutralização das espécies reativas de oxigênio geradas em virtude do estresse, mantendo a homeostase celular.

De modo geral, a aplicação dos pré-tratamentos levou a uma diminuição na atividade das enzimas, quando comparados com o tratamento com elevadas concentrações de Mn. Essa redução na atividade enzimática pode ter ocorrido

pelo fato de que os pré-tratamentos levaram à maior translocação do Mn de raízes para parte aérea, mantendo menor conteúdo desse elemento nas raízes (Tabela 2). Menores concentrações de metal nas raízes causam menor estresse oxidativo, gerando menos EROs e permitindo que as enzimas antioxidantes possam manter a homeostase. Por outro lado, há que se considerar que o pré-tratamento com H_2O_2 possa ter preparado o sistema antioxidante, já no início da aplicação do estresse, uma vez que essa espécie reativa de oxigênio está relacionada ao processo de sinalização de resposta a estresses bióticos e abióticos (GECHEV et al., 2006; PETROV; VAN BREUSEGEM, 2012). Dessa maneira, as menores atividades do sistema antioxidante, aos 15 dias de estresse por excesso de Mn, podem ter sido proporcionadas pelo preparo do aparato antioxidante, já no início do estresse, reduzindo a concentração de espécies reativas de oxigênio.

Os açúcares têm suas funções como antioxidantes cada vez mais exploradas e compreendidas (KEUNEN et al., 2013). Os carboidratos estão relacionados com a manutenção da homeostase celular pelo controle das EROs, geradas em virtude do estresse (COUÉE et al., 2006). Os açúcares solúveis estão localizados em diferentes organelas, inclusive no vacúolo celular, onde desempenham sua função auxiliando na tolerância a diferentes estresses (KEUNEN et al., 2013).

Plantas submetidas ao excesso de Mn tendem a aumentar a atividade das enzimas do sistema antioxidante em raízes e folhas (MORA et al., 2009; MOU et al., 2011; REZAI; FARBOODNIA, 2008; SRIVASTAVA; DUBEY, 2010; SRIVASTAVA; DUBEY, 2012). Cultivares tolerantes foram identificadas pelas maiores atividades da APX (LEI; KORPELAINEN; LI, 2007) e da SOD (MOU et al., 2011). Em contrapartida, conforme observado neste estudo, em raízes de citrus a atividade das enzimas antioxidantes foi semelhante ou inferior em plantas sob excesso de manganês, quando comparadas com as controle (LI et al.,

2010b). Também houve redução na atividade da CAT em *Lolium perenne* e em *Lycopersicum esculentum* sob excesso de Mn, independentemente do nível de tolerância das plantas (LIU et al., 2010a; MORA et al., 2009). Menor atividade da APX foi encontrada em plantas de *Lycopersicum esculentum* sob hipoxia + Mn do que sob hipoxia (LIU et al., 2010a).

Ao contrário do que foi observado em soja sob excesso de manganês, o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio aumentou a atividade das enzimas antioxidantes e manteve a estrutura dos cloroplastos em plantas de *Cucumis sativus* submetidas a elevadas temperaturas (GAO et al., 2010) e aumentou a atividade das enzimas em plantas de *Lycopersicon esculentum* submetidas ao frio (İŞERI et al., 2013). Também promoveu o aumento na atividade de enzimas antioxidantes em plantas de *Artemisia annua* e *Zea mays* mesmo quando não submetidas a estresses (AFTAB et al., 2011; AHMAD et al., 2013).

Com relação aos açúcares, a aplicação de manitol em plantas de *Zea mays* submetidas ao estresse por salinidade reduziu a atividade das enzimas do sistema antioxidante (KAYA et al., 2013). A redução na atividade das enzimas foi atribuída à capacidade antioxidante dos açúcares, reduzindo o estresse oxidativo. A tolerância promovida pelos pré-tratamentos pode estar relacionada com a prevenção da ocorrência de estresse oxidativo (SRIVASTAVA; DUBEY, 2012). Por outro lado, a aplicação de trealose levou a um aumento na atividade de algumas enzimas antioxidantes de *Zea mays* sem resposta à seca (ALI; ASHRAF, 2011).

Com relação aos pré-tratamentos relacionados ao excesso de Mn, o pré-tratamento com NO reduziu a atividade das enzimas do sistema antioxidante em *Oryza sativa* submetido ao excesso de manganês. Esse composto atuou reduzindo o estresse oxidativo (SRIVASTAVA; DUBEY, 2012), o que foi comprovado pelos menores níveis de H₂O₂ e MDA nas plantas tratadas com NO. Pode-se considerar que a redução na atividade das enzimas e das concentrações

de H_2O_2 e MDA ocorreu porque esse composto evitou o aumento dos mesmos, estimulado pelo excesso de manganês. O pré-tratamento com silício aumentou a atividade das enzimas do sistema antioxidante e reduziu a peroxidação lipídica em *Cucumis sativus* (SHI et al., 2005).

O excesso de manganês, assim como os pré-tratamentos influenciaram a atividade das enzimas antioxidantes. No que se refere aos níveis de peróxido de hidrogênio (Figura 16), para todos os genótipos foram semelhantes entre os tratamentos de normal e excesso de manganês. Enquanto os pré-tratamentos mantiveram a geração de H_2O_2 em BRS Taura RR, levaram à redução na formação dessa espécie reativa de oxigênio em BMX Apolo RR e AN 8500 quando comparadas ao tratamento de elevadas concentrações de Mn.

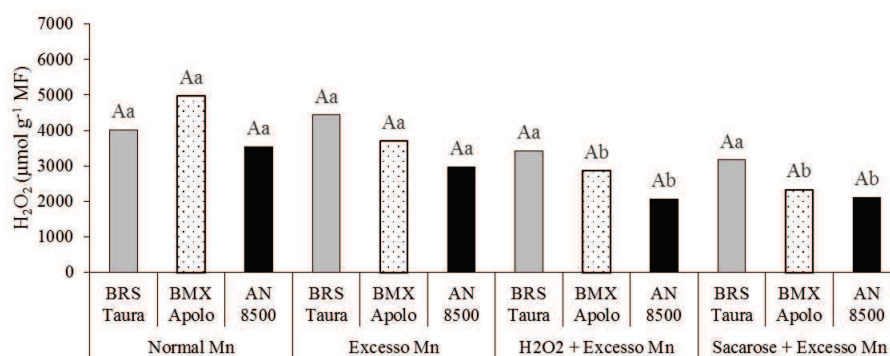


Figura 16 Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em raízes de soja sob diferentes tratamentos: normal Mn, excesso de Mn, pré-tratamento com H_2O_2 + excesso de manganês (H_2O_2 + excesso de manganês) e pré-tratamento com sacarose + excesso de manganês (Sacarose + Excesso Mn). As letras maiúsculas comparam os genótipos em cada tratamento, enquanto as letras minúsculas comparam os tratamentos em cada genótipo, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

As concentrações de H_2O_2 não variaram entre plantas sob concentrações normais e excessivas de Mn, assim como observado em *Vigna unguiculata* em que o genótipo tolerante apresentou pequenas variações nos níveis de H_2O_2 sob

o excesso de Mn (FECHT-CHRISTOFFERS et al., 2006). Entretanto, no pré-tratamento com H₂O₂ e sacarose a menor atividade das enzimas antioxidantes e menor geração de H₂O₂ em raízes de soja podem estar relacionadas à maior translocação de Mn para a parte aérea. Contrastando com os resultados deste estudo, o excesso de manganês gerou um aumento nos níveis de H₂O₂ em plantas *Oryza sativa* (SRIVASTAVA; DUBEY, 2010; SRIVASTAVA; DUBEY, 2012). A aplicação de H₂O₂ reduziu a geração de H₂O₂ e os níveis de MDA em plantas sob estresse por elevadas temperaturas (GAO et al., 2010), estresse osmótico (TERZI et al., 2014) ou apenas pré-tratadas (AFTAB et al., 2011). Entretanto, o pré-tratamento com H₂O₂ manteve a produção de peróxido em plantas de *Lycopersicon esculentum* tomate pré-tratadas e submetidas ao frio (İŞERI et al., 2013). O H₂O₂ exógeno também está relacionado à maior produção de compostos osmoticamente ativos, tais como prolina e açúcares solúveis (TERZI et al., 2014). Nesse sentido, a ação do pré-tratamento pode estar relacionada à produção de compostos antioxidantes para a defesa contra o estresse oxidativo, reduzindo a geração de espécies reativas de oxigênio, assim como de compostos osmoticamente ativos. A aplicação de açúcares também influenciou a geração de H₂O₂ em diferentes espécies. Aplicação de manitol reduziu a geração de H₂O₂ (KAYA et al., 2013) e o extravasamento de eletrólitos.

Com relação ao excesso de Mn, o pré-tratamento com silício reduziu a geração de espécies reativas de oxigênio submetidas ao excesso de Mn em *Cucumis sativus* (SHI et al., 2005). O óxido nítrico exógeno também reduziu os níveis de H₂O₂ gerado em função do excesso de Mn em *Oryza sativa* (SRIVASTAVA; DUBEY, 2012). Entretanto, NO apenas manteve os níveis de H₂O₂ gerado em *Matricaria chamomilla*, mas ainda assim reduziu os níveis de peroxidação lipídica (KOVÁČIK et al., 2014).

Os genótipos apresentaram semelhanças entre as respostas do sistema radicular aos pré-tratamentos, que levaram a uma redução ou manutenção na

atividade das enzimas antioxidantes. Também os aspectos visuais do sistema radicular das plantas foram bastante semelhantes, em que as raízes eram mais volumosas e apresentavam menores sintomas de toxicidade (Figuras 1, 2 e 3). Por outro lado, houve uma tendência de que as respostas bioquímicas fossem semelhantes entre os tratamentos de concentrações normais e elevadas de Mn. Essa semelhança de resposta do sistema radicular pode estar relacionada aos danos causados pela hipoxia e pelo excesso de Mn ao sistema radicular, que foi demonstrado pela presença de raízes escurecidas e com menor volume. No entanto, a diferença de resposta do sistema antioxidante não teve uma estreita relação com o acúmulo de massa seca na parte aérea. Somente os pré-tratamentos com H_2O_2 e a sacarose promoveram o crescimento radicular em BMX Apolo RR e BRS Taura RR, respectivamente (Figura 6).

No genótipo BMX Apolo RR o excesso de manganês levou ao aumento na atividade de SOD e APX, não alterou a atividade da CAT, mas foi eficiente para manter as baixas concentrações de H_2O_2 , evitando a ocorrência de estresse oxidativo. Assim como verificado para parte aérea, o pré-tratamento com H_2O_2 promoveu o acúmulo de massa seca nas raízes desse genótipo. A AN 8500 apresentou comportamento semelhante à BMX Apolo RR, entretanto o excesso de Mn alterou somente a atividade da SOD e foi suficiente para manter os níveis de H_2O_2 . Diferentemente da BMX Apolo RR, plantas de AN 8500 apresentaram acúmulo de massa seca semelhante para todos os tratamentos.

Para BRS Taura RR, o excesso de Mn levou a uma redução na atividade da SOD, manteve CAT e aumentou APX em relação às concentrações normais desse elemento. Embora os pré-tratamentos não tenham reduzido os níveis de H_2O_2 gerado, o pré-tratamento com sacarose levou a um maior acúmulo de massa seca nas raízes desse genótipo. Essa manutenção do crescimento pode ter ocorrido, porque embora o teor de H_2O_2 tenha sido mantido, a atividade das

enzimas foi suficiente para proteger as membranas celulares contra danos causados por EROs (KOVÁČIK et al., 2014).

Os pré-tratamentos, de modo geral, reduziram a atividade das enzimas antioxidantes nas raízes, quando comparadas ao tratamento de excesso de Mn. Essa menor atividade das enzimas pode estar relacionada ao fato de que os pré-tratamentos levaram a uma maior translocação de Mn para a parte aérea. Assim, genótipos pré-tratados tiveram menor conteúdo de Mn em suas raízes, levando a um menor estresse oxidativo nesses órgãos. Uma outra consideração importante a ser feita é que plantas pré-tratadas absorveram em média maiores quantidades de Mn, apresentando maiores concentrações e conteúdo desse elemento em relação aos tratamentos com concentrações normais ou excessivas de Mn. Uma vez que as concentrações de Mn foram diferentes entre raízes e parte aérea, surge o questionamento quanto à resposta antioxidante diferenciada entre esses órgãos, o que já foi reportado em plantas de *Citrus grandis* submetidas ao excesso de Mn (LI et al., 2010b).

Conforme exposto, plantas de BMX Apolo RR e de AN 8500 apresentaram menor formação de EROs e menor atividade das enzimas antioxidantes nas raízes, sugerindo que os pré-tratamentos reduziram o estresse oxidativo nessas plantas. Uma vez que houve maior concentração de Mn na parte aérea, surgiu a hipótese de que a presença desse elemento tenha causado maior estresse oxidativo. Entretanto, a manutenção ou acréscimo dos níveis de clorofila, bem como a manutenção da concentração de carotenoides, sugerem que esse estresse não ocorreu de forma tão severa, uma vez que não houve a degradação de pigmentos fotossintéticos em virtude da presença de manganês. No caso do pré-tratamento com H₂O₂, a manutenção ou incremento na taxa assimilatória líquida, também sugere que houve a manutenção do aparato fotossintético, que culminou com maior acúmulo de massa seca.

5 CONCLUSÃO

Existe uma semelhança entre a tolerância ao alagamento e ao excesso de manganês nos genótipos analisados. Genótipos diferentes respondem de maneira diferenciada ao excesso de manganês, comprovando as variações de respostas ao excesso de manganês. BRS Taura RR se comporta como sensível, BMX Apolo RR se comporta como tolerante, enquanto AN 8500, cuja tolerância era desconhecida, apresenta comportamento semelhante ao genótipo tolerante ao excesso de manganês. Os pré-tratamentos atenuam os sintomas de toxicidade por manganês, assim como a geração de espécies reativas de oxigênio nos genótipos mais tolerantes. Enquanto o peróxido de hidrogênio tem maior efetividade na promoção de respostas adaptativas nos genótipos BMX Apolo RR e AN 8500, a sacarose é mais eficiente para o genótipo BRS Taura RR, permitindo manutenção do conteúdo de clorofila e crescimento das plantas. Os efeitos benéficos dos pré-tratamentos podem estar relacionados ao fato de os pré-tratamentos reduzirem a translocação do manganês para a parte aérea.

REFERÊNCIAS

- ABASS, S. M.; MOHAMED, H. I. Alleviation of adverse effects of drought stress on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) By exogenous application of hydrogen peroxide. **Bangladesh Journal of Botany**, Dhaka, v. 41, n. 1, p. 75–83, June 2011.
- AFTAB, T. et al. Growth, photosynthetic efficiency and metabolic alterations associated with exogenous hydrogen peroxide in *Artemisia annua*: Overproduction of artemisinin. **Russian Agricultural Sciences**, Moscow, v. 37, n. 3, p. 212–219, Aug. 2011.
- AHMAD, I. et al. Growth improvement in spring maize through exogenous application of ascorbic acid, salicylic acid and hydrogen peroxide. **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 15, n. 1, p. 95–100, Feb. 2013.
- AHN, Y. O. et al. Exogenous sucrose utilization and starch biosynthesis among sweet potato cultivars. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 345, n. 1, p. 55–60, Jan. 2010.
- ALI, Q.; ASHRAF, M. Induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: growth, photosynthesis, water relations and oxidative defence mechanism. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, v. 197, n. 5, p. 258–271, Feb. 2011.
- ARAKAWA, N. et al. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 45, n. 5, p. 1289–1290, May 1981.
- BAUD, D. R.; PEZESHKI, S. R. Adventitious rooting response in salix nigra and acer negundo cuttings to exogenous sucrose. **Environment, Ecology and Management**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 44–55, Mar. 2013.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. 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.

BROWN, J. C.; DEVINE, T. E. Inheritance of tolerance or resistance to manganese toxicity in soybeans. **Agronomy Journal**, Madison, v. 72, n. 6, p. 898–904, 1980.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p. 302–310, Feb. 1978.

CALAMAR, A.; KLERK, G. de. Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 70, n. 2, p. 207–212, Aug. 2002.

CAMARGO, F. A. O.; SANTOS, G. A.; ZONTA, E. Alterações eletroquímicas em solos inundados. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 171–180, jan./mar. 1999.

CARTER, O. G.; ROSE, I. A.; READING, P. F. Variation in susceptibility to manganese toxicity in 30 soybean genotypes. **Crop Science**, Madison, v. 15, n. 5, p. 730–732, June. 1975.

COUÉE, I. et al. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 449–59, Jan. 2006.

DU, H. et al. Characterization of the beta-carotene hydroxylase gene DSM2 conferring drought and oxidative stress resistance by increasing xanthophylls and abscisic acid synthesis in rice. **Plant physiology**, Rockville, v. 154, n. 3, p. 1304–18, Nov. 2010.

EL JAOUAL, T.; COX, D. A. Manganese toxicity in plants. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 21, n. 2, p. 353–386, Nov. 1998.

FECHT-CHRISTOFFERS, M. M. et al. The role of hydrogen peroxide-producing and hydrogen peroxide-consuming peroxidases in the leaf apoplast of cowpea in manganese tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 4, p. 1451–1463, Feb. 2006.

FECHT-CHRISTOFFERS, M. M.; MAIER, P.; HORST, W. J. Apoplastic peroxidases and ascorbate are involved in manganese toxicity and tolerance of *Vigna unguiculata*. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 117, n. 2, p. 237–244, Mar. 2003.

FOY, C. D.; CHANEY, R. L.; WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Reviews of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 29, n. 1, p. 511–566, June 1978.

FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 155, n. 1, p. 93–100, Jan. 2011.

FÜHRS, H. et al. Functional associations between the metabolome and manganese tolerance in *Vigna unguiculata*. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 329–340, Jan. 2012.

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, n. 1, p. 20–26, Aug. 2010.

GECHEV, T. S. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, Cambridge, v. 28, n. 11, p. 1091–101, Nov. 2006.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, 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 : société française de physiologie végétale**, Paris, v. 48, n. 12, p. 909–930, Dec. 2010.

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.

HEENAN, D. P.; CARTER, O. G. Influence of temperature on the expression of manganese toxicity by two soybean varieties. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 47, n. 1, p. 219–227, May 1977.

HEENAN, D. P.; CARTER, O. G. Tolerance of soybean cultivars to manganese toxicity. **Crop Science**, Madison, v. 16, n. 3, p. 389–391, May 1976.

IMSANDE, J.; RALSTON, E. J. Hydroponic growth and the nondestructive assay for dinitrogen fixation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 68, n. 6, p. 1380–1384, Dec. 1981.

INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ. **Irga divulga estimativa da Safra 2013/2014**. Porto Alegre: Irga, 2013. Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br/conteudo/4253/irga-divulga-estimativa-da-safra-2013/2014>>. Acesso em: 01 jul. 2014.

IŞERI, Ö. D. et al. Hydrogen peroxide pretreatment of roots enhanced oxidative stress response of tomato under cold stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 35, n. 6, p. 1905–1913, Feb. 2013.

ISHIBASHI, Y. et al. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 168, n. 13, p. 1562–1567, Sept. 2011.

KAWAI-YAMADA, M.; OHORI, Y.; UCHIMIYA, H. Dissection of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 Suppressing Bax-, Hydrogen Peroxide-, and Salicylic Acid-Induced Cell Death. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 16, n. 1, p. 21-32, Jan. 2004.

KAYA, C. et al. Exogenous application of mannitol and thiourea regulates plant growth and oxidative stress responses in salt-stressed maize (*Zea mays* L.). **Journal of Plant Interactions**, Oxon, v. 8, n. 3, p. 234–241, Sept. 2013.

KEUNEN, E. et al. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 1242–1255, Jan. 2013.

KHABAZ-SABERI, H. et al. Variation of tolerance to manganese toxicity in Australian hexaploid wheat. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 173, n. 1, p. 103–112, Feb. 2010.

KHABAZ-SABERI, H.; BARKER, S. J.; RENGEL, Z. Tolerance to ion toxicities enhances wheat (*Triticum aestivum* L.) grain yield in waterlogged acidic soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 354, n. 1-2, p. 371–381, Dec. 2011.

KHABAZ-SABERI, H.; RENGEL, Z. Aluminum, manganese, and iron tolerance improves performance of wheat genotypes in waterlogged acidic soils. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 173, n. 3, p. 461–468, June 2010.

KHABAZ-SABERI, H. et al. Variation of tolerance to manganese toxicity in Australian hexaploid wheat. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, New York, v. 173, n. 1, p. 103–112, Feb. 2010.

KIM, S. H. et al. Down-regulation of β -carotene hydroxylase increases β -carotene and total carotenoids enhancing salt stress tolerance in transgenic cultured cells of sweetpotato. **Phytochemistry**, Oxford, v. 74, p. 69–78, Feb. 2012.

KONGAKE, S. et al. Salt tolerance enhancement in indica rice ('*Oryza sativa*' L. spp. indica) seedlings using exogenous sucrose supplementation. **Plant Omics**. Lismore Nsw, v. 5, n. 1, Jan. 2012.

KOVÁČIK, J. et al. Manganese-induced oxidative stress in two ontogenetic stages of chamomile and amelioration by nitric oxide. **Plant science**, Clare, v. 215-216, n. 1, p. 1–10, Feb. 2014.

LAVRES JUNIOR, J. et al. Influência genotípica na absorção e na toxidez de manganês em soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 1, p. 173–181, jan./fev. 2008.

LEI, Y.; KORPELAINEN, H.; LI, C. Physiological and biochemical responses to high Mn concentrations in two contrasting *Populus cathayana* populations. **Chemosphere**, Oxford v. 68, n. 4, p. 686–694, June 2007.

LI, J.-T. et al. Exogenous hydrogen peroxide can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 33, n. 3, p. 835–842, Sept. 2010a.

LI, Q. et al. Effects of manganese-excess on CO₂ assimilation, carbohydrates and photosynthetic electron transport of leaves, and antioxidant systems of leaves and roots in *Citrus grandis* seedlings. **BMC Plant Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 1–16, Mar. 2010b.

LI, S. et al. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, n. 1, p. 63–71, Jan. 2009.

LI, S. et al. Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 52, n. 2, p. 173–180, May 2007.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, 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: John Wiley & Sons, 2001. p. F4.3.1-F4.3.8.

LIU, A. et al. Effects of hypoxia stress and different level of Mn²⁺ on antioxidant enzyme of tomato seedlings. **American Journal of Plant Sciences**, Washington, v. 1, n. 1, p. 24–31, Sept. 2010a.

LIU, P. et al. Manganese tolerance and accumulation in six Mn hyperaccumulators or accumulators. **Plant and Soil**, Dordrecht. v. 335, n. 1-2, p. 385–395, May 2010b.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba: Editora da FEALQ, 1989.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. New York: Academic Press, 1995.

MASCARENHAS, H. A. A. et al. Tolerância da soja ao manganês em solução nutritiva em três temperaturas. **Bragantia**, Campinas, v. 44, n. 2, p. 531–539, 1985.

MENG, X. et al. Photosynthesis regulation by glucohexaose through redox changes in *Cucumis sativus*. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 33, n. 3, p. 571–578, Sept. 2013.

MILLALEO, R. et al. Excess manganese differentially inhibits photosystem I versus II in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of experimental botany**, Oxford. v. 64, n. 2, p. 343–354, Jan. 2013.

MILLALEO, R. et al. Manganese as essential and toxic element for plants : transport , accumulation and resistance mechanisms. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 10, n. 4, p. 476–494, July 2010.

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

MORA, M. D. L. L. et al. Differential tolerance to Mn toxicity in perennial ryegrass genotypes: involvement of antioxidative enzymes and root exudation of carboxylates. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 320, n. 1-2, p. 79–89, Jan. 2009.

MOU, D. et al. Plant high tolerance to excess manganese related with root growth, manganese distribution and antioxidative enzyme activity in three grape cultivars. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 74, n. 4, p. 776–786, May 2011.

MUKHOPADHYAY, M. J.; SHARMA, A. Manganese in cell metabolism of higher plants. **The Botanical Review**, New York, v. 57, n. 2, p. 117–149, Apr./June 1991.

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.

OHKI, K. Manganese deficiency and toxicity levels for “Bragg” soybeans. **Agronomy Journal**, Madison, v. 68, n. 6, p. 861–864, Nov. 1976.

OJO, G. O. S.; BELLO, L. L.; ADEYEMO, M. O. Genotypic variation for acid stress tolerance in soybean in the humid rain forest acid soil of south Eastern Nigeria. **Journal of Applied Biosciences**, London, v. 36, p. 2360–2366, Dec. 2010.

PARASHAR, A. et al. Salicylic acid enhances antioxidant system in *Brassica juncea* grown under different levels of manganese. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 70, p. 551-558, Sept. 2014.

PETROV, V. D.; VAN BREUSEGEM, F. Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. **AoB Plants**, Oxford, v. 2012, p. pls014, June 2012.

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

REZAI, K.; FARBOODNIA, T. Manganese toxicity effects on chlorophyll content and antioxidant enzymes in pea plant (*Pisum sativum* L. c.v. qazyn). **Agricultural Journal**, Bridgetown, v. 3, n. 6, p. 454–458, Nov. 2008.

ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, n. 1, p. 675–709, Jan. 2006.

SAINT CLAIR, S. B.; LYNCH, J. P. Photosynthetic and antioxidant enzyme responses of sugar maple and red maple seedlings to excess manganese in contrasting light environments. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 31, n. 10, p. 1005–1014, Oct. 2004.

SHARMA, S. S.; DIETZ, K.-J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. **Trends in Plant Science**, London, v. 14, n. 1, p. 43–50, Jan. 2009.

SHI, Q. et al. Effect of excess manganese on the antioxidant system in *Cucumis sativus* L. under two light intensities. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 1-3, p. 197–205, Dec. 2006.

SHI, Q. et al. Silicon-mediated alleviation of Mn toxicity in *Cucumis sativus* in relation to activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase. **Phytochemistry**, Oxford, v. 66, n. 13, p. 1551–9, July 2005.

SRIVASTAVA, S.; DUBEY, R. S. Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 64, n. 1, p. 1–16, Sept. 2010.

SRIVASTAVA, S.; DUBEY, R. S. Nitric oxide alleviates manganese toxicity by preventing oxidative stress in excised rice leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 34, n. 2, p. 819–825, Oct. 2012.

SULLIVAN, M. et al. Evaluating on-farm flooding impacts on soybean. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 1, p. 93–99, Jan./Feb. 2001.

SUZUKI, N. et al. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 259–270, Feb. 2012.

TAKAHASHI, F. et al. Sugar-induced adventitious roots in *Arabidopsis* seedlings. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 116, n. 2, p. 83–91, Apr. 2003.

TERZI, R. et al. Hydrogen peroxide pretreatment induces osmotic stress tolerance by influencing osmolyte and abscisic acid levels in maize leaves. **Journal of Plant Interactions**, Oxon, v. 9, n. 1, p. 559–565, Jan. 2014.

TEWARI, R. K.; KUMAR, P.; SHARMA, P. N. Oxidative stress and antioxidant responses of mulberry (*Morus alba*) plants subjected to deficiency and excess of manganese. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 35, n. 12, p. 3345–3356, 7 Sept. 2013.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. et al. Subcellular localization of H₂O₂ in plants: H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during barley-powdery mildew interaction. **Plant Journal**, Hoboken, v. 11, n. 6, p. 1187-1194, June 1997.

VAN DEN ENDE, W.; EL-ESAWI, S. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation : a dual function in abiotic and biotic stress responses ? **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 108, p. 4-13, Dec. 2014.

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**, Limerick, v. 151, n. 1, p. 59-66, Feb. 2000.

VOESENEK, L. A C. J.; BAILEY-SERRES, J. Flooding tolerance: O₂ sensing and survival strategies. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 16, n. 5, p. 647–653, Oct. 2013.

WILLIAMS, L. E.; PITTMAN, J. K. Dissecting pathways involved in manganese homeostasis and stress in higher plant cells. In: HELL, R.; MENDEL, R.-R. (Org.). **Cell biology of metals and nutrients**: volume 17. Berlin: Springer, 2010. p. 95–117.

YIN, D. et al. Morpho-anatomical and physiological responses of two *Dendranthema* species to waterlogging. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 68, n. 2, p. 122–130, Apr. 2010.

ZENGIN, F. Biochemical and physiological effect of excess manganese (Mn) in Bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike). **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: biological sciences**, Washington, v. 83, n. 4, p. 651–657, Mar. 2013.