



CÍNTIA APARECIDA ANDRADE

**PRÉ-TRATAMENTO DE SACAROSE INDUZINDO
TOLERÂNCIA À HIPOXIA E AO EXCESSO DE MANGANÊS**

LAVRAS – MG

2017

CÍNTIA APARECIDA ANDRADE

**PRÉ-TRATAMENTO DE SACAROSE INDUZINDO TOLERÂNCIA À HIPOXIA E
AO EXCESSO DE MANGANÊS**

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

Prof. Dr. José Donizeti Alves

Orientador

LAVRAS – MG

2017

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Andrade, Cíntia Aparecida.

Pré-tratamento de sacarose induzindo tolerância à hipoxia e ao
excesso de manganês / Cíntia Aparecida Andrade. - 2017.

73 p.

Orientador(a): José Donizeti Alves.

.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Soja. 2. Biomassa. 3. Antioxidantes. I. Alves, José Donizeti. .
II. Título.

CÍNTHIA APARECIDA ANDRADE

**PRÉ-TRATAMENTO DE SACAROSE INDUZINDO TOLERÂNCIA À HIPOXIA E
AO EXCESSO DE MANGANÊS**

**PRE-TREATMENT OF SACAROSE INDUCING TOLERANCE TO HYPOXIA AND
EXCESS OF MANGANESE**

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

APROVADA em 20 de abril de 2017.

Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart

Dra. Vânia Aparecida Silva EPAMIG

Dra. Milene Alves Figueredo Carvalho EMPRAPA CAFÉ

Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori UFLA

Prof. Dr. José Donizeti Alves

Orientador

LAVRAS – MG

2017

RESUMO

Investigou-se os efeitos do pré-tratamento com sacarose na promoção da tolerância de plantas de soja ao excesso de Mn e a hipoxia. Assim, plantas de soja no estágio V5 foram submetidas aos tratamentos (i) controle, (ii) excesso de Mn, (iii) pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn, (iv) hipoxia + excesso de Mn, (v) pré-tratamento com sacarose + hipoxia + excesso de Mn, por 15 dias. Foram avaliados a concentração de Mn, Cu, Fe e Zn, sintomas visuais, acúmulo de biomassa, concentração de pigmentos fotossintéticos, trocas gasosas, conteúdo de sacarose e amido e de aminoácidos, sistema antioxidante enzimático e não enzimático além da quantificação de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica. O excesso de Mn acarretou redução do acúmulo de biomassa, pigmentos, trocas gasosas e um maior dano oxidativo. Entretanto, o pré-tratamento com sacarose levou uma maior performance das plantas. Sendo que plantas que estavam submetidas a hipoxia e ao excesso de Mn foram as que mais se destacaram, com maior acúmulo de biomassa, pigmentos, trocas gasosas e melhor desempenho dos mecanismos de defesa como maior biossíntese de antioxidantes não enzimáticos. Indicando assim que o pré-tratamento com sacarose pode ser uma alternativa promissora para a indução de tolerância de soja ao excesso de Mn e a hipoxia.

Palavras-chaves: Soja. Biomassa. Antioxidantes.

ABSTRACT

We investigated the effects off pre-treatment with sucrose in promoting the tolerance of soybean plants to excess Mn and hypoxia. Thus, soybean plants in stage V5 were submitted to treatments (i) control, (ii) Mn excess, (iii) pre-treatment with sucrose + Mn excess, (iv) hypoxia + excess Mn, (v) pre - treatment with sucrose + hypoxia + excess of Mn, for 15 days. The concentration of Mn, Cu, Fe and Zn, visual symptoms, biomass accumulation, photosynthetic pigment concentration, gas exchange, sucrose, starch and amino acid content, enzymatic and non-enzymatic antioxidant system besides the quantification of reactive oxygen species and lipid peroxidation. The excess of Mn caused reduction of the accumulation of biomass, pigments, gas exchanges and a greater oxidative damage. However, pre-treatment with sucrose led to higher plant performance. As plants that were submitted to hypoxia and to excess of Mn were the ones that stood out the most, with greater accumulation of biomass, pigments, gas exchanges and better performance of the defense mechanisms like greater biosynthesis of non-enzymatic antioxidants. Thus indicating that pre-treatment with sucrose may be a promising alternative for the induction of soybean tolerance to excess Mn and hypoxia.

Key-words: Soybean. Biomass. Antioxidants.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 REFERENCIAL TEÓRICO	8
2.1 Alagamento e o excesso de Mn nos solos.....	8
2.2 Mn no metabolismo vegetal.....	9
2.3 Toxicidade por Mn.....	10
2.4 Mecanismos de defesa ao excesso de Mn	12
2.5 Efeitos dos pré-tratamentos e a atenuação da toxicidade por Mn	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Quantificação de manganês, ferro, cobre e zinco.....	17
3.2 Intensidade de sintomas	17
3.3 Análise de crescimento	18
3.4 Pigmentos cloroplastídicos	18
3.5 Trocas gasosas	18
3.6 Carboidratos.....	18
3.7 Aminoácidos	19
3.8 Avaliação do sistema antioxidante	19
3.8.1 Atividade das enzimas do sistema antioxidante	19
3.8.2 Zimograma da SOD	21
3.8.3 Quantificação de antioxidantes não enzimáticos.....	22
3.9 Localização subcelular e quantificação de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....	23
3.10 Peroxidação lipídica.....	24
3.11 Análise estatística	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Quantificação de manganês	26
4.2 Caracterização visual dos sintomas de toxicidade por excesso de manganês	27
4.3 Crescimento	30
4.4 Quantificação de cobre, zinco e ferro.....	31
4.5 Quantificação de pigmentos	32
4.6 Trocas gasosas	33
4.7 Carboidratos.....	34
4.8 Aminoácidos	36
4.9 Enzimas antioxidantes	37

4.10 Antioxidantes não enzimáticos.....	39
4.11 Localização subcelular e quantificação de superóxido (O₂^{·-}) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).....	42
4.12 Peroxidação lipídica.....	45
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

O manganês (Mn) é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, entretanto, em certas regiões geográficas, incluindo o leste da Austrália, Havaí, Porto Rico, Brasil e partes da África tropical o seu excesso é responsável pela redução na produtividade de várias culturas (GRAHAM, 1988). No Planalto Allegheny da América do Norte, o excesso de Mn é considerado o principal fator contribuinte para a redução da produtividade nesta área (FERNANDO; LYNCH, 2015). Já no Brasil, no cerrado é encontrado altas concentrações de Mn no solo, sendo que nessa região ocorre um grande cultivo de soja (FAGERIA; STONE, 2008).

Alguns tipos de solos apresentam uma alta concentração de Mn, como os solos ácidos, solos mal drenados ou com ocorrência de alagamentos, assim como em solos próximos a terrenos com atividades voltadas para mineração (FAGERIA; STONE, 2008).. O excesso de Mn em solos com excesso de água ocorre porque estes solos apresentarem várias alterações eletroquímicas como a redução do pH, do potencial redox e aumento da condutividade elétrica o que resultando em uma maior disponibilidade de Mn (CAMARGO; SANTOS; ZONTA, 1999).

Quando em excesso, o manganês é extremamente tóxico para planta, causando alterações fisiológicas como: degradação de clorofilas (REZAI; FARBOODNIA, 2008; ZENGIN, 2013) e redução na fotossíntese (LI et al., 2010; MILLALEO et al., 2013), estresse oxidativo(LEI; KORPELAINEN; LI, 2007; SRIVASTAVA; DUBEY, 2012), redução do crescimento (SRIVASTAVA; DUBEY, 2010) e desequilíbrio da homeostase celular (SHARMA; DIETZ, 2009). Visualmente, os sintomas que ocorrem são o aparecimento de manchas cloróticas, clorose internerval e marginal, necrose e manchas marrons em folhas, além de engruvinhamento e encarquilhamento das folhas (HEENAN; CARTER, 1976; FOY; CHANEY; WHITE, 1978; LAVRES JUNIOR et al., 2008). Nas raízes os sintomas são caracterizados por aparecimento de manchas marrons.

Estudos sobre o comportamento da soja frente ao excesso de Mn são escassos, sabe se que o excesso deste elemento causa em plantas de soja redução na assimilação de CO₂ e condutância estomática, redução da biomassa, maior atividade de enzimas antioxidantes. Os

sintomas de toxicidade são, folhas com hipertrofia da epiderme adaxial e formação de áreas necróticas com pontuações de cor marrom (SANTOS et al., 2017).

Uma técnica que vem sendo muito utilizada para aumentar a tolerância de plantas a vários estresses é a aplicação exógenas de algumas substâncias, como ácido ascórbico, peróxido de hidrogênio, silício, sacarose e alguns nutrientes como fósforo, potássio (ALAM et al., 2005, 2006; SHI et al., 2005; PARASHAR et al., 2014; CAO et al., 2014; HOSSAIN et al., 2015). Tendo-se em vista os efeitos benéficos dos pré-tratamentos com a aplicação exógena de sacarose o objetivo do trabalho foi estudar a ação da sacarose na indução de tolerância de plantas de soja ao excesso de Mn.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Alagamento e o excesso de Mn nos solos

O excesso de manganês tem sido relacionado à redução da produtividade agrícola em regiões tropicais e subtropicais, cujos solos são tipicamente ácidos ou alagadiços. As características desses solos propiciam uma elevada concentração de alguns elementos, como o alumínio e o manganês (OLIVER; GREGORY, 2015). Os solos ácidos ocupam cerca de 40% de terras agrícolas no mundo, onde ocorre grande cultivo de grãos (HAUG; CHARLES, 1983).

Devido às alterações climáticas, há previsão de alterações na disponibilidade de água em diferentes regiões. Em determinadas áreas, o acréscimo no volume de chuvas poderá aumentar a exposição de plantas à condição de alagamento, enquanto em outras regiões a escassez de chuva levará ao déficit hídrico (KREUZWIESER; GESSLER, 2010; DURACK; WIJFFELS; MATEAR, 2012). Dessa maneira o alagamento de solos ácidos poderá aumentar a disponibilidade de metais, uma vez que a solubilidade destes elementos é altamente dependente do pH do solo, como no caso do Mn que tem sua solubilidade elevada neste tipo de condição (KHABAZ-SABERI et al., 2010).

O excesso de água no solo constitui um tipo de estresse multifatorial altamente complexo que envolve a interação entre vários fatores bióticos e abióticos. Tradicionalmente, estudos acerca do alagamento têm abordado os efeitos prejudiciais da hipoxia e anoxia sobre o consumo de oxigênio e a sua redistribuição nos tecidos vegetais. No entanto, a fitotoxicidade decorrente da maior disponibilidade de Fe^{+2} , Mn^{+2} e H_2S e de substâncias orgânicas como etanol, acetaldeído e compostos fenólicos ainda precisa ser explorado (SHABALA, 2011).

Quando as plantas são expostas a mais de um tipo de estresse, como pode ocorrer em solos ácidos sujeitos ao alagamento onde as plantas estarão expostas tanto ao excesso de Mn quanto à hipoxia, deve se ater que, a combinação de estresses gera respostas diferenciadas daquelas respostas de apenas um tipo de estresse. Segundo RIZHSKY et al., (2004) a resposta molecular de plantas a combinação de estresse é única e não pode ser comparada com respostas a estresses aplicados individualmente .

Apesar de ocorrer semelhanças de respostas ao estresse isolado ou à combinação de estresses, quando a planta está submetida a múltiplas tensões mecanismos particulares são necessários o que é resultado de uma via de sinalização com alto grau de complexidade. Sendo

que a combinação de estresse pode ter efeito negativo aumentando assim os danos causados, ou efeito positivo sendo a interação de estresses benéfica para planta (MITTLER, 2006; SRIVASTAVA; DUBEY, 2012; PÉREZ-LÓPEZ et al., 2013; RIVERO et al., 2014).

Uma condição que é caracterizada pela combinação de estresses é o excesso de água nos solos, pois este leva a alterações eletroquímicas como modificação do pH, redução do potencial redox e aumento da condutividade elétrica, resultando em mudanças no perfil elementar do solo (CAMARGO; SANTOS; ZONTA, 1999). Em solos alagados e com escassez de oxigênio, primeiramente os microrganismos utilizam o nitrato como acceptor de elétrons na respiração alternativa. Após a escassez de nitrato, os óxidos de manganês são os próximos receptores de elétrons, seguidos pelo ferro e pelo sulfato. Assim, ocorre a redução de MnO_2 a Mn^{+2} e Fe(OH)_3 a Fe^{+2} , o que resulta em um acúmulo de ferro (Fe^{+2}) e manganês (Mn^{+2}) solúveis na solução do solo (MARSCHNER, 1991). Com a duração do encharcamento do solo, há um decréscimo no potencial redox, levando à redução do sulfato a sulfeto de hidrogênio. Finalmente, ocorre a produção de metano derivado do CO_2 e de certos ácidos orgânicos que são acumulados (LYNCH.; HARPER, 1980).

Em condições normais o Mn encontra-se na forma de óxidos podendo apresentar as valências Mn^{+3} e Mn^{+4} , sendo que estas formas não são absorvidas pelas plantas. Entretanto, o Mn^{+2} disponível em solos ácidos e/ou alagados é a forma absorvida pelas plantas. Comportamento semelhante ocorre para o ferro, onde, Fe^{+3} é reduzido Fe^{+2} , forma absorvida pelas plantas (GAO et al., 2002). Desta maneira, devido à maior disponibilidade das formas reduzidas, há maior absorção desses elementos, podendo chegar a níveis tóxicos.

2.2 Mn no metabolismo vegetal

A absorção do manganês pelas plantas é um processo bifásico, a primeira fase é caracterizada por ser rápida e irreversível. Nesta fase o Mn^{+2} é absorvido pelos constituintes com carga negativa da parede celular do apoplasto das células da raiz. A segunda fase é lenta e caracterizada pela distribuição de Mn a partir de células da raiz para toda a planta (KHABAZ-SABERI et al., 2010). Esta fase envolve o transporte primário no xilema, transferência a partir do xilema para o floema e re-translocação para o floema (HUMPHRIES; STANGOULIS; GRAHAM, 2007).

O Mn é encontrado em vários locais na célula, incluindo o cloroplasto, parede celular, mitocôndrias e complexo de Golgi, mas também pode estar localizado no vacúolo, uma organela que é importante para a manutenção da homeostase celular (PITTMAN, 2005; WILLIAMS; PITTMAN, 2010; LANQUAR et al., 2010).

O manganês está envolvido em diferentes processos metabólicos. Na fotossíntese, participa da fotólise da água, onde um grupo de quatro átomos de Mn está associado ao complexo de evolução do oxigênio o qual é ligado à proteína do centro de reação (D1) no fotossistema II (GOUSSIAS; BOUSSAC; RUTHERFORD, 2002). Na respiração atua como cofator das enzimas carboxilase do piruvato e carboxiquinase do fosfoenilpiruvato (DUCIC; POLLE, 2005). O Mn é requerido para a ativação da enzima oxidase do ácido indolacético, na rota de biossíntese de auxina, e para a síntese de aminoácidos aromáticos com a tirosina (LIDON; BARREIRO; RAMALHO, 2004). Também tem papel como co-fator de enzimas da síntese de compostos secundários como ligninas, flavonoides e isoprenoides (BURNELL, 1988; WILKINSON; OHKI, 1988; LIDON; HENRIQUES, 1992) e do sistema antioxidante (Mn-SOD e Mn-CAT) (MARSCHNER, 1995).

2.3 Toxidade por Mn

Por ser um micronutriente, é requerido em baixas quantidades ($\sim 20-40 \text{ mg. kg}^{-1}$ massa seca) pelas plantas, sendo que para soja é requerido ($\sim 35-120 \text{ mg. kg}^{-1}$ massa seca) (MUKHOPADHYAY; SHARMA, 1991; JAOUAL; COX, 1998; JIANG, 2006; MILLALEO et al., 2010, 2013; KHABAZ-SABERI et al., 2010; MASCARENHAS et al., 2013). No entanto, quando em altas concentrações ($>250 \text{ mg. Kg}^{-1}$ massa seca), o manganês é extremamente tóxico para planta, podendo causar maior geração de espécies reativas de oxigênio (LEI; KORPELAINEN; LI, 2007; SRIVASTAVA; DUBEY, 2012), degradação de clorofilas (REZAI; FARBOODNIA, 2008; ZENGIN, 2013) e redução na fotossíntese (LI et al., 2010; MILLALEO et al., 2013). Pode também alterar a atividade de várias enzimas (SRIVASTAVA; DUBEY, 2010) e a permeabilidade da membrana celular (LEI; KORPELAINEN; LI, 2007; LI et al., 2008; MORA et al., 2009; LIU et al., 2010), causando desequilíbrio da homeostase celular, (SHARMA; DIETZ, 2009) e redução do crescimento (SRIVASTAVA; DUBEY, 2010).

Visualmente, os sintomas característicos da elevada concentração de Mn nos vegetais são manchas cloróticas, clorose internerval e marginal, necrose e manchas marrons em folhas (HEENAN; CARTER, 1976; FOY; CHANEY; WHITE, 1978; LAVRES JUNIOR et al., 2008). Ocorre também menor crescimento de raízes e parte aérea, menor produtividade e redução na densidade radicular (OHKI, 1976; OJO; BELLO; ADEYEMO, 2010; MOU et al., 2011).

De acordo com Millaleo et al.,(2010), todos estes sintomas são precedidos por alterações no aparato fotossintético. Este comportamento pode ser devido ao fato de que as alterações no aparato reduzem a fotossíntese e conseqüentemente a produção de carboidratos, com isto haverá menos produção de energia e as plantas não terão energia suficiente para ativar mecanismos de defesa. A exposição de *Arabidopsis thaliana* ao excesso de Mn provocou efeitos negativos específicos sobre a abundância de polipeptídios que formam o centro da reação do fotossistema I (PSI), resultando na diminuição da fase fotoquímica e menor capacidade do transporte cíclico de elétrons, o que pode ser devido a uma deficiência de ferro induzida por elevadas concentrações de Mn (MILLALEO et al., 2013). Em *Citrus grandis* sob excesso de manganês verificou-se uma redução da assimilação de CO₂ devido a uma redução da condutância estomática e atividade da Rubisco (LI et al., 2010).

Além dos efeitos negativos sobre o aparato fotossintético, o Mn em excesso pode levar a redução nos níveis de alguns nutrientes como, Fe, Cu, Zn e Ca, devido à competição pelos mesmos transportadores, uma vez que apresentam raio iônico próximos (PITTMAN, 2005; MILLALEO et al., 2013; TEWARI; KUMAR; SHARMA, 2013). Em *Matricaria chamomilla* (KOVÁČIK et al., 2014), *Cucumis sativus* (SHI et al., 2005) e *Morus alba* (TEWARI; KUMAR; SHARMA, 2013) a elevada concentração de Mn resultou em um menor conteúdo de Cu, Fe, Zn e Ca.

O excesso de manganês também pode levar a uma alteração no conteúdo de carboidratos através do aumento no conteúdo de açúcares redutores e amido e uma redução nos açúcares não redutores em folhas de *Morus alba* (TEWARI; KUMAR; SHARMA, 2013), porém, em *Citrus grandis*, o excesso de Mn não alterou o conteúdo de glicose, frutose, amido e de carboidratos totais não estruturais, entretanto, o teor de sacarose foi maior nas plantas sob excesso de Mn (LI et al., 2010).

2.4 Mecanismos de defesa ao excesso de Mn

Os mecanismos evitação do estresse ou redução dos impactos fisiológicos em virtude do excesso de manganês podem reduzir os danos celulares. No entanto, pode ocorrer uma quebra de homeostase celular em decorrência da alteração de processos que envolvem reações redox. Nesse sentido, plantas sob excesso de manganês apresentam aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem reagir com lipídeos, proteínas, carboidratos e até mesmo ácidos nucleicos, podendo levar à morte celular, caracterizando o estresse oxidativo (NOCTOR; MHAMDI A; FOYER, 2014). As EROs, incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($O_2^{\cdot -}$), radical hidroxila ($OH\cdot$) e oxigênio singlete (1O_2) são subprodutos do metabolismo. Em condições normais, para a manutenção das atividades metabólicas as EROs são precisamente controladas e mantidas em níveis basais pelo sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático (GILL; TUTEJA, 2010).

O sistema antioxidante enzimático é composto pelas enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT), a peroxidase do guaicol (GPX), redutase do monodehidroascorbato (MDHAR), redutase do dehidroascorbato (DHAR), redutase da glutathione (GR) e peroxiredoxina (PRX) (NOCTOR; MHAMDI A; FOYER, 2014). Estas enzimas estão localizadas em diferentes locais de células vegetais e atuam juntas para neutralizar as EROs e assim evitar danos celulares.

A SOD funciona como a primeira linha de defesa converte o $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 . CAT, APX, e, em seguida, GPX agem neutralizando H_2O_2 . Diferentemente da CAT, a APX requer um ácido ascórbico (ASA) e / ou a regeneração de uma glutathione no ciclo ascorbato-glutathione em que as enzimas MDHAR, DHAR, e GR estão envolvidas. As enzimas GPX e PRX reduzem o H_2O_2 a hidroperóxidos orgânicos (MEYER et al., 2012; NOCTOR; MHAMDI A; FOYER, 2014). Os antioxidantes não enzimáticos incluem glutathione, ácido ascórbico, carotenóides, tocoferóis e flavonoides, que são importantes para a manutenção da homeostase celular (GILL; TUTEJA, 2010).

Em respostas a diferentes tipos estresses, são observadas respostas variadas do sistema antioxidante enzimático e/ou não enzimático na tentativa de neutralização do excesso de EROs e manutenção da homeostase celular (GILL; TUTEJA, 2010; NOCTOR; MHAMDI A; FOYER, 2014). A resposta do sistema antioxidante tem sido descrita como uma das principais

respostas fisiológicas ao excesso de Mn (SHI et al., 2006; HUANG et al., 2016; SANTOS et al., 2017).

2.5 Efeitos dos pré-tratamentos e a atenuação da toxicidade por Mn

Diante dos efeitos deletérios do excesso de manganês em plantas cultivadas em regiões tropicais e subtropicais, que podem afetar a produtividade dessas espécies vegetais, alternativas tem sido buscadas para aumentar a tolerância de plantas. Neste sentido, a aplicação exógena ou o pré-tratamento das plantas com substâncias que aumentem a tolerância tem sido testada com diferentes espécies vegetais.

A aplicação de ácido ascórbico em plantas de *Brassica juncea* submetidas a diferentes níveis de Mn promoveu melhoria no crescimento, relações hídricas e características fotossintéticas, além de um aumento na atividade das enzimas antioxidantes e acúmulo de prolina (PARASHAR et al., 2014).

Outra substância utilizada é o Si, em que a aplicação reduziu a produção de H₂O₂ e peroxidação lipídica, além de aumentar as atividades das enzimas do sistema antioxidante, reduzindo assim os efeitos do estresse (SHI et al., 2005). Em outro trabalho a aplicação de Si aumentou a concentração de clorofila, produção de ATP, a estabilização a estrutura do PSI, bem como a assimilação de CO₂ (LI et al., 2015). O óxido nítrico reduziu o estresse oxidativo (KOVÁČIK et al., 2014).

Alguns nutrientes também são utilizados para minimizar os efeitos da toxicidade do Mn, como o cálcio e o potássio. O incremento da solução nutritiva com cálcio reduziu a translocação de Mn para a parte aérea (ALAM et al., 2006), enquanto a adição de potássio reduziu a absorção e a translocação deste elemento para a parte aérea (ALAM et al., 2005).

Os efeitos positivos do pré-tratamento em reduzir os efeitos tóxicos do excesso de manganês têm sido descritos para diferentes classes de substâncias. Vários trabalhos mostram que a aplicação de sacarose antes do estresse aumenta a tolerância a diferentes estresses (LORETI et al., 2005; SULMON et al., 2007; ROSENWASSER et al., 2011; CAO et al., 2014). Porém, ainda não há detalhamento dos efeitos da sacarose na promoção da tolerância de plantas ao excesso de Mn.

A participação dos açúcares na indução de tolerância a diferentes estresses fez surgir um novo conceito: "imunidade doce". Este conceito se baseia na função de sinalizadores de estresse que os açúcares vêm apresentando (CEUSTERS; VAN DEN ENDE; CEUSTERS, 2016). Esta sinalização feita pelos açúcares leva a uma ativação mais rápida e robusta dos sistemas de defesa das plantas e, conseqüentemente, a tolerância ao estresse.

Trabalhos demonstram que esta "imunidade doce" ocorre pelo fato dos açúcares estarem diretamente ligados com a produção de EROs. Primeiramente, regulam as principais vias metabólicas de produção, como fotossíntese e respiração. Por outro lado, participam da via de biossíntese de NADPH, que atua em processos antioxidantes (COUEE et al., 2006). Além disso, os açúcares tiveram sua função antioxidante reconhecida recentemente (ROLLAND; BAENA-GONZALEZ; SHEEN, 2006; KEUNEN et al., 2013; VAN DEN ENDE; EL-ESAWI, 2014). Dentre os açúcares com função antioxidante, se destacam os solúveis, tais como dissacarídeos (sacarose), oligossacarídeos da classe rafínósica e frutanos (KEUNEN et al., 2013).

A sacarose pode atuar na promoção da tolerância a estresses pela ativação do sistema antioxidante através da sinalização ou pela atuação como um antioxidante. Em baixas concentrações, a sacarose pode servir como um substrato para sinalização das alterações induzidas pelo estresse, enquanto em concentrações elevadas, ela pode funcionar diretamente como um agente protetor (UEMURA; STEPONKUS, 2003).

Dentre as vias de sinalização específicas da sacarose estão a síntese de compostos vacuolares como as antocianinas (KOORNNEEF; SMEEKENS, 2005; SOLFANELLI et al., 2006) e os frutanos (MARTÍNEZ-NOËL et al., 2009; TOGNETTI; SALERNO; PONTIS, 2010). A biossíntese de antocianinas e frutanos é dependente da sacarose, que pode atuar como substrato ou como molécula sinalizadora na via de síntese. A sacarose aumenta a expressão de genes ligados à síntese desses compostos por vias de sinalização que a ainda não estão muito bem esclarecidas. Conseqüentemente, antocianinas e frutanos podem atuar diretamente como antioxidantes, neutralizando radicais hidroxila e superóxido, ou indiretamente como sinalizadores de estresse (VAN DEN ENDE; EL-ESAWI, 2014), desencadeando as respostas celulares.

Além de induzir a síntese de antocianinas e frutanos, a sacarose também estimula a biossíntese de ascorbato. Nesse caso, há um aumento da expressão de enzimas relacionadas à biossíntese de ascorbato nas mitocôndrias (NISHIKAWA et al., 2005). Em *Arabidopsis*

thaliana observou-se que plantas cultivadas em solução de sacarose apresentavam maiores níveis de ascorbato (HEIBER; CAI; BAIER, 2014).

No que se refere ao seu papel como um antioxidante, estudos *in vitro* demonstraram a capacidade eliminadora de EROs, sugerindo fortemente que reações semelhantes também podem ocorrer *in vivo* (UEMURA; STEPONKUS, 2003). A sacarose atua neutralizando as EROs, principalmente radicais hidroxila, cuja a neutralização não é feita por via enzimática. O mecanismo de neutralização do radical OH^- pode estar ligado à presença de radicais livres estáveis liberados da oxidação da sacarose. No entanto, esses radicais de açúcares podem ser facilmente regenerados *in vivo*, proporcionando uma maior estabilidade da sacarose e uma neutralização mais eficiente do OH^- (VAN DEN ENDE; VALLURU, 2009).

Vários trabalhos têm demonstrado que o fornecimento de sacarose exógena aumenta a tolerância a vários estresses com no caso de *Arabidopsis thaliana*, submetidas à escuridão prolongada (ROSENWASSER et al., 2011), anoxia (LORETI et al., 2005) e aplicação de herbicida (SULMON et al., 2007). O tratamento com sacarose levou a um acréscimo da atividade das enzimas antioxidantes e, portanto, reduziu o estresse oxidativo. Comportamento semelhante foi observado para *cucumis sativus* submetido a baixas temperaturas (CAO et al., 2014).

Além da otimização do sistema antioxidante, a sacarose exógena aumenta formação de raízes adventícias e comprimento de raízes, como no caso de *Salix nigra* e *Acer negundo* sob baixa disponibilidade de oxigênio (BAUD; PEZESHKI, 2013). Também aumenta o conteúdo de clorofila em plântulas de *Arabidopsis thaliana* submetidas à salinidade (QIU et al., 2014), e o pool de proteína D1 quando expostas a herbicidas, o que indica maior proteção do aparato fotossintético (SULMON et al., 2004).

No caso de *Glycine max*, submetidas ao excesso de Mn e à hipoxia verificou-se que a aplicação de sacarose manteve os níveis de clorofila e o crescimento dessas plantas, no entanto, os mecanismos de ação da sacarose não foram elucidados (SOUZA, 2014).

Diante do exposto surgiu a oportunidade de realização do ‘priming-doce’, que irá preparar as plantas com uma resposta de defesa mais forte e mais rápida contra estresses futuros, visando a compreensão de como a sacarose pode desempenhar um papel crucial na antecipação de respostas ao estresse, levando assim a uma maior tolerância ao excesso de Mn.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill) do genótipo BRS Taura, que é sensível ao alagamento, foram colocadas para germinar em casa de vegetação em substrato comercial para o cultivo de mudas. Plantas no estágio de desenvolvimento V1 (folhas unifolioladas abertas) foram transferidas para recipientes de polipropileno contendo quarenta litros solução nutritiva.

As plantas passaram por um período de aclimação onde foi utilizada solução nutritiva de concentrações crescentes com pH $5,5 \pm 0,5$. Esta solução foi constituída 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), suplementada com $NH_4 \cdot NO_3$ (4mM). A aclimação ocorreu da seguinte forma: primeiramente as plantas ficaram em contato com a solução com $\frac{1}{4}$ de força por 7 dias, em seguida $\frac{1}{2}$ força por 7 dias e, finalmente, força completa onde as plantas permaneceram até o estágio V5 (4º trifólio aberto). Neste estágio as plantas foram submetidas aos tratamentos e mantidas por 15 dias.

As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: **Controle:** solução nutritiva completa com concentrações ideais de manganês (2 μ M) e sob aeração; **Excesso de Mn:** solução nutritiva completa acrescida de 200 μ M de manganês e sob aeração; **Pré-tratamento com Sacarose + Excesso de Mn:** pré-tratamento das raízes com 90 mM de sacarose por 6 horas e, em seguida, solução nutritiva com excesso de manganês (200 μ M) e sob aeração; **Hipoxia + Excesso de Mn:** solução nutritiva completa acrescida de 200 μ M de manganês e sem aeração; **Pré-tratamento com Sacarose + Hipoxia + Excesso de Mn:** pré-tratamento das raízes com 90 mM de sacarose por 6 horas e, em seguida, solução nutritiva com excesso de manganês (200 μ M) e sem aeração.

O pré-tratamento consistiu da imersão das raízes em uma solução de sacarose 90 mM por 6 horas com aeração constante. Em seguida, as plantas foram submetidas aos respectivos tratamentos.

Após a imposição dos tratamentos, a solução nutritiva foi trocada semanalmente e o pH foi monitorado diariamente, sendo corrigido pelo uso de HCl 1M ou NaOH 1M. O pH foi mantido em $4,5 \pm 0,5$ para simular uma situação de solo ácido.

O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições. As análises fisiológicas, bioquímicas e morfológicas foram realizadas após 15 dias de imposição dos tratamentos. Para as análises bioquímicas foram coletadas raízes e folíolos completamente expandidos. Todo o material coletado foi devidamente identificado e armazenado.

3.1 Quantificação de manganês, ferro, cobre e zinco

A concentração dos nutrientes em folhas e raízes foi determinada de acordo com MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, (1989). Para isto, 500 mg de material seco e moído (folhas e raízes) foram acondicionados em tubos de digestão aos quais foram adicionados 6 ml de uma mistura de HNO₃ e HClO₄ 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 nestas condições até a redução do seu volume pela metade. Em seguida, a temperatura foi elevada a 210° C, sendo mantida até que foram obtidos fumos brancos de HClO₄. Após resfriamento, o extrato teve seu volume foi completado para 15 ml com água deionizada e foi armazenado até as análises. A determinação das concentrações de manganês, ferro, cobre e zinco foi realizada por espectrometria de absorção atômica.

3.2 Intensidade de sintomas

Foram avaliados os sintomas de toxicidade por manganês em folhas, caule e raízes. Nas folhas os sintomas foram verificados pela visualização de clorose, pontuações marrons e manchas necróticas nas folhas, nas raízes aparecimento de raízes adventícias e no caule pelo espessamento deste órgão. Para isso as folhas foram coletadas e em seguida escaneadas em escâner HP Scanjet G2410, resolução óptica de 120 dpi. Já raízes e caules foram fotografados. O espessamento do caule foi caracterizado pelo aparecimento de rachaduras e exposição de um tecido esponjoso de cor branca.

3.3 Partição de biomassa

A massa seca de parte aérea, raízes e total foi quantificada após a secagem do material vegetal em estufa de circulação forçada a 65° C até peso constante. Os valores de massa seca foram obtidos pela pesagem do material vegetal em balança digital Shimadzu, modelo (AY220).

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

3.4 Pigmentos cloroplastídicos

Para a determinação dos teores de clorofila total e carotenoides foi utilizado o material vegetal do último trifólio completamente expandido de plantas de cada tratamento, sendo utilizado sempre o folíolo mediano. Em seguida, foram macerados 0,1g de tecido foliar em acetona 80%. O volume final foi completado para 10 ml, sendo realizadas as leituras espectrofotométricas a 663,2, 646,3 e 470nm (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001).

3.5 Trocas gasosas

As avaliações de tocas gasosas foram realizadas com um analisador de gás por infravermelho (LI-6400XT Portable Photosynthesis System, LI-COR, Lincoln, USA). Avaliou-se o último trifólio completamente expandido de plantas de cada tratamento, sendo utilizado sempre o folíolo mediano. As análises foram realizadas entre 9 e 11 horas, como uma umidade relativa da câmara de 60% e temperatura foliar de aproximadamente de 32°C. Sendo a radiação aplicada na câmara de 1500 $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$. As características avaliadas foram: taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs) e transpiração (E).

3.6 Carboidratos

A extração dos carboidratos foi realizada de acordo com Zanandrea et al. (2010), em que 200 mg de massa seca de folhas e raízes foram homogeneizadas em 5 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 7,0, seguido de banho-maria por 30 minutos a 40°C. O homogenato

foi centrifugado a 5.000 x g por 10 minutos, coletando-se o sobrenadante. O processo foi repetido e os sobrenadantes foram combinados, com volume final de 10 ml de extrato.

Para extração do amido, o *pellet* da extração anterior foi ressuspendido com 8 ml do tampão acetato de potássio 200 mM, pH 4,8. Em seguida foram adicionadas 16 unidades da enzima amiloglucosidase, incubando-se em banho-maria a 40°C por duas horas. Após a centrifugação a 5.000 xg por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e o volume completado para 15 ml. A quantificação de amido foi realizada pelo método da antrona, com base na curva-padrão de glicose. Para isso, uma alíquota foi adicionada ao meio contendo a solução de antrona (antrona + ácido sulfúrico) e, incubou-se as amostras em banho -maria a 100°C por 3 minutos e em seguida foram resfriadas em gelo. A leitura foi realizada 629nm (DISCHE, 1962).

A extração da sacarose foi realizada pela combinação de uma alíquota de 800 µL do extrato de carboidratos a 800 µL de KOH (30%), seguido de incubação em banho-maria a 37°C por 15 minutos. A quantificação de sacarose foi realizada pelo método da antrona, com base na curva-padrão de glicose (DISCHE, 1962).

3.7 Aminoácidos

A extração de aminoácidos totais foi realizada segundo Zanandrea et al., (2010), em seguida, uma alíquota do extrato foi adicionada ao tampão de incubação composto por tampão citrato de sódio 0,2M, (pH 5), ninhidrina 5% em metil celosolve, cianeto de potássio (KCN) 2% em metil celosolve. Posteriormente as amostras foram agitadas e levadas ao banho-maria a 100°C por 20 minutos para desenvolver a coloração. Em seguida, adicionou-se etanol 60% e agitou-se novamente os tubos. Após o resfriamento, procedeu-se à leitura em espectrofotômetro a 570 nm, sendo a quantificação feita com base na curva-padrão de glicina (YEMM; COCKING, 1955).

3.8 Avaliação do sistema antioxidante

3.8.1 Atividade das enzimas do sistema antioxidante

O extrato para a determinação da atividade das enzimas do sistema antioxidante foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 200 mg de material vegetal fresco (folíolos e

raízes). Em seguida, adicionou-se ao macerato 1,5ml da solução de extração composta por tampão fosfato de potássio (100mM) (pH 7,8), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (0,1mM), ácido ascórbico (200mM) e água, conforme Biemelt; Keetman; Albrecht, (1998), com modificações. Os sobrenadantes foram coletados e utilizados nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT), peroxidase do guaiacol (GPX), redutase da glutathione (GR) e redutase do dehidroascorbato (DHAR). A atividade específica das enzimas antioxidantes foi expressa com base na quantificação de proteínas no extrato enzimático (BRADFORD, 1976).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), proposta por (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977), com modificações. Alíquotas do extrato enzimático foram adicionadas ao meio de incubação composto por: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 μ M, NBT 75 μ M e riboflavina 2 μ M. Em seguida, o meio de incubação mais os extratos enzimáticos foram iluminadas com lâmpada fluorescente de 20 W por 7 minutos. Para o controle, foi utilizado o mesmo meio de reação sem a amostra. As leituras de absorbância foram realizadas a 560 nm. Uma unidade de SOD é a quantidade de enzima capaz de reduzir em 50% a fotoredução do NBT. A atividade da SOD foi expressa em U μ g proteína⁻¹

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao tampão de incubação composto por fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM. O tampão de incubação foi previamente incubado a 28 °C e o peróxido de hidrogênio 0,1 mM foi adicionado para disparar a reação, imediatamente antes do início das leituras espectrofotométricas (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8 mM⁻¹cm⁻¹. A atividade da APX foi expressa em μ mol AsA min⁻¹ μ g proteína⁻¹.

A CAT foi avaliada segundo Havar; Mchale, (1987), em que uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de incubação contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), previamente incubado a 28 °C. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio 12,5 mM. A atividade desta enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O

coeficiente de extinção molar utilizado foi de $36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A atividade da CAT foi expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g prote\~{i}na}^{-1}$.

Para a determinação da atividade da GPX, uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de incubação composto por fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0), guaiacol 0,13% (m/v) e H_2O_2 0,15% (m/v). A atividade desta enzima foi determinada pelo acréscimo na absorbância a 470 nm, a cada 15 segundos, por 2 minutos, monitorado pela produção de tetraguaiacol (FANG; KAO, 2000). O coeficiente de extinção molar utilizado foi de $26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A atividade da GPX foi expressa em $\mu\text{mol tetraguaicol min}^{-1} \mu\text{g prote\~{i}na}^{-1}$.

A atividade da GR foi determinada segundo Cakmak; Strbac; Marschner, (1993). Uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de incubação composto por fosfato de potássio 50mM (pH7,8) e glutatona oxidada 1mM, que foi previamente incubado a 35 °C. A reação foi disparada pela adição de NADPH 0,075mM. A atividade desta enzima foi obtida pelo acompanhamento do decréscimo da absorbância a 340nm pela oxidação do NADPH, a cada 15 segundos, durante 3 minutos. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A atividade da GR foi expressa em $\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \mu\text{g prote\~{i}na}^{-1}$.

A atividade da DHAR foi determinada pelo acréscimo da absorbância a 265 nm pela produção de ascorbato, a cada 15 segundos, durante 3 minutos. Para tanto, uma alíquota o extrato foi adicionado ao meio de incubação, a 28 °C, composto por fosfato de potássio 50mM (pH 7), dehidroascorbato 0,1mMpH 0,8 e EDTA 0,001 mM. A reação foi iniciada pela adição de glutatona reduzida 0,3mM (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi $14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A atividade da DHAR foi expressa em $\mu\text{mol ascorbato min}^{-1} \mu\text{g prote\~{i}na}^{-1}$.

3.8.2 Zimograma da SOD

As isoformas de SOD foram avaliadas em gel de poliacrilamida a partir de um extrato protéico obtido por 0,2 g de tecido foliar e 0,6 g de tecido radicular. As amostras compostas de folhas e de raízes foram obtidas pela maceração de tecido fresco das 5 repetições biológicas. O tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido com PVPP 4%. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 7,0, EDTA 1 mM e ditioneitol (DTT) 3mM. As amostras foram centrifugadas a 10 000 rpm por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante

foi coletado (FERREIRA; FORNAZIER; LEA, 2002). A quantificação de proteínas no extrato foi realizada de acordo com Bradford (1976).

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi do tipo PAGE não-desnaturante, com gel de corrida 12,5% e gel de empilhamento 3,5% (Adaptado de LAEMMLI, 1970). A corrida foi realizada com corrente constante de 60 mA por duas horas a 4 °C, sendo o tampão de corrida composto por Tris-HCl 25 mM (pH 8,3) e glicina 192 mM. Utilizou-se 40 µg de proteínas. O tampão da amostra foi composto por tampão Tris-HCl 0,0625M, glicerol 10%, mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,01%.

Após a corrida, os géis foram incubados nas respectivas soluções para revelação das isoformas de SOD, baseando-se nos inibidores de cada isoforma. A Fe-SOD é inibida por H₂O₂, Cu/Zn SOD é inibida por H₂O₂ e KCN e Mn-SOD não sofre inibição. Dessa maneira, foram corridos ao mesmo tempo os géis controle, inibido por H₂O₂ e inibido por KCN para comparações e detecção das isoformas. O gel controle foi incubado em uma solução de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), NBT 0,1 mM, EDTA 1 mM, N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina (TEMED) 3% e riboflavina 0,05 mM, por 20 minutos no escuro. Finalmente, o gel foi iluminado com lâmpada de 20W até o aparecimento das isoformas. A reação foi paralisada com uma solução de ácido acético 7%. O gel inibido com KCN foi incubado em uma solução de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), EDTA 0,8 mM e KCN 2 mM. O gel inibido com H₂O₂ foi incubado em uma solução de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), EDTA 0,8 mM e H₂O₂ 6 mM. Após incubação por 20 minutos no escuro, os géis foram lavados com água destilada, incubados na solução de NBT e revelados conforme descrito para o gel controle (AZEVEDO et al., 1998).

3.8.3 Quantificação de antioxidantes não enzimáticos

Para a quantificação da concentração de ascorbato 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 1,25% (m/v), etanol 25% (v/v), ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,05% em etanol (v/v), bathophenantrolina 0,125% em etanol (m/v) e FeCl₃ 0,00375% em etanol (m/v). A mistura foi 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 de ascorbato (ARAKAWA et al., 1981).

A quantificação de frutanos foi realizada pela diferença entre a quantidade de frutose total e açúcares redutores. O extrato utilizado para a quantificação de frutose e de açúcares redutores foi obtido de acordo com Zanandrea et al., (2010). A quantificação de frutose foi realizada através do método de antrona modificado para cetoses. Para o preparo da solução de antrona, 0,2% (p/v) do reativo de antrona foi adicionado ao ácido sulfúrico 76% (v/v) (JERMYN, 1956). Para a quantificação dos açúcares redutores utilizou-se o extrato obtido segundo método proposto por Zanandrea et al. (2010). A quantificação ocorreu pelo método de DNS onde uma alíquota do extrato foi adicionado ao meio composto por ácido dinitrosalicílico (DNS), NaOH (2N) e tartarato duplo de Sódio e Potássio e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540nm (MILLER, 1959).

A extração e a quantificação de prolina foram realizadas de acordo com o método descrito por Bates; Waldren; Teare, (1973). A extração ocorreu pela maceração do material vegetal fresco em ácido sulfosalicílico 3%. Em seguida os extratos foram agitados por 60 minutos e filtrados. A quantificação foi realizada com base na curva padrão que continha concentrações crescentes e conhecidas de prolina. Para isso, uma alíquota do extrato foi adicionada ao meio de reação composto por ninhidrina, ácido fosfórico (6M) e ácido acético. A leitura realizada em 520nm.

Para a determinação de antocianinas, utilizou-se o método proposto por (MITA et al., 1997). As antocianinas foram extraídas em 1% ácido clorídrico em metanol por 24 horas a 4°C. Após este período o extrato foi centrifugado a 13000rpm durante 15 minutos e a absorbância foi lida a 530 e 657nm. A concentração relativa foi calculada pela fórmula $[A_{530} - (1/4 \times A_{657})]$, onde uma unidade de antocianina corresponde a uma unidade de absorbância $[A_{530} - (1/4 \times A_{657})]$, em 1ml de extrato.

3.9 Localização foliar e quantificação de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para a localização subcelular de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 utilizou-se sempre o último trifolíolo completamente expandido. A localização subcelular do radical $O_2^{\cdot-}$ foi realizada segundo Oracz et al (2012). O trifolíolo foi incubado em 1mM de NBT em tampão Tris HCl 10mM (pH 7,0)

por 30 minutos no escuro. Já para localização subcelular de H_2O_2 , os trifolíolos foram incubados em uma solução de diaminobenzidina (DAB) 1 mg /ml em tampão fosfato de potássio 10mM (pH 3,8) por 8 horas sob iluminação constante (SHI et al., 2010). Após as incubações as folhas foram descoradas em uma solução composta ácido tricloroacético (TCA), etanol e clorofórmio [1,5g TCA em 750 ml de etanol e 250 ml de clorofórmio] o que permitiu a visualização de pontuações azuis características do radical O_2^- e de pontuações marrons indicativo de H_2O_2 . As imagens foram capturadas por meio de uma escâner HP Scanjet G2410, resolução óptica de 120 dpi. Os trifolios que foram selecionados para capturar as imagens foram os que apresentaram maior ocorrência de EROs dentre todos.

A concentração de superóxido em folhas e raízes foi determinada pelo método descrito por Boveris (1984) Boveris (1984). Os tecidos foram homogeneizados em 1,2 ml de HCl 25 mM e os extratos foram filtrados, os pigmentos foram removidos por mistura com 15 mg de carvão vegetal. O carvão contendo pigmento foi separado por centrifugação a 5000g por 5 min, e os sobrenadantes foram filtrados novamente. Em seguida foi ajustado o pH para 7 com NaOH. Uma alíquota do extrato foi adicionada a um meio de reação composto por tampão fosfato de potássio 40mM (pH7,4), KCl 120 mM, EDTA 1mM e epinefrina 1 mM. A taxa de produção de superóxido foi determinada como a taxa de sensibilidade da SOD, através da formação de adrenocromo, medida a 485-575nm.

A quantificação de peróxido de hidrogênio foi realizada segundo a metodologia proposta por Velikova; Yordanov; Edreva (2000), onde 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. Uma alíquota do sobrenadante foi adicionada ao meio de reação composto por tampão fosfato de potássio 2,5 mM (pH 7,0) e iodeto de potássio 0,5 M. A concentração de H_2O_2 foi determinada pela absorbância das amostras a 390 nm, com base na curva-padrão de peróxido de hidrogênio.

3.10 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por (Buege; Aust (1978). Duzentos miligramas de tecido radicular e foliar foram macerados em N_2 líquido acrescido de 20% de

PVPP (m/v) e homogeneizados em TCA 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi adicionada ao meio de reação contendo TBA 0,5% (m/v) e TCA 10% (m/v)), incubando-se, em seguida, a 95°C, por 30 minutos. A paralisação da reação ocorreu pelo resfriamento rápido em gelo e as leituras foram realizadas a 535 nm e 600 nm. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600})/(\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1).

3.11 Análise estatística

As variáveis foram analisadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($p \geq 0,05$), quanto à homocedasticidade pelo teste de Barlet ($p \geq 0,05$) e quanto à independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson ($p \geq 0,05$). Aquelas variáveis que não atendiam aos pressupostos da ANAVA foram transformadas por Box-Cox, submetidas aos testes e, finalmente, submetidas à ANAVA e ao teste de médias por Scott-Knott ($p \geq 0,05$), e análise de agrupamento.

4 RESULTADOS

4.1 Quantificação de manganês

As plantas submetidas ao excesso de Mn, independente de aeração ou de pré-tratamento apresentaram maiores concentrações deste elemento quando comparadas as controles (Tabela 1). O excesso de Mn também acarretou maior conteúdo deste elemento nas plantas, sendo mais expressivo naquelas que estavam somente sob excesso de Mn.

Tabela 1: Concentração de manganês em parte aérea e raízes de plantas de soja submetidas diferentes tratamentos: controle (C), excesso de manganês (Mn), pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn (S + Mn), hipoxia com excesso de manganês (H + Mn), pré-tratamento com sacarose + hipoxia com excesso de Mn (S+ H + Mn).

Tratamento	Concentração de Mn (mg. Kg ⁻¹ MS)		
	Parte aérea	Raiz	Total
C	24,7 Ba	14,1Cb	38,8 C
Mn	720,2 Aa	688,4 Ab	1408,6 A
S + Mn	715,0 Aa	707,0 Ab	1422,0 A
H + Mn	720,6 Aa	632,0 Bb	1352,6 B
S + H + Mn	707,5 Aa	658,4 Ab	1365,9 B

As letras maiúsculas comparam os tratamentos, enquanto letras minúsculas comparam parte aérea e raízes, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.2 Caracterização visual dos sintomas de toxicidade por excesso de manganês

Ao avaliar os sintomas verifica-se que plantas controle, apresentaram folhas verdes (Figura 1A), ausência flores (Figura 1B) e raízes escuras e pouco volumosas (Figura 1C) o que caracteriza nenhum sintoma de toxicidade por Mn.

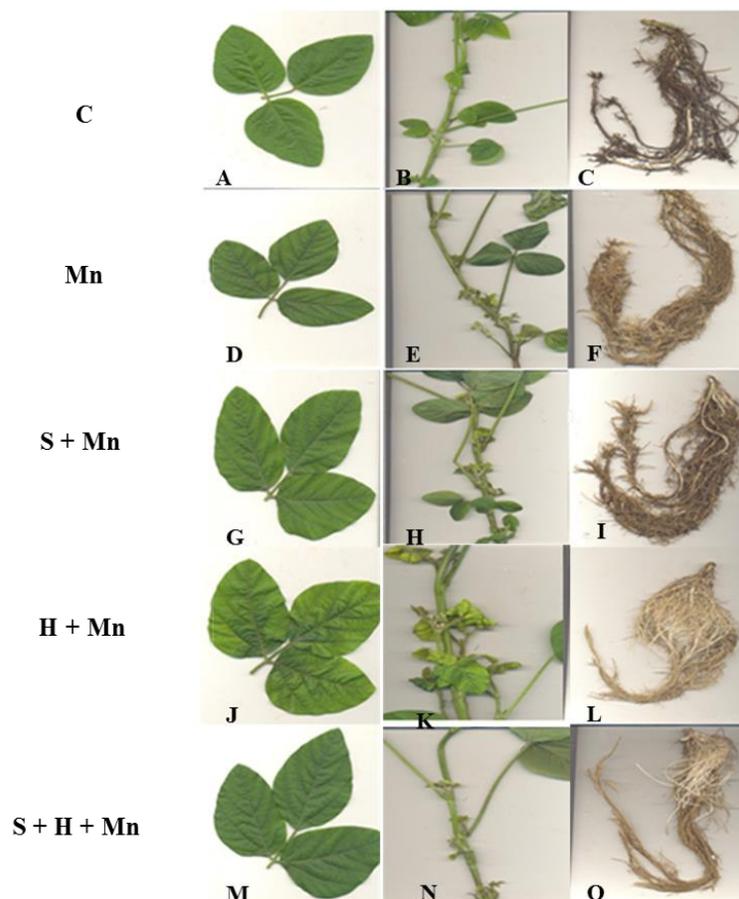
Já as plantas que estavam somente sob excesso de Mn, apresentaram folhas com clorose e pontuações marrons (Figura 1D), essas plantas também apresentaram folhas jovens encarquilhas e engruvinhadas (Figura 1E), as raízes apresentavam coloração clara e maior crescimento do que as plantas controle (Figura 1F). Quando as plantas que estavam somente sob excesso de Mn foram pré-tratadas com sacarose observou-se que estas também apresentam folhas com clorose porém, com poucas pontuações marrons (Figura 1G), as folhas novas também estavam encarquilhas e engruvinhadas porém, em número menor que as não tratadas (Figura 1H). As raízes destas plantas apresentavam raízes com diâmetro maior do que as não tratadas (Figura 1I).

Plantas que foram submetidas a hipoxia mais excesso de Mn apresentaram clorose e pontuações marrons, e folhas jovens encarquilhas e engruvinhadas, (Figura 1J e 1K). As raízes destas plantas também eram claras e com bastante formação de raízes secundárias e adventícias (Figura 1L). O pré-tratamento com sacarose de plantas que estavam submetidas a dois estresses acarretou um menor aparecimento de sintomas quando comparado aos das plantas que estavam sob as mesmas condições e não foram pré-tratadas. Pois, estas plantas não apresentaram clorose nem pontuações marrons nas folhas (Figura 1M), e poucas folhas novas encarquilhas e engruvinhadas (Figura 1N). As raízes eram claras e bem maiores e também com maior formação de raízes secundárias e adventícias (Figura 1O).

O excesso de manganês levou a um encurtamento do ciclo reprodutivo nas plantas, que já se encontravam em floração enquanto as

plantas controle estavam em estágio vegetativo (Figura 1B). Nas plantas que se encontravam em floração verificou-se um abortamento das flores.

Figura 1: Caracterização do aparecimento de sintomas em folíolos expandidos (A, D, G, J, M), caule (B, E, H, K, N) e em raízes (C, F, I, L, O) de plantas de soja submetidas diferentes tratamentos: controle (C), excesso de manganês (Mn), pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn (S + Mn), hipoxia com excesso de manganês (H + Mn), pré-tratamento com sacarose + hipoxia com excesso de Mn (S+ H + Mn).



4.3 Crescimento

Plantas sob excesso de Mn apresentaram menor biomassa. A redução de biomassa de plantas que estavam somente sob excesso de Mn e das que estavam sob os dois estresses quando comparadas às plantas controle foi de 42% e 18%, respectivamente. No entanto, nas plantas pré-tratadas com sacarose, essa redução foi menos expressiva ou não ocorreu. Plantas que estavam somente sob excesso de Mn e que foram pré-tratadas apresentaram um aumento no acúmulo de biomassa de 30% quando comparado aos das plantas que não foram pré-tratadas. Já nas plantas que foram submetidas à hipoxia e ao excesso de Mn houve um acréscimo de 27%.

A elevada concentração de Mn e o pré-tratamento com sacarose não influenciaram o diâmetro do caule das plantas. Entretanto, a condição de aeração influenciou, uma vez que as plantas que estavam sob hipoxia apresentaram um maior diâmetro caule do que as plantas dos demais tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2: Acúmulo de biomassa e diâmetro do caule de plantas de soja submetidas à diferentes tratamentos: controle (C), excesso de manganês (Mn), pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn (S + Mn), hipoxia com excesso de manganês (H + Mn), pré-tratamento com sacarose + hipoxia com excesso de Mn (S+ H + Mn).

Tratamento	Massa seca parte aérea (g)	Massa seca raiz (g)	Massa seca total (g)	Diâmetro do caule (mm)
C	23,0A	6,1A	29,1A	6,1B
Mn	12,8D	3,9C	16,7C	5,9B
S + Mn	17,0C	4,9B	21,9 B	6,1B
H + Mn	18,7B	5,4B	24,1B	9,3A
S + H + Mn	23,9A	6,3A	30,2A	9,0A

As letras maiúsculas comparam o efeito dos tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.4 Quantificação de cobre, zinco e ferro

O excesso de Mn acarretou uma redução na concentração de Cu, Zn e Fe tanto na parte aérea com nas raízes em relação às plantas controle. Entretanto, o pré-tratamento com sacarose impediu esta redução apenas nas plantas que se encontravam sob hipoxia e excesso de Mn quando se avaliou a concentração de Cu nas raízes (Tabela 3).

Tabela 3: Concentração de cobre (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe) em parte aérea e raízes de plantas de soja submetidas diferentes tratamentos: controle (C), excesso de manganês (Mn), pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn (S + Mn), hipoxia com excesso de manganês (H + Mn), pré-tratamento com sacarose + hipoxia com excesso de Mn (S+ H + Mn).

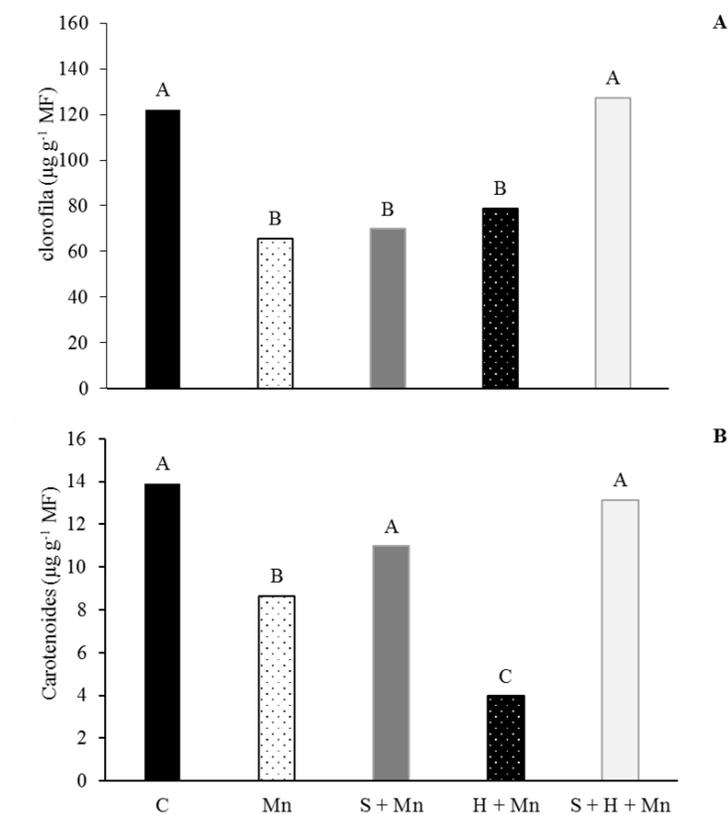
Tratamento	Concentração de Cu (mg. Kg MS ⁻¹)		Concentração de Zn (mg. Kg MS ⁻¹)		Concentração de Fe (mg. Kg MS ⁻¹)	
	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz
C	7,5A	18,8A	38,5A	39,9A	177,5A	471,4A
Mn	5,3B	7,5C	25,8B	15,4D	125,6B	332,9B
S + Mn	4,4C	13,3B	23,0B	28,1B	110,6C	326,3B
H + Mn	3,5C	8,7C	27,2B	16,8D	124,0B	350,1B
S + H + Mn	2,8D	20,3A	25,4B	24,7C	125,3B	347,2B

As letras maiúsculas comparam o efeito dos tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.5 Quantificação de pigmentos

O excesso de Mn causou uma redução nos teores de clorofila e carotenoides. Entretanto, o pré tratamento com sacarose impediu que a redução de clorofila ocorresse somente em plantas sob hipoxia mais excesso de Mn. Já para os níveis de carotenoides o pré-tratamento foi eficaz em impedir esta redução em todos os tratamentos (Figura 2).

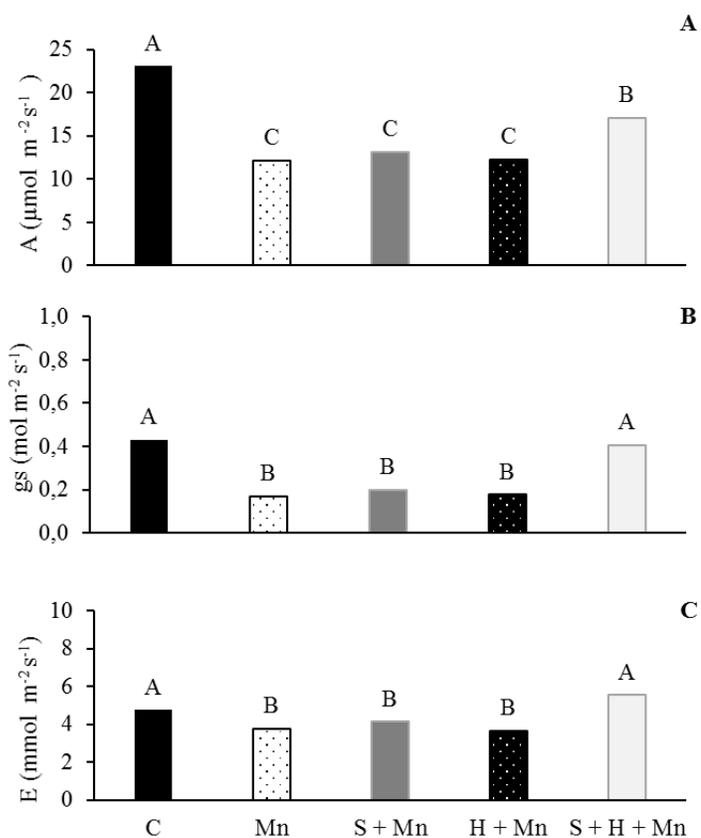
Figura 2: Concentração de clorofila (A) e carotenoides (B) de plantas de soja sob diferentes tratamentos controle (C), excesso de manganês (Mn), pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn (S + Mn), hipoxia com excesso de manganês (H + Mn), pré-tratamento com sacarose + hipoxia com excesso de Mn (S+ H + Mn). As letras comparam o efeito dos tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



4.6 Trocas gasosas

O excesso de Mn reduziu a taxa fotossintética (Figura 3A), a condutância estomática (Figura 3B), e transpiração (Figura 3C) quando comparado ao controle, entretanto o pré-tratamento com sacarose de plantas que foram submetidas à hipoxia e excesso de Mn, fez com que esta redução fosse menos expressiva no caso da taxa fotossintética e que não ocorresse nos demais parâmetros.

Figura 3: Taxa fotossintética - A (A), condutância estomática - g_s (B), transpiração - E (C), de plantas soja sob diferentes tratamentos: controle (C), excesso de manganês (Mn), pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn (S + Mn), hipoxia com excesso de manganês (H + Mn), pré-tratamento com sacarose + hipoxia com excesso de Mn (S+H + Mn). As letras comparam o efeito dos tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



4.7 Carboidratos

Ao avaliar o conteúdo de sacarose na parte aérea verificou-se que plantas que estavam sob hipoxia e excesso de Mn apresentaram maior conteúdo do que os demais tratamentos. Ao avaliar o efeito do pré-tratamento observa-se que em plantas que estavam somente sob excesso de Mn o pré-tratamento levou um acréscimo no conteúdo de sacarose. Nas plantas que foram expostas à combinação de estresses o pré-tratamento acarretou efeito inverso. No tecido radicular as plantas

que estavam sob hipoxia e excesso de Mn e não foram pré-tratadas, apresentaram maior conteúdo deste açúcar quando comparadas aos demais tratamentos.

O conteúdo de amido também foi influenciado pelo pré-tratamento com sacarose. Na parte aérea observou-se que, plantas que foram pré-tratadas apresentaram maior conteúdo quando comparadas às não pré-tratadas. Já no tecido radicular o pré-tratamento levou a uma redução no conteúdo quando as plantas estavam expostas somente ao excesso de Mn e um acréscimo quando expostas a hipoxia mais excesso de Mn. Ao avaliar o particionamento de carboidratos entre parte aérea e raízes observa-se que parte aérea apresenta maior conteúdo do que as raízes (Tabela 4).

Tabela 4: Conteúdo de sacarose e amido em parte aérea e raízes de plantas de soja submetidas diferentes tratamentos: controle (C), excesso de manganês (Mn), pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn (S + Mn), hipoxia com excesso de manganês (H + Mn), pré-tratamento com sacarose + hipoxia com excesso de Mn (S+ H + Mn).

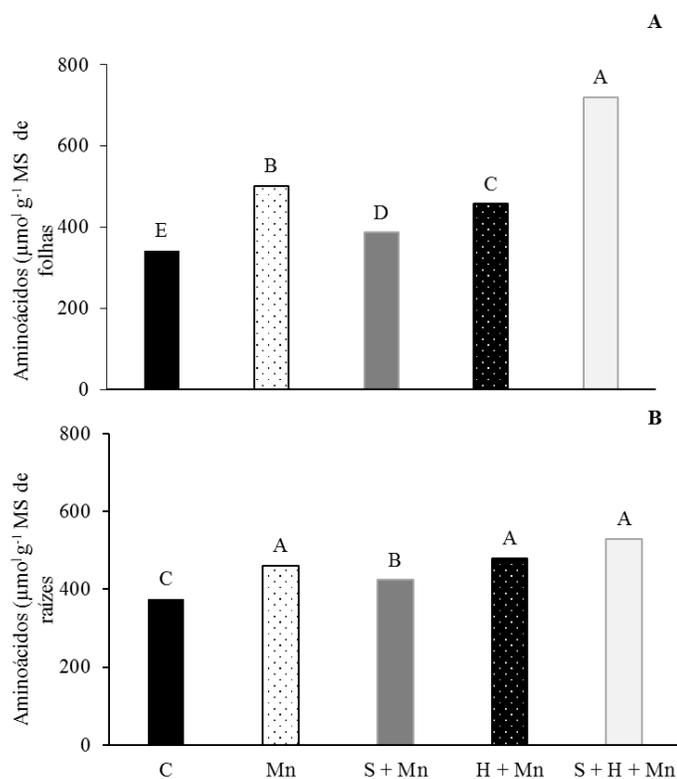
Tratamento	Sacarose (μmol de glicose. parte planta)		Amido (μmol de glicose. parte planta)	
	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz
C	1632,2Ca	2,4Bb	403,9Ca	16,2Bb
Mn	1294,5Da	2,0Bb	453,9Ca	15,4Bb
S + Mn	1736,6Ca	2,5Bb	584,6Ba	10,4Cb
H + Mn	2812,6Aa	3,4Ab	633,2Ba	16,6Bb
S + H + Mn	2404,2Ba	2,7Bb	784,0Aa	20,2Ab

As letras maiúsculas comparam os tratamentos, enquanto letras minúsculas comparam parte aérea e raízes, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.8 Aminoácidos

O excesso de Mn levou a um acréscimo no conteúdo de aminoácidos tanto na parte aérea como nas raízes. O pré-tratamento com sacarose acarretou um aumento mais acentuado de aminoácidos na parte aérea de plantas sob hipoxia e excesso de Mn, entretanto nas plantas que estavam sob excesso de Mn o pré-tratamento com sacarose apresentou efeito contrário, comportamento este também encontrado nas raízes (Figura 4).

Figura 4: Conteúdo de aminoácidos totais em parte aérea e raízes de plantas de soja submetidas diferentes tratamentos: controle (C), excesso de manganês (Mn), pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn (S + Mn), hipoxia com excesso de manganês (H + Mn), pré-tratamento com sacarose + hipoxia com excesso de Mn (S+ H + Mn). As letras maiúsculas comparam o efeito dos tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



4.9 Enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes, SOD, CAT, APX, GPX, GR e DHAR foi avaliada em folhas e raízes (Figura 5A – 5L). A atividade da SOD nas folhas, não foi influenciada pelos tratamentos em que as plantas foram submetidas, entretanto, nas raízes, o excesso de Mn levou a um acréscimo na atividade em relação aos demais tratamentos (Figuras 5A e 5B).

A atividade da APX nas folhas foi elevada pelo excesso de Mn, sendo este acréscimo mais expressivo em plantas que foram pré-tratadas. No tecido radicular, verifica-se que o excesso de Mn reduziu ou manteve a atividade. Ao contrário do encontrado para as folhas o pré-tratamento com sacarose manteve ou reduziu a atividade dessa enzima (Figuras 5C e 5D).

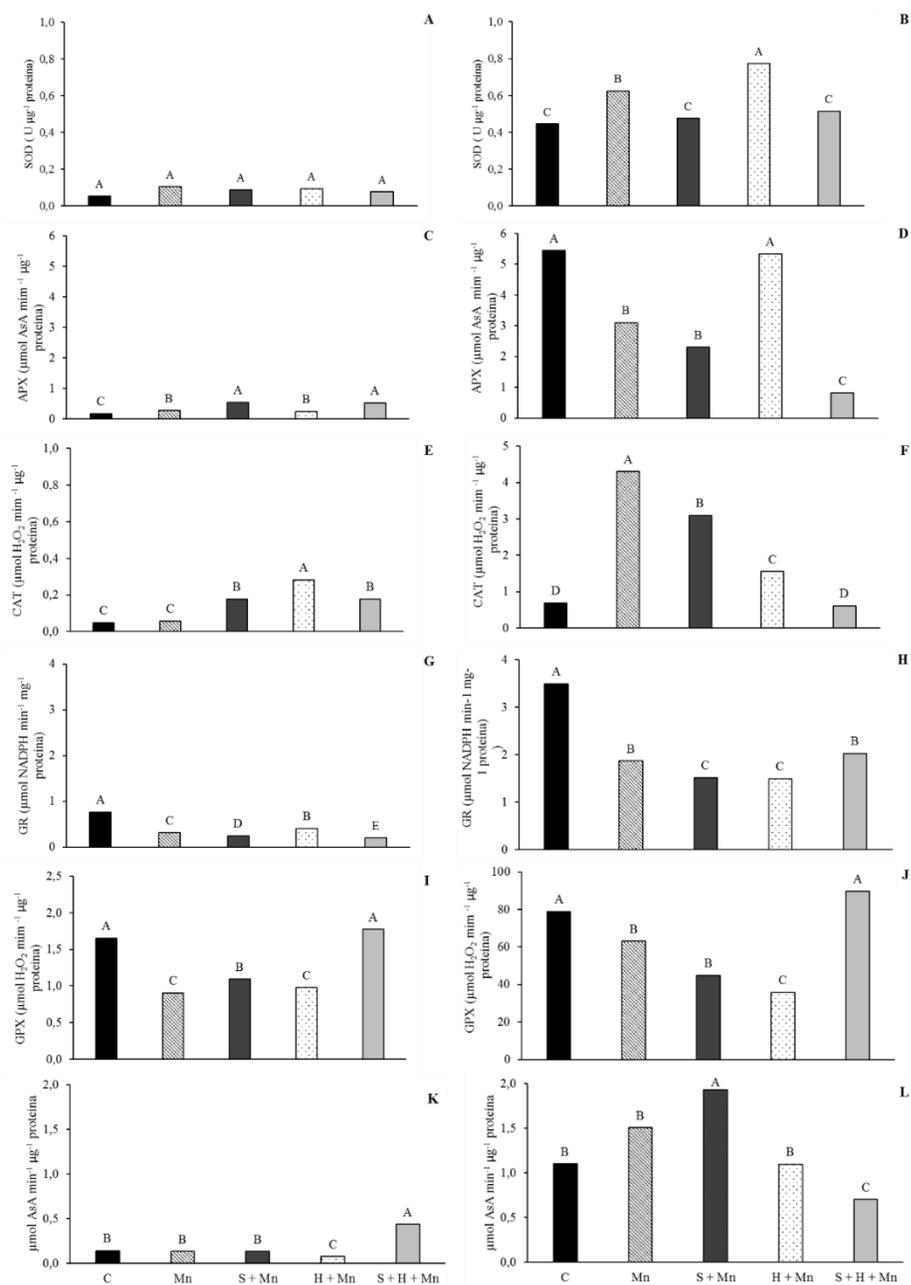
Para a enzima catalase não houve um padrão de atividade, sendo que de modo geral o pré-tratamento com sacarose levou uma redução na atividade em relação as plantas não tratadas, exceto para o tratamento excesso de Mn (Mn) em folhas (Figura 5E e 5F).

O excesso de Mn, reduziu a atividade da enzima GPX nas folhas, entretanto o pré-tratamento com sacarose levou a um acréscimo que foi mais expressivo nas plantas que estavam sob hipoxia mais excesso de Mn (Figura 5G). Nas raízes, o excesso de Mn levou uma redução na atividade da GPX. Por outro lado, o pré-tratamento com sacarose elevou a atividade somente em plantas sob hipoxia mais Mn. (Figura 5H).

A alta concentração de Mn na solução nutritiva, também reduziu a atividade da enzima GR em folhas e raízes (Figuras 5I e 5J). A atividade dessa enzima foi promovida pelo pré-tratamento com sacarose somente nas raízes de plantas sob hipoxia + Mn.

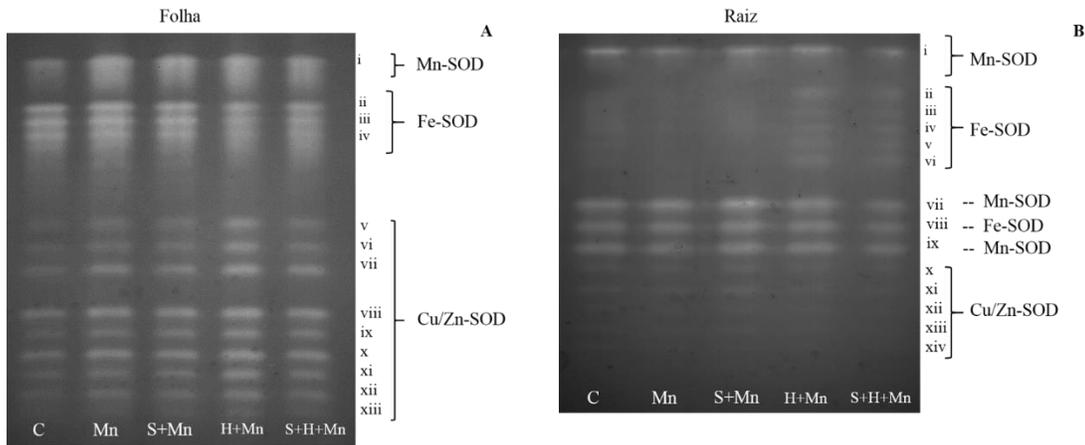
No que se refere a atividade da enzima DHAR nas folhas, verifica-se que, somente plantas que estavam sob hipoxia e excesso de Mn, apresentaram alteração na atividade, que foi reduzida. Porém, quando foram pré-tratadas com sacarose elas apresentaram um aumento da atividade (Figura 5K). Já nas raízes, observa-se que, a sacarose promoveu a atividade (Figura 5L).

Figura 5: Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A e B), APX (C e D), CAT (E e F), GPX (G e H), GR (I e J) e DHAR (K e L), em parte aérea e raízes de plantas de soja submetidas diferentes tratamentos: controle (C), excesso de manganês (Mn), pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn (S + Mn), hipoxia com excesso de manganês (H + Mn), pré-tratamento com sacarose + hipoxia com excesso de Mn (S+ H + Mn). As letras maiúsculas comparam o efeito dos tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



O zimograma da SOD para amostras de folhas permitiu a detecção de uma isoforma de Mn-SOD (i), três isoformas de Fe-SOD (ii, iii, iv) e nove isoformas de Cu/Zn-SOD (v a xiii). Não houve diferença no padrão de isoformas entre os diferentes tratamentos para folhas. Em raízes, também foi possível detectar as isoformas Mn-SOD (i, vii e ix), Fe-SOD (ii a vi e viii) e Cu/Zn-SOD (x a xiv). As isoformas de Fe-SOD (ii a vi) não foram detectadas nas raízes de plantas submetidas ao excesso de Mn.

Figura 6: Zimograma da SOD em folhas (A) e raízes (B) de plantas de soja submetidas a diferentes tratamentos: controle (C), excesso de manganês (Mn), pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn (S + Mn), hipoxia com excesso de manganês (H + Mn), pré-tratamento com sacarose + hipoxia com excesso de Mn (S+ H + Mn). O gel representa o padrão encontrado para três corridas de cada tecido vegetal, com amostras compostas por tecidos das cinco repetições.



4.10 Antioxidantes não enzimáticos

Ao avaliar a concentração de ascorbato, verifica-se que, o excesso de Mn levou de modo geral um incremento na concentração desse antioxidante tanto em folhas como em raízes. Entretanto, quando as plantas foram tratadas com sacarose essas apresentaram um maior incremento de ascorbato (Tabela 5).

A concentração de frutanos também foi influenciado pela alta concentração de Mn. Plantas que estavam somente sob excesso de Mn apresentaram um aumento na concentração nas folhas, já as plantas que estavam sob hipoxia e excesso de Mn uma redução. Porém, quando ocorreu o pré-tratamento houve um aumento na concentração de frutanos tanto nas folhas como nas raízes (Tabela 5).

O excesso de Mn elevou as concentrações de prolina na parte aérea e reduziu ou manteve nas raízes. A adição do pré-tratamento com sacarose aumentou a concentração de prolina quando comparado as plantas não tratadas nos dois tecidos avaliados (Tabela 5).

A quantificação de antocianinas foi realizada em folhas e raízes, entretanto, nas raízes não foi possível detectar essa substância. Nas folhas, todos os tratamentos apresentaram maior concentração de antocianinas quando comparado ao controle. O pré-tratamento com sacarose, induziu uma maior produção de antocianinas somente em plantas que estavam sob hipoxia e excesso de Mn (Tabela 5).

Tabela 5: Concentração de ascorbato, frutanos, prolina e antocianinas em parte aérea e raízes de plantas de soja submetidas diferentes tratamentos: controle (C), excesso de manganês (Mn), pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn (S + Mn), hipoxia com excesso de manganês (H + Mn), pré-tratamento com sacarose + hipoxia com excesso de Mn (S+ H + Mn).

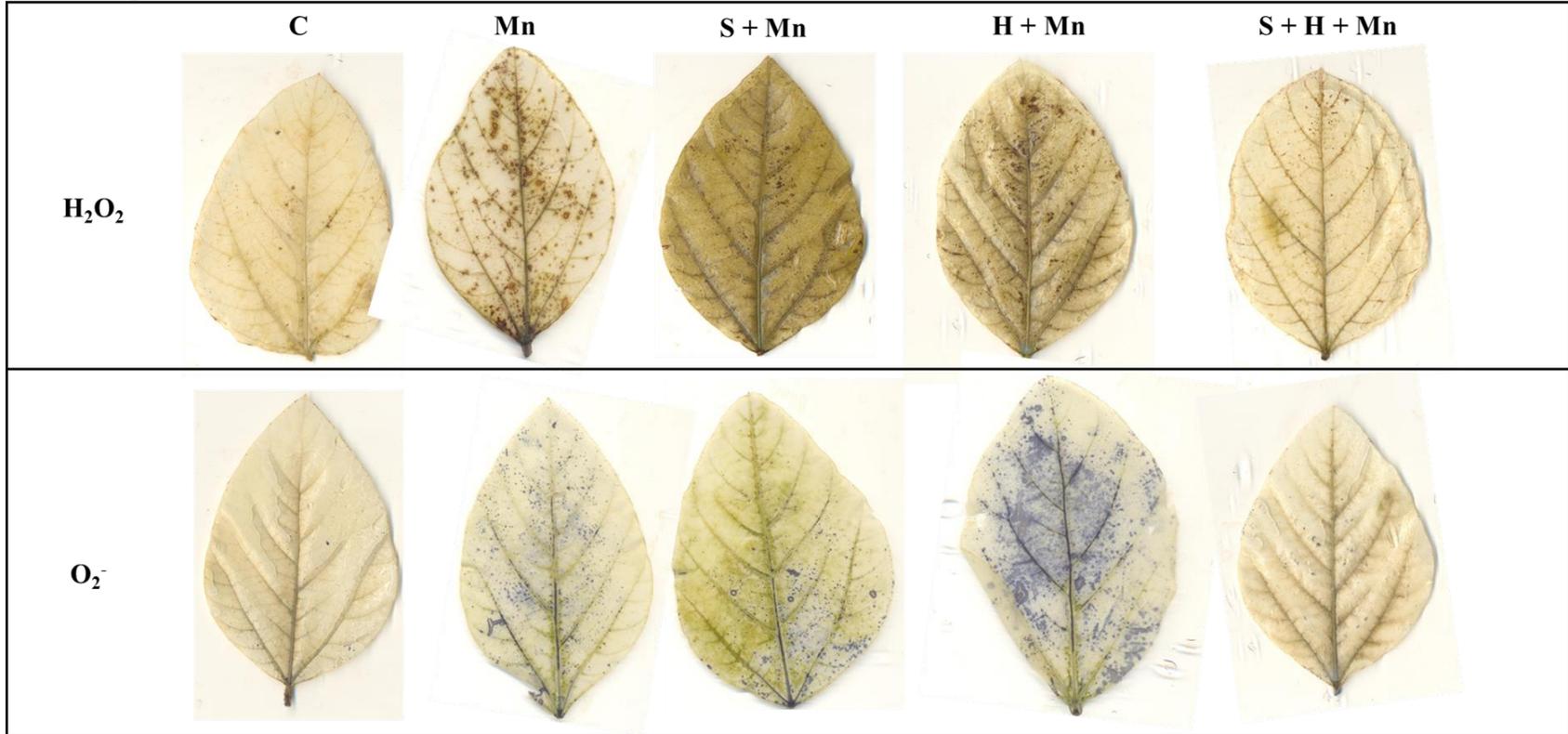
Tratamento	Ascorbato ($\mu\text{g. mg}^{-1}$ MF)		Frutanos ($\mu\text{mol de frutose. g}^{-1}$ MF)		Prolina ($\eta\text{mol mg}^{-1}$ MF)		Antocianinas (U. mg^{-1} MF)	
	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz
C	0,69D	0,77D	67,00C	29,00C	13,00D	9,00A	0,04D	-
Mn	0,65D	0,89C	379,00B	62,00C	18,00C	1,00C	0,21B	-
S + Mn	1,39A	1,13B	324,00B	435,00A	25,00B	8,00A	0,24B	-
H + Mn	0,93C	0,85C	46,00D	22,00C	21,00C	3,00B	0,15C	-
S + H + Mn	1,23B	1,46A	1468,00A	181,00B	32,00A	8,00A	0,35A	-

As letras maiúsculas comparam os tratamentos, enquanto letras minúsculas comparam parte aérea e raízes, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.11 Localização foliar e quantificação de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

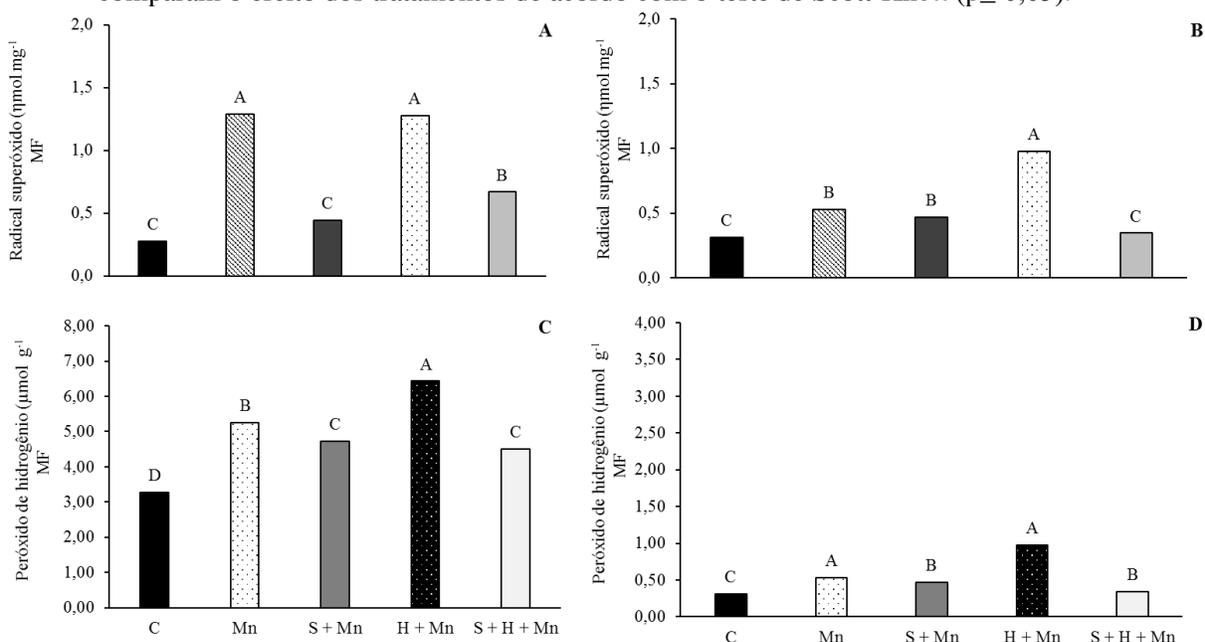
Os ensaios de localização subcelular de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ foram baseados na formação de pontuações marrons para locais com H_2O_2 e azuis para os locais como radical $O_2^{\cdot-}$. Quanto maior a intensidade de coloração maior a presença dessa EROs nas folhas. Dessa maneira, houve maior produção de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ em folhas sob excesso de Mn. O pré-tratamento com sacarose reduziu a geração dessas EROs (Figura 7).

Figura 7: Localização de H_2O_2 e de O_2^- em trifólio de plantas de soja submetidas diferentes tratamentos: controle (C), excesso de manganês (Mn), pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn (S + Mn), hipoxia com excesso de manganês (H + Mn), pré-tratamento com sacarose + hipoxia com excesso de Mn (S+ H + Mn).



Após a localização subcelular procedeu-se os ensaios para quantificação das EROs visando verificar os efeitos dos diferentes tratamentos nos níveis de H_2O_2 e de $O_2^{\cdot-}$. Os tratamentos em que as plantas foram submetidas, levou a uma maior produção do radical superóxido (Figura 8A e 8B) e de peróxido de hidrogênio (Figura 8C e 8D) tanto em folhas quanto em raízes. Entretanto, o pré-tratamento com sacarose reduziu a concentração desses radicais.

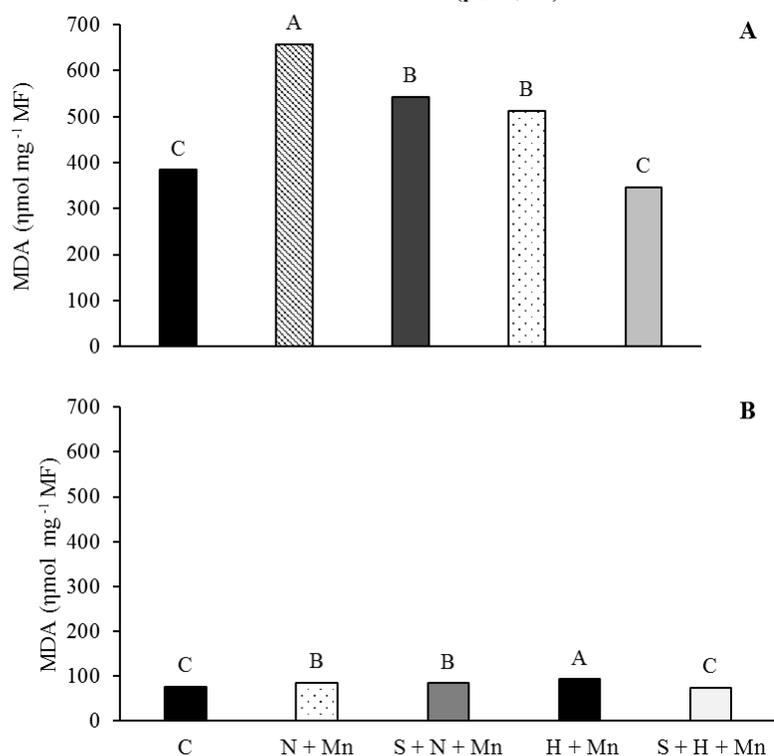
Figura 8: Quantificação de peróxido de hidrogênio e superóxido, em folhas (A, C) e raízes (B, D) de plantas de soja submetidas diferentes tratamentos: controle (C), excesso de manganês (Mn), pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn (S + Mn), hipoxia com excesso de manganês (H + Mn), pré-tratamento com sacarose + hipoxia com excesso de Mn (S+ H + Mn). As letras maiúsculas comparam o efeito dos tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



4.12 Peroxidação lipídica

Ao avaliar os danos causados pelos estresses em que as plantas foram submetidas, verifica-se que o excesso de Mn e a combinação de hipoxia e de excesso de Mn levou a uma maior peroxidação lipídica das membranas, o que pode ser confirmado pela maior concentração de malondialdeído encontrado nesses tratamentos quando comparados ao controle. O pré-tratamento com sacarose de modo geral reduziu a peroxidação lipídica, quando comparado as plantas que não foram pré-tratadas (Figura 9).

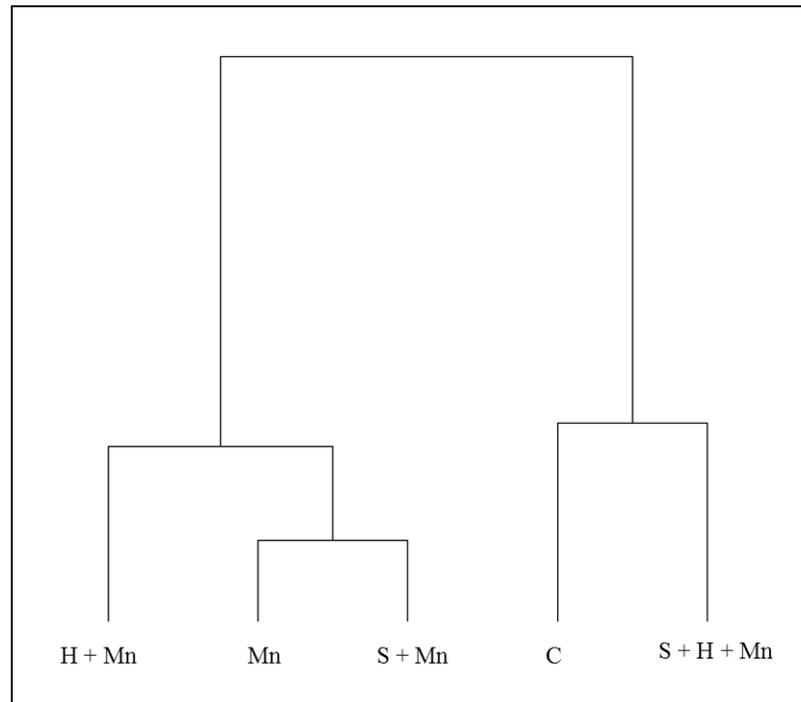
Figura 9: Quantificação de malondialdeído (MDA), em folhas (A) e raízes (B) de plantas de soja submetidas diferentes tratamentos: controle (C), excesso de manganês (Mn), pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn (S + Mn), hipoxia com excesso de manganês (H + Mn), pré-tratamento com sacarose + hipoxia com excesso de Mn (S+ H + Mn). As letras maiúsculas comparam o efeito dos tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Para avaliar a similaridade dos tratamentos com base nas médias das cinco repetições de parte aérea e raízes, realizou-se uma análise de agrupamento. As plantas que foram pré-tratadas com sacarose e submetidas a hipoxia mais excesso de Mn apresentaram uma grande similaridade

com a controles. Em contrapartida, as plantas que estavam somente sob hipoxia foram mais semelhantes às plantas que estavam sob excesso de Mn independente da ocorrência do pré-tratamento. Apesar das alterações fisiológica promovidas pelo pré-tratamento com sacarose frente ao estresse, plantas dos tratamentos Mn e S + Mn apresentaram grande similaridade. Por outro lado, em plantas que estavam sob hipoxia e excesso de Mn o pré-tratamento influenciou fortemente as respostas, uma vez que plantas do tratamento H + Mn e S + H + Mn ocuparam posições opostas no dendograma, demonstrando menor similaridade (Figura 10).

Figura 10: Dendograma para similaridade entre os tratamentos controle (C), excesso de manganês (Mn), pré-tratamento com sacarose + excesso de Mn (S + Mn), hipoxia com excesso de manganês (H + Mn), pré-tratamento com sacarose + hipoxia com excesso de Mn (S+ H + Mn). Resultados baseados nas médias das cinco repetições de parte aérea e raízes de cada um dos tratamentos.



5 DISCUSSÃO

O excesso de Mn causou alterações dos parâmetros avaliados, como redução no acúmulo de biomassa, absorção de nutrientes, concentração de pigmentos e trocas gasosas. Também alterou a atividade das enzimas antioxidantes e a concentração de antioxidantes não enzimáticos. Porém, quando houve a combinação de estresse as plantas tiveram uma melhor performance dos

parâmetros avaliados, o que resultou em um maior acúmulo de biomassa. O pré-tratamento com sacarose levou a um melhor desempenho das plantas, sendo seu efeito mais pronunciado nas plantas que estavam sob hipoxia e excesso de Mn, pois tiveram melhores respostas do sistema antioxidante, o que resultou em um menor estresse oxidativo e menores alterações dos parâmetros avaliados.

Plantas cultivadas sob excesso de Mn apresentaram concentrações tóxicas desse elemento na parte aérea e nas raízes o que confirma a condição de excesso de Mn, pois, para a soja a concentração de Mn considerada tóxica é acima de 250 mg. kg^{-1} , sendo que todos os tratamentos exceto o controle apresentaram concentrações bem maiores da considerada tóxica para a soja (MASCARENHAS et al., 2013). A maior absorção de Mn interfere na absorção de outros cátions como cobre, zinco e ferro. Nas plantas sob excesso de Mn a redução na concentração de Fe, Cu e Zn ocorreu pelo fato de que estes elementos apresentam um raio iônico muito próximos, podendo assim competir pelos mesmos transportadores (PITTMAN, 2005; MILLALEO et al., 2013; TEWARI; KUMAR; SHARMA, 2013). Apesar do excesso de Mn ter reduzido a absorção de Fe, Cu e Zn, as plantas não apresentaram deficiência desses nutrientes, exceto para o elemento Cu na parte aérea de plantas que estavam sob excesso de Mn e foram pré-tratadas e de plantas que estavam sob hipoxia e excesso independente do pré-tratamento. Verificou-se também que a sacarose levou à uma maior concentração de cobre e zinco nas raízes, indicando que a sacarose pode de alguma maneira ter ativado algum mecanismo que reduziu a competição entre Mn e estes elementos.

No que se refere ao efeito do pré-tratamento, as plantas sob combinação de estresse apresentaram menores concentrações de Mn (Tabela 1). A absorção de Mn pelas plantas não teve relação com a condutância estomática (Figura 3). No caso das plantas sob hipoxia, a redução da absorção pode ter ocorrido devido às alterações metabólicas decorrentes da hipoxia. Um dessas alterações é a ativação da respiração anaeróbica. Nessa condição há a menor disponibilidade de ATP e consequentemente menor absorção de nutrientes pelas plantas visando reduzir o gasto energético (KREUZWIESER; GESSLER, 2010). Além disso, a respiração anaeróbica leva à acidificação do pH citosólico, podendo inibir as aquaporinas (TOURNAIRE-ROUX et al., 2003). As aquaporinas são responsáveis pela absorção de água e nutrientes (AFZAL et al., 2016). Desta maneira, a menor concentração e conteúdo de Mn encontrado nas plantas que estavam sob hipoxia pode ter ocorrido em decorrência da inibição das aquaporinas.

Uma vez não observado deficiência de Cu, Zn e Fe, os sintomas visuais foram resultado do excesso de Mn nas plantas. Os sintomas de toxidade nas folhas foram pontuações marrons, clorose e encarquilhamento. As pontuações marrons são depósitos de óxidos de Mn e de fenóis oxidados. Esses complexos formados tem a função de tornar o Mn inativo evitando que cause maiores danos (MOU et al., 2011). Lavres Junior et al. (2008) e Santos et al. (2017) também encontram pontuações marrons em folhas de soja sob excesso de Mn. Além desses sintomas o excesso de Mn acarretou um encurtamento do biociclo vegetal, em que as plantas submetidas ao excesso Mn apresentaram florescimento precoce em relação às plantas controle. Esse adiantamento das fases de desenvolvimento ocorre devido à aceleração do biociclo vegetal sob condição de estresse visando a manutenção da reprodução das espécies (TAIZ; ZEIGER, 2013). Em resposta a hipoxia observou-se a formação de raízes adventícias. As raízes adventícias são modificações morfológicas apresentadas por plantas submetidas ao alagamento como forma de sobrevivência ao estresse, pois permitem uma maior captação de O₂ para a manutenção do metabolismo (PIRES; SOPRANO; CASSOL, 2002; VOESENEK; BAILEY-SERRES, 2013).

Embora não tenha ocorrido diferença na concentração total de Mn entre plantas tratadas e não pré-tratadas, os sintomas foram atenuados pelo pré-tratamento com sacarose, com redução na intensidade da clorose, maior formação de raízes adventícias e menor abortamento floral (Figura 1). A sacarose também otimizou a atuação do sistema antioxidante principalmente promovendo a maior biossíntese de antioxidantes não enzimáticos resultando em menor peroxidação lipídica.

A atividade das enzimas antioxidantes apresentou padrões distintos em resposta ao excesso de Mn e ao pré-tratamento com sacarose, com maior atividade nas raízes do que nas folhas. Esse comportamento já foi verificado em plantas de soja quando submetidas ao excesso de Mn (SANTOS et al., 2017). Segundo Gratão et al., (2005), a atividade das enzimas antioxidantes tende a ser mais alta no tecido que está em contato com a fonte de toxidade, sendo esse um mecanismo de defesa das plantas.

No que se refere ao comportamento da enzima SOD, verifica-se que, nas folhas ela não alterou sua atividade com a exposição das plantas aos tratamentos. Nas raízes o pré-tratamento reduziu a atividade dessa enzima. Nas plantas que foram pré-tratadas com sacarose isso pode ter ocorrido devido às maiores concentrações de antioxidantes não enzimáticos. Compostos como ascorbato, frutanos, prolina e antocianinas atuam neutralizando os radicais superóxido e hidroxila (NOCTOR; MHAMDI A; FOYER, 2014; VAN DEN ENDE; EL-ESAWI, 2014). Nesse caso, não

houve necessidade de ativação da enzima. Ao avaliar o zimograma observa-se que não houve variação das isoformas em função do pré-tratamento com sacarose. Entretanto, a condição de aeração modificou as isoformas, uma vez que isoformas de Fe-SOD (ii a vi) não foram detectadas nas raízes de plantas submetidas ao excesso de Mn (Figura 6).

Quando as plantas estavam somente sob excesso de Mn, verificou-se que, o pré-tratamento levou à um acréscimo da atividade das enzimas APX, CAT e GPX nas folhas e quando as plantas estavam sob combinação de estresses apenas as enzimas APX e GPX apresentaram esse comportamento. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que as plantas que estavam submetidas somente ao excesso de Mn estavam em uma condição de estresse mais severo, pois, essas apresentavam um maior conteúdo de Mn e de MDA, dessa forma houve a necessidade de ativação de três enzimas antioxidantes. Já as plantas que estavam sob hipoxia e excesso de Mn estavam submetidas a uma condição de estresse menos severo pois tinham menores concentrações de Mn e de MDA, por isso, apenas duas enzimas foram ativadas.

No tecido radicular observa-se que, nas plantas que estavam sob excesso de Mn e sob combinação de estresses que, o pré-tratamento com sacarose reduziu a atividade das enzimas APX, CAT e GPX, exceto nas plantas sob combinação de estresse em que a enzima GPX teve um acréscimo da atividade. Esse acréscimo na atividade da GPX pode ter sido uma estratégia para reduzir a absorção de Mn, pelo aumento da biossíntese de lignina (GRATÃO et al., 2005). No entanto a maior atividade da GPX não alterou a absorção de Mn.

No que se refere a atividade das enzimas que fazem parte do ciclo ascorbato glutationa (APX, GR e DHAR) nas folhas, verifica-se, que, quando as plantas estavam somente sob excesso de Mn houve um acréscimo da atividade da APX, uma redução da atividade da GR e uma manutenção da DHAR. Esse comportamento pode indicar que o ascorbato pode estar vindo de outra rota que não seja o ciclo ascorbato glutationa, uma vez que não houve ativação das enzimas GR e DHAR. LI et al., (2010) sugeriram que a DHAR não é a principal rota de regeneração de ascorbato nesse ciclo. Diante do papel da sacarose na promoção da biossíntese de ascorbato, sugere-se que o ascorbato utilizado por essa enzima pode ter vindo direto da rota de biossíntese não havendo necessidade de reciclagem desse componente pelo ciclo ascorbato glutationa. Em *Arabidopsis thaliana* o suprimento da solução de cultivo com sacarose levou a um aumento de quatro vezes na concentração desse antioxidante quando comparado às plantas controle. Além disso, também foi constatado que o aumento na concentração de ascorbato induz transcrição da

APX, ou seja, a transcrição da APX é controlada pelo açúcar via biossíntese do ascorbato, (HEIBER; CAI; BAIER, 2014). Isso justifica a maior atividade da APX, nas plantas que foram pré-tratadas com sacarose.

Já quando as plantas foram submetidas a hipoxia e excesso de Mn o mesmo comportamento foi observado. Entretanto, quando foram pré-tratadas com sacarose a maior atividade da APX permaneceu e também houve um incremento da atividade da DHAR indicando que nesse tratamento houve a necessidade da ativação da enzima que recicla o ascorbato visando a manutenção da atividade da APX. Nas raízes o pré-tratamento com sacarose influenciou a atividade da APX somente quando as plantas estavam sob combinação de estresses. Ao contrário do ocorrido nas folhas houve uma redução da atividade da DHAR e um acréscimo da atividade da GR. Esse aumento da atividade da GR pode ter ocorrido em decorrência de que o conteúdo de GSH substrato da GR, é aumentado em respostas aos açúcares, uma vez que a sacarose exógena pode alimentar a via oxidativa da pentose fosfato criando uma potência redutora para a produção de GSH (BOLOURI-MOGHADDAM et al., 2010).

Além da atividade das enzimas antioxidantes, a sacarose estimula a biossíntese de frutanos, prolina e antocianinas. A sacarose é essencial para indução do gene *Ft* que codifica as duas frutossiltransferases, envolvidas na biossíntese de frutanos. A enzima 1-SST catalisa a formação de 1-cetose de forma irreversível a partir de duas moléculas de sacarose com a liberação de uma glicose. A 1-FFT, catalisa a transferência reversível de uma unidade frutossil de uma molécula frutano para outra molécula de frutano, ou para a sacarose, resultando em moléculas de frutanos com comprimentos de cadeias variáveis (VAN DEN ENDE; EL-ESAWI, 2014).

Os frutanos são antioxidantes que podem estar localizados no vacúolo para neutralizar o H_2O_2 , que pode se difundir pelo tonoplasto. Neste local, as peroxidases agem neutralizando o H_2O_2 , entretanto, a atividade dessas enzimas é acompanhada pela produção de OH^- e OOH^- através do ciclo hidroxílico dessas enzimas (PASSARDI; PENEL; C DUNAND, 2004; DUNAND; CRÈVECOEUR; PENEL, 2006). Assim, os frutanos vacuolares neutralizam esses radicais formando radical frutano que é menos nocivo e que pode voltar a açúcar através de compostos fenólicos e antocianinas (TAKAHAMA, 2004; VAN DEN ENDE; VALLURU, 2009; BOLOURI-MOGHADDAM et al., 2010). Os frutanos também tem uma relação com as mudanças na concentração de ascorbato e de GSH, indicando uma conexão com o sistema antioxidante. Sugere-se que a glicose produzida pela enzima frutossil transferase após retranslocação para o citoplasma

poderia aumentar a biossíntese de antioxidantes clássicos estabelecendo uma conexão direta entre o sistema antioxidante vacuolar e citoplasmático (DE GARA et al., 2003; PARADISO et al., 2006).

O aumento de prolina está associado a níveis aumentados de sacarose, demonstrando que sua síntese também depende de eventos de sinalização específicos de sacarose (HANSON et al., 2008). Isto é conseguido através da regulação da transcrição dos genes que codificam a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase, enzima que faz parte da rota de biossíntese da prolina (HELLMANN et al., 2000; SZÉKELY et al., 2008). Além do seu papel como osmorregulador, a prolina também apresenta função antioxidante, atuando como um antioxidante não enzimático para a manutenção da homeostase celular sobre diferentes estresses. Esse comportamento também foi verificado em plântulas de pepino pré-tratadas com sacarose submetidas ao frio (CAO et al., 2014)

As antocianinas desempenham um papel importante nas respostas ao estresse das plantas como moléculas antioxidantes na proteção contra danos oxidativos (GOULD; MCKELVIE; MARKHAM, 2002; NAGATA et al., 2003; VAN DEN ENDE; EL-ESAWI, 2014). Elas neutralizam as EROs, formando radicais de compostos fenólicos que são neutralizados pelo ascorbato (PESHEV et al., 2013). O mecanismo exato de como a sacarose induz a biossíntese de antocianinas ainda é desconhecido, sabe-se apenas que a sacarose ativa uma via de sinalização específica que induz a expressão de *PAP1 / MYB75* o qual está relacionado a regulação da biossíntese de antocianinas (KRANZ et al., 1988; SHIN et al., 2013).

A melhoria na performance do sistema antioxidante de plantas pré-tratadas com sacarose possibilitou maior neutralização de EROs (Figuras 6 e 8), manutenção da homeostase e menores danos as membranas celulares (Figura 9). A redução do estresse oxidativo pelo pré-tratamento com sacarose influenciou no conteúdo de pigmentos, as trocas gasosas, aminoácidos e finalmente no acúmulo de biomassa dessas plantas. O aumento nos níveis de pigmentos bem como das trocas gasosas já foi relatado em vários trabalhos onde plantas submetidas a diferentes estresses foram pré-tratadas com açúcares (SULMON et al., 2007; ALI; ASHRAF, 2011; MENG et al., 2013; QIU et al., 2014; SOUZA, 2014). Esta otimização dos parâmetros pode ter ocorrido devido às funções da sacarose como antioxidante ou como indutora do sistema antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo (UEMURA; STEPONKUS, 2003).

O excesso de Mn acarretou uma menor concentração de clorofila e carotenoides, fato relatado para *Pisum sativum* (REZAI; FARBOODNIA, 2008), *Phaseolus vulgaris* (ZENGIN, 2013). A redução desses pigmentos pode ter ocorrido porque o excesso de metais leva a um maior

estresse oxidativo que aumenta a degradação e reduz a biossíntese destes pigmentos (HUANG et al., 2016). Além de modificações na estrutura dos cloroplastos, pois o excesso de Mn causa uma deformação das lamelas granais, onde os tilacóides aparecem inchados e ocos (NAJEEB et al., 2009; LIANG et al., 2011; ZAMBROSI et al., 2016). Um outro fato que pode ter contribuído para baixa concentração de clorofila é que o Mn em excesso pode substituir Mg^{2+} na molécula clorofila ou se ligar a ferredoxina na matriz do tilacóide, destruindo assim a estrutura dos cloroplastos (PANDA.; MISHRA; BISWAL, 1989; HAUCK et al., 2003). Também pode ter ocorrido alterações no metabolismo do nitrogênio, pois em soja sob excesso de Mn foi verificado uma menor atividade das enzimas redutase do nitrato e urease (SANTOS et al., 2017) essa menor atividade das enzimas pode ter ocorrido porque o nitrogênio pode estar sendo utilizado para a síntese de compostos de defesa com a prolina, visando a manutenção da homeostase (ROSA-IBARA; MAITI, 1995).

O excesso de Mn também acarretou uma redução na assimilação de CO_2 nas plantas de soja. Esta redução já foi descrita em várias espécies como em *Cucumis sativus* (FENG; SHI; WANG, 2009), *Nicotiana tabacum* (HOUTZ; R O NABLE; CHENIAE, 1988; NABLE; HOUTZ; CHENIAE, 1988); *Oryza sativa* (LIDON; BARREIRO; RAMALHO, 2004), *Citrus grandis* (LI et al., 2010), *Saccharum officinarum* (ZAMBROSI et al., 2016) *Glycine max* (SANTOS et al., 2017).

O decréscimo da assimilação de CO_2 em função do excesso de Mn pode ser atribuído a vários fatores, tais como a redução da condutância estomática, que, segundo González e Lynch, (1977) é resultado dos danos foliares que o excesso Mn causa, redução dos teores de clorofila e acúmulo de Mn na superfície exterior dos tilacóides. Este acúmulo pode interferir no empilhamento o que resulta em uma inibição da fosforilação não cíclica promovendo a produção de EROs e também reduz o acúmulo de pigmentos como os carotenoides que são pigmentos responsáveis pela proteção do aparelho fotossintético, resultando assim em danos oxidativos (LIDON; TEIXEIRA, 2000). A deformação na estrutura dos cloroplastos pode levar a uma deficiência do seu funcionamento, que é caracterizado pela redução da taxa de transporte de elétrons (CHEN et al., 2008; YAMANE et al., 2008; ZHANG et al., 2010) e pela degradação do fotossistema I, como o encontrado em *Arabidopsis thaliana* (MILLALEO et al., 2013). Um outro fator que pode ter contribuído para a redução da fotossíntese é que trabalhos demonstram que elevadas concentrações de Mn reduz a atividade e a concentração da Rubisco, o que resultaria em uma menor eficiência do ciclo de Calvin (KITAO; LEI; KOIKE, 1997; LI et al., 2010).

As plantas sob excesso de Mn que foram pré-tratadas com sacarose apresentaram menor assimilação de CO₂ e maior concentração de carboidratos na parte aérea. Este pode indicar que o carregamento do floema e a exportação dos açúcares das folhas para as demais partes das plantas foram prejudicados, fato que pode ser confirmado pela menor concentração de carboidratos encontrada nas raízes (TEWARI; KUMAR; SHARMA, 2013)

A condição de aeração também influenciou o particionamento de carboidratos, pois plantas que estavam sob hipoxia e excesso de Mn apresentaram maior conteúdo de sacarose nas raízes do que as plantas que estavam somente sob excesso de Mn. Este aumento de sacarose já era esperado, pois, em condições de baixa disponibilidade de oxigênio ocorre uma demanda maior por sacarose nas raízes devido a respiração anaeróbica. Um outro fato que pode explicar a maior demanda de sacarose nas raízes é que em condições anaeróbicas ocorre ativação da enzima Susy visando a economia de energia. O aumento da atividade desta enzima está correlacionada com um aumento na concentração de celulose. A celulose formada nesta condição tem a função de dar suporte mecânico dentro das raízes para compensar a dissolução progressiva das células corticais durante a formação de aerênquima, sendo essencial para manter a estabilidade da membrana e impedir que as células entre em colapso (ALBRECHT; MUSTROPH, 2003). Entretanto, quando as plantas foram pré-tratadas esta demanda por sacarose foi menor, resultando em uma maior formação de amido, indicando que o pré-tratamento com sacarose pode ter ativado algum mecanismo que impediu que uma grande demanda por açúcares nas raízes sob condição de hipoxia ocorresse.

O excesso de Mn também promoveu um aumento na concentração de aminoácidos tanto na parte aérea como nas raízes. Esse aumento foi ainda mais expressivo em plantas pré-tratadas com sacarose e submetidas à hipoxia mais excesso de Mn. Segundo Hall (2002), um aumento na concentração de aminoácidos em plantas expostas a metais pesados é considerado um mecanismo de defesa, pois os aminoácidos podem ligar ao metal tornando-o inerte. Estes resultados estão de acordo com o encontrado Lei, Korpelainen e Li (2007), em plantas de *Populus cathayana* expostas a elevadas concentrações de Mn. Segundo estes autores o aumento no conteúdo de aminoácidos pode aumentar a tolerância de plantas ao excesso de Mn, uma vez que estes além de complexar o Mn, podem ter função osmorreguladora, e antioxidante como, por exemplo, a prolina. Também podem participar de vias de biossíntese de compostos fenólicos que também estão relacionados à resistência a estresse abióticos e bióticos (HALL, 2002; WU et al., 2004; YE et al., 2006).

O pré-tratamento com sacarose alterou o metabolismo de carboidratos, trocas gasosas e o sistema antioxidante, no entanto, não promoveu diferenças no espessamento do caule. O espessamento do caule é considerado um mecanismo de defesa de plantas que estão em uma condição de baixa disponibilidade de oxigênio. Segundo Pires, Soprano e Cassol (2002), esse aumento do diâmetro do caule é caracterizado pela formação de rachaduras na região submersa e formação de uma região esponjosa na base do caule com o aparecimento de um tecido branco. Nesse local há formação de aerênquimas secundários, que são estruturas que funcionam como uma via de transporte de oxigênio do caule para raízes (SHIMAMURA et al., 2010).

A toxicidade por Mn, está relacionada ao estresse oxidativo, danos ao aparato fotossintético e consequentemente redução da biomassa vegetal (ZAMBROSI et al., 2016, SANTOS, et al., 2017). Nesse sentido, a sacarose reduz a toxicidade por Mn em plantas de soja, pois o pré-tratamento com sacarose causou uma série de alterações bioquímicas nas plantas resultando em maior acúmulo de biomassa em relação as plantas não pré-tratadas. O melhor desempenho das plantas que foram submetidas a combinação de estresse e tratadas com sacarose resultou em um maior índice de tolerância dessas plantas. Isso pode ter sido efeito de duas possíveis vias. A primeira é o papel da sacarose na redução do estresse devido a sua função antioxidante e também pela sua função em ativar mecanismos de defesa nas plantas. A outra pode estar relacionada à combinação de estresses, pois muitos estudos demonstram que a exposição a múltiplas tensões pode ocasionar efeitos benéficos as plantas como por exemplo a combinação de seca e altas concentrações de CO₂ (BROUDER; VOLENEC, 2008), salinidade e altas temperaturas (RIVERO et al., 2014) e alta concentração de CO₂ e alta luminosidade (PÉREZ-LÓPEZ et al., 2013).

Tomados em conjunto, os resultados sugerem que o pré-tratamento com a sacarose levou uma melhor performance das plantas frente as condições em que elas estavam expostas. Sendo que as plantas que estavam submetidas a combinação de estresses se destacaram, uma vez que ocorreu menor absorção de Mn e maior atividade do sistema antioxidante, principalmente de antioxidantes vacuolares que contribuíram para neutralização de EROs formadas em decorrência do acúmulo de Mn, resultando em menor aparecimento de sintomas nessas plantas.

6 CONCLUSÃO

O pré-tratamento com sacarose promove a tolerância de plantas de soja ao excesso de Mn e ao alagamento através da redução do estresse oxidativo principalmente pela indução da biossíntese de antioxidantes não enzimáticos como ascorbato, frutanos, prolina e antocianinas. Sendo mais efetivo na promoção de tolerância de plantas submetidas ao excesso de Mn e a hipoxia. Assim, o pré-tratamento com sacarose pode ser uma ótima alternativa para indução de tolerância de soja ao excesso de Mn e a hipoxia.

REFERÊNCIAS

AFZAL, Z. et al. The Roles of Aquaporins in Plant Stress Responses. **Journal of Developmental Biology**, v. 4, n. 1, p. 9, Basel, 2016.

ALAM, S. et al. Mechanism of potassium alleviation of manganese phytotoxicity in barley. **Journal of Plant Nutrition**, v. 28, p. 889–901, Athens, 2005.

ALAM, S. et al. Alleviation of Manganese Phytotoxicity in Barley with Calcium. **Journal of Plant Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 59–74, Athens, 2006.

ALBRECHT, G.; MUSTROPH, A. Localization of sucrose synthase in wheat roots: increased in situ activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia. **Planta**, Bonn, v. 271, n. 2, p. 252–260, 2003.

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**, v. 197, n. 5, p. 258–271, Braunschweig, 2011.

ARAKAWA, N. et al. A Rapid and Sensitive Method for the Determination of Ascorbic Acid phenanthroline. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1289–1290, Tokyo, 1981.

AZEVEDO, R. A. et al. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Umea, 1998.

- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 405–415, Crawley, 1973.
- BAUD, D. R.; PEZESHKI, S. R. Adventitious rooting response in salix nigra and acer negundo cuttings to exogenous sucrose. **Environment, Ecology and Management**, v. 2, n. 1, p. 44–55, Southgate, 2013.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBREACHT, 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, , 1998.
- BOLOURI-MOGHADDAM, M. R. et al. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. **FEBS Journal**, Dublin, v. 277, n. 9, p. 2022–2037, 2010.
- BOVERIS, A. **Methods in Enzymology**: Oxygen radicals in biological systems. v. 105, p. 429–435, 1984.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 172, n. 248–254, 1976.
- BROUDER, S. M.; VOLENEC, J. J. Impact of climate change on crop nutrient and water use efficiencies. **Physiologia Plantarum**, v. 133, p. 705–724, Umea, 2008.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.52. p. 302-310, 1978.
- BURNELL, J. N. **Manganese in Soils and Plants** :The biochemistry of manganese in plants. v. 33, cap. 9, p. 125–137, 1988.
- CAKMAK, I.; STRBAC, D.; H MARSCHNER. Activities of hydrogen peroxide-scavenging

enzymes in germinated wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, p. 127–132, 1993.

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, 1999.

CAO, Y.-Y. et al. Exogenous sucrose increases chilling tolerance in cucumber seedlings by modulating antioxidant enzyme activity and regulating proline and soluble sugar contents. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 179, p. 67–77, nov. 2014.

CEUSTERS, N.; VAN DEN ENDE, W.; CEUSTERS, J. **Progress in Botany** :Exploration of Sweet Immunity to Enhance Abiotic Stress Tolerance in Plants: Lessons from CAM. v. 78p. 145–166, 2016.

CHEN, W. et al. Differential changes in photosynthetic capacity: 77 K chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure between Zn-efficient and Zn-inefficient rice genotypes (*Oryza sativa*) under low zinc stress. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 132, p. 89–101, 2008.

DE GARA, L. et al. Redox regulation and storage processes during maturation in kernels of *Triticum durum*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 381, p. 249–258, , 2003.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R.L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Carbohydrate Chemistry**, New York: Academic, 1962. p. 477-520.

DUCIC; POLLE. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes , v. 17, n. 1, p. 103–112, 2005.

DUNAND, C.; CRÈVECOEUR, M.; PENEL, C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. **New Phytologist**, Lancaster v. 174. n. 2, p. 332-341, 2006.

DURACK, P. J.; WIJFFELS, S. E.; MATEAR, R. J. Ocean salinities reveal strong global water cycle intensification during 1950 to 2000. **Science (New York, N.Y.)**, v. 336, n. 6080, p. 455–8, abr. 2012.

FAGERIA, N. K.; STONE, L. F. **Micronutrient Deficiencies in Global Crop Production: Micronutrient Deficiency Problems in South America**. B. J. Alloway (New York), p. 245–246, 2008.

FANG, W. C.; KAO, C. H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. **Plant Science**, Clare, v. 158, n. 1–2, p. 71–76, 2000.

FENG, J. P.; SHI, Q. H.; WANG, X. F. Effects of exogenous silicon on photosynthetic capacity and antioxidant enzyme activities in chloroplast of cucumber seedlings under excess manganese. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, n. 1, p. 40–50, 2009.

FERNANDO, D. R.; LYNCH, J. P. Manganese phytotoxicity : new light on an old problem. **Annals of botany**, Oxford, v. 116, p. 313–319, 2015.

FERREIRA, R. R.; FORNAZIER, R. F.; LEA, P. J. Changes in Antioxidant Enzyme Activities in Soybean Under Cadmium Stress. **Journal of Plant Nutrition**, Athens, v. 25, n. 2, p. 327–342, 2002.

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, 1978.

GAO, S. et al. Comparison of Redox Indicators in a Paddy Soil during Rice-Growing Season. **Soil Science Society of America Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 3, p. 805–817, 2002.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2 p. 309–314, 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, 2010.
- GONZÁLEZ, A.; LYNCH, J. Effects of manganese toxicity on leaf CO₂ assimilation of contrasting common bean genotypes. **Physiology Plantarum**, Medford, v. 11, p. 872-880, 1977.
- GOULD, K. S.; MCKELVIE, J.; MARKHAM, K. R. Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. **Plant, cell & environment**, v. 25, n. 10, p. 1261–1269, 2002.
- GOUSSIAS, C.; BOUSSAC, A.; RUTHERFORD, A. W. Photosystem II and photosynthetic oxidation of water: an overview. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, London, v. 357, p. 1369–1420., 2002.
- GRAHAM, R. D. **Developments in Plant and Soil Sciences**: Genotypic differences in tolerance to manganese deficiency., Dordrecht, , The Netherlands: Kluwer Academic Publishers v. 33, p. 261–276, 1988.
- GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Medford, v. 32, p. 481–494, 2005.
- HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 53, n. 366, p. 1–11, 2002.
- HANSON, J. et al. The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. **The Plant journal**, Medford, v. 53, n. 6, p. 935–949, 2008.
- HAUCK, M. et al. Manganese toxicity in epiphytic lichens: chlorophyll degradation and

interaction with iron and phosphorus. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 181–192, 2003.

HAUG, A.; CHARLES, E. Molecular aspects of aluminum toxicity. **Journal Critical Reviews in Plant Sciences**, Apopka, v. 1, p. 345–343, 1983.

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, jun. 1987.

HEENAN, D. P.; CARTER, O. G. Tolerance of Soybean Cultivars to Manganese Toxicity. **Crop Science**, Madison, v. 16, n. 3, p. 389–391, 1976.

HEIBER, I.; CAI, W.; BAIER, M. Linking Chloroplast Antioxidant Defense to Carbohydrate Availability : The Transcript Abundance of Stromal Ascorbate Peroxidase Is Sugar-Controlled via Ascorbate Biosynthesis. **Molecular Plant**, Maryland Heights, v. 7, n. 1, p. 58–70, 2014.

HELLMANN, H. et al. Hypersensitivity of an Arabidopsis sugar signaling mutant toward exogenous proline application. **Plant physiology**, Rockville, v. 123, n. 2, p. 779–789., 2000.

HOSSAIN, M. A. et al. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance : insights from ROS detoxification and scavenging. **Frontiers plant science**, Lausanne, v. 6, n. June, p. 1–19, 2015.

HOUTZ, L. R.; R O NABLE; CHENIAE, G. M. Evidence for Effects on the in Vivo Activity of Ribulose-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase during Development of Mn Toxicity in Tobacco. **Plant physiology**, Rockville, v. 86, n. 4, p. 1143–1149., 1988.

HUANG, Y. L. et al. Manganese toxicity in sugarcane plantlets grown on acidic soils of southern China. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 3, p. 1–18, 2016.

HUMPHRIES, J.; STANGOULIS, J.; GRAHAM, R. Manganese. In: A. Barker, D. Pilbeam (eds). **Handbook of Plant Nutrition**, Taylor and Francis, USA, p. 351-366, 2007.

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

JERMYN, M. A. A new method for determining ketohexoses in the presence of aldohexoses. **Nature**, London, v. 177, n. 4497, 1956.

JIANG, W. Z. Mn use efficiency in different wheat cultivars. **Environmental and Experimental Botany**, Barcelona, v. 57, p. 41–50, 2006.

KEUNEN, E. et al. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, Cell & Environment**, 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, 2010.

KITAO, M.; LEI, T. T.; KOIKE, T. Comparison of photosynthetic responses to manganese toxicity of deciduous broad-leaved trees in northern Japan. **Environmental pollution**, New York, v. 197, p. 113–118, 1997.

KOORNNEEF, M.; SMEEKENS, S. Sucrose-Specific Induction of Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis Requires the MYB75 / PAP1 Gene 1. **Plant physiology**, Glasgow, v. 139, n.4, p. 1840–1852, 2005.

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, fev. 2014.

KRANZ, H. D. et al. Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. **The Plant journal**, Medford, v. 16, n. 2, p. 263–276, 1988.

KREUZWIESER, J.; GESSLER, A. Global climate change and tree nutrition: influence of water availability. **Tree physiology**, Durham, v. 30, n. 9, p. 1221–34, set. 2010.

LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680–685, 1970.

LANQUAR, V. et al. Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency. **Plant physiology**, Rockville, v. 152, n. 4, p. 1986–99, abr. 2010.

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, 2008.

LEI, Y.; KORPELAINEN, H.; LI, C. Physiological and biochemical responses to high Mn concentrations in two contrasting *Populus cathayana* populations. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 68, n. 4, p. 686–94, jun. 2007.

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**, Georgia, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2010.

LI, X. et al. A distinct endosomal Ca²⁺/Mn²⁺ pump affects root growth through the secretory

process. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, n. 4, p. 1675–1689, ago. 2008.

LIANG, W. B. et al. Manganese stress on morphological structures of leaf and ultrastructures of chloroplast of a manganese hyperaccumulator, *Phytolacca americana*. **Acta Ecologica Sinica**, v. 31, n. 13, p. 3677–3683, 2011.

LICHTENTHALER, C.; BUSCHMANN, H. . 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. p. F4.3.1-F4.3.8.

LIDON, F. C.; HENRIQUES, F. S. Effects of excess copper on photosynthetic pigments in rice plants. **Bot Bull Acad Sinica**, London, v. 33, p. 141–149, 1992.

LIDON, F. C.; TEIXEIRA, M. G. Oxy radicals production and control in the chloroplast of Mn-treated rice. **Plant Science**, Clare, v. 152, n. 1, p. 7–15, 2000.

LIDON, F. CELOLA; BARREIRO, MARIA GRAÇAS; RAMALHO, JOSÉ COCHICHO. Manganese accumulation in rice : implications for photosynthetic functioning. **Plant physiology**, Rockville, v. 161, p. 1235–1244, 2004.

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, maio 2010.

LORETI, E. et al. A Genome-Wide Analysis of the Effects of Sucrose on Gene Expression in *Arabidopsis* Seedlings under Anoxia. **Plant physiology**, Rockville, v. 137, n.3, p. 1130–1138, 2005.

LYNCH., J. M.; HARPER, S. H. T. Role of substrates and anoxia in the accumulation of soil ethylen. **Soil Biology and Biochemistry**, Leicestershire, v. 12, n. 4, p. 363–367, 1980.

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

MARSCHNER, H. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 134, n. 1, p. 1–20, 1991.

MARTÍNEZ-NOËL, G. M. A et al. Protein phosphatase activity and sucrose-mediated induction of fructan synthesis in wheat. **Planta**, Bonn, v. 230, n. 5, p. 1071–9, out. 2009.

MASCARENHAS, H. A. A. et al. Deficiência e toxicidade visuais de nutrientes em soja. **Nucleus**, Ituverava, v. 10, n. 2, p. 281–306, 2013.

MENG, X. et al. Photosynthesis Regulation by Glucohexaose Through Redox Changes in *Cucumis sativus*. **Journal of Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 33, n.3, p. 571–578, dez. 2013.

MEYER, Y. et al. Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. **Antioxid Redox Signal**, Columbus, v. 17, n. 8, p. 1124–1126, 2012.

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

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.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 31, p. 426–428, 1959.

MITA, S. et al. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. **Plant Journal**, Medford, v. 11, n. 4, p. 841–851, 1997.

MITTLER, R. Abiotic stress , the field environment and stress combination. **Trends in plant science**, Clare, v. 11, n. 1, p. 15–19, 2006.

MORA, M. DE LA 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, p. 79–89, 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. 776–86, maio 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, 1991.

NABLE, R. O.; HOUTZ, R. L.; CHENIAE, G. M. Early inhibition of photosynthesis during development of Mn toxicity in tobacco. **Plant physiology**, Rockville, v. 86, n. 4, p. 1136–1142, 1988.

NAGATA, T. et al. Levels of active oxygen species are controlled by ascorbic acid and anthocyanin in *Arabidopsis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 10, p. 2992–2999, 2003.

NAJEEB, U. et al. Citric acid enhances the phytoextraction of manganese and plant growth by alleviating the ultrastructural damages in *Juncus effusus* L. **Journal of Hazardous Materials**, New York, v. 170, n. 2–3, p. 1156–6113, 2009.

NAKANO, K.; ASADA, Y. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 55, p. 867–880, 1981.

NISHIKAWA, N. et al. Effect of sucrose on ascorbate level and expression of genes involved in the ascorbate biosynthesis and recycling pathway in harvested broccoli florets. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 65–72, 2005.

NOCTOR, G.; MHAMDI A; FOYER, C. H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. **Plant physiology**, Rockville, v. 164, n. 4, p. 1636–1648, 2014.

OHKI, K. Manganese Deficiency and Toxicity Levels for “Bragg” Soybeans. **Agronomy Journal**, Madison, v. 68, n. 6, p. 861–864, 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, 2010.

OLIVER, M. A.; GREGORY, P. J. Soil , food security and human health : a review. **European Journal of soil science**, Medford, v. 66, n. 2, p. 257–276, 2015.

ORACZ, K. et al. Myriganone A inhibits *Lepidium sativum* seed germination by interference with gibberellin metabolism and apoplastic superoxide production required for embryo extension growth and endosperm rupture. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 53, n. 81–95, 2012.

PANDA., SU.; MISHRA, A. K.; BISWAL, U. C. Manganese induced peroxidation of thylakoid lipids and changes in chlorophyll-a fluorescence during aging of cell free chloroplasts in light. **Phytochemistry**, Oxford, v. 26, n. 12, p. 3217–3219, 1989.

PARADISO, A. et al. Functional, antioxidant and rheological properties of meal from immature durum wheat. **Journal of Cereal Science**, Huddersfield, v. 43, n. 2, p. 216–222, 2006.

PARASHAR, A. et al. Salicylic acid enhances antioxidant system in *Brassica juncea* grown under different levels of manganese. **International journal of biological macromolecules**, v. 70, p. 551–8, set. 2014.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; C DUNAND. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in plant science**, Clare, v. 9, p. 534–540, 2004.

PÉREZ-LÓPEZ, U. et al. Lettuce production and antioxidant capacity are differentially modified by salt stress and light intensity under ambient and elevated CO₂. **Journal of plant physiology**, Oxford, v. 170, n. 17, p. 1517–1525, 2013.

PESHEV, D. et al. Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 1025–1038, 2013.

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, 2002.

PITTMAN, J. K. Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. **The New phytologist**, Lancaster, v. 167, n. 3, p. 733–742, set. 2005.

QIU, Z. B. et al. Exogenous sucrose can enhance tolerance of *Arabidopsis thaliana* seedlings to salt stress. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 58, n. 4, p. 611–617, 2014.

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

RIVERO, R. M. et al. The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. **Plant, Cell and Environment**, Malden, v. 37, p. 1059–1073, 2014.

RIZHSKY, L. et al. The Zinc Finger Protein Zat12 Is Required for Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 Expression during Oxidative Stress in Arabidopsis. **The Journal of biological Chemistry**, Rockville, v. 279, n. 12, p. 11736–11743, 2004.

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.

ROSA-IBARA, M. D. L.; MAITI, R. K. Biochemical mechanism in Glossy sorgumlines for resistance to salinity stress. **Plant physiology**, Rockville, v. 146, p. 515–519, 1995.

ROSENWASSER, S. et al. Organelles contribute differentially to reactive oxygen species-related events during extended darkness. **Plant physiology**, Rockville, v. 156, n. 1, p. 185–201, maio 2011.

SANTOS, E. F. et al. Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in soybean plants : Mn toxicity responses. **Plant Physiology et Biochemistry**, Bari, v. 113, p. 6–19, 2017.

SHABALA, S. Physiological and cellular aspects of phytotoxicity tolerance in plants: the role of membrane transporters and implications for crop breeding for waterlogging tolerance. **The New phytologist**, Lancaster, v. 190, n. 2, p. 289–98, abr. 2011.

SHARMA, S. S.; DIETZ, K.-J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. **Trends in plant science**, Clare, v. 14, n. 1, p. 43–50, jan. 2009.

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, jul. 2005.

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, dez. 2006.

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

SHIN, D. H. et al. Calcium dependent sucrose uptake links sugar signaling to anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Martinsried, v. 430, n. 2, p. 634–639, 2013.

SOLFANELLI, C. et al. Sucrose-Specific Induction of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in Arabidopsis [W]. v. 140, n. February, p. 637–646, 2006.

SOUZA, K. R. D. **Aplicação exógena de peróxido de hidrogênio e sacarose e tolerância de genótipos de soja ao excesso de Mn**. 2014. p.75, Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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**, New York, v. 64, n. 1, p. 1–16, set. 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, out. 2012.

SULMON, C. et al. Sugar-induced tolerance to atrazine in Arabidopsis seedlings : interacting effects of atrazine and soluble sugars on psbA mRNA and D1 protein levels. **Plant Science**, Clare, v. 167, p. 913–923, 2004.

SULMON, C. et al. Sucrose amendment enhances phytoaccumulation of the herbicide atrazine in

Arabidopsis thaliana. **Environmental pollution**, New York, v. 145, n. 2, p. 507–15, jan. 2007.

SZÉKELY, G. et al. Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. **Plant Journal**, Medford v. 53, n. 1, p. 11–28, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5Ed. Artemed, Porto Alegre, 2013.

TAKAHAMA, U. Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. **Phytochemistry Reviews**, New York, v. 3, n. 1–2, p. 207–219, 2004.

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, set. 2013.

TOGNETTI, J. A.; SALERNO, G. L.; PONTIS, H. G. New insights on protein phosphatases in sucrose-fed wheat leaves. n. March, p. 311–313, 2010.

TOURNAIRE-ROUX, C. et al. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. **Nature**, London, v. 425, n. 2002, p. 393–397, 2003.

UEMURA, M.; STEPONKUS, P. L. Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant Cell & Environment**, Malden, v. 26, n.7 p. 1083–1096, 2003.

VAN DEN ENDE, W.; EL-ESAWI, S. K. 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, dez. 2014.

VAN DEN ENDE, W.; VALLURU, R. Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress:

scavenging and salvaging? **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 9–18, 2009.

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, p. 59–66, 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. 647–53, out. 2013.

WILKINS, D. A. A Technique for the measurement of lead tolerance in plants. **Nature communications**, London, v. 180, n. 4575, p. 37–38, 1957.

WILKINSON, R. E.; OHKI, K. Influence of Manganese Deficiency and Toxicity on Isoprenoid Syntheses. **Plant physiology**, Rockville, v. 87, n. 4, p. 841–846, 1988.

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.

WU, F. et al. Effect of cadmium on free amino acid, glutathione and ascorbic acid concentrations in two barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) differing in cadmium tolerance. **Chemosphere**, Amesterdan. v. 57, n. 6, p. 447–454., 2004.

YAMANE, K. et al. Correlation between chloroplast ultrastructure and chlorophyll fluorescence characteristics in the leaves of rice (*Oryza sativa* L.) grown under salinity. **Plant Production Science**, Nagoya, v. 11, p. 139–145, 2008.

YE, S. F. et al. Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots, and promotes incidence of Fusarium wilt. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 3, p. 255–262, 2006.

YEMM, E. W. .; COCKING, E. F. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**, Strathclyde, v. 80, p. 209–213, 1955.

ZAMBROSI, F. C. B. et al. Anatomical and physiological bases of sugarcane tolerance to manganese toxicity. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 132, p. 100–112, 2016.

ZANANDREA, I. et al. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. **Australian Journal of Botany**, Clayton South, v. 57, n. 8, p. 661–669, 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, 2013.

ZHANG, R. et al. Moderate heat stress of *Arabidopsis thaliana* leaves causes chloroplast swelling and plastoglobule formation. **Photosynthesis research**, Dordrecht, v. 105, p. 123–134, 2010.