

Ação do Óxido Nítrico sobre a Atividade de Enzimas Antioxidantes em Plantas de Soja Submetidas ao Lactofen

Leonardo Cesar Ferreira¹; Lígia Maria Ramazzini Remaeh¹; Yara Andréo de Souza¹; Jennifer Búfalo¹; Natália Corniani²; Joseane Scavroni¹; Bruno José Aparecido Soares¹; Inês Cechin³; Terezinha de Fátima Fumis³; Ana Catarina Cataneo¹

¹Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências, s/n – Distrito de Rubião Júnior, 18618-000, Botucatu/SP; ²Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agronômicas – Fazenda Experimental Lageado, s/n, 18603-970, Botucatu/SP; ³Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências – Av. Eng^o Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01, Vargem Limpa, 17033-360, Bauru/SP.

RESUMO - O lactofen é um herbicida utilizado na cultura da soja para o controle de plantas daninhas de folhas largas que, apresentando ação na inibição da protoporfirinogênio oxidase (Protox), acarreta diminuição da atividade das enzimas da rota de síntese de clorofilas e citocromos, bem como o surgimento de gotas lipídicas nos cloroplastos provenientes da peroxidação de lipídios das membranas. Devido a estas alterações, pode ocorrer uma excessiva produção de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO), além de diminuição dos teores de pigmentos fotossintéticos. Como consequência, podem ocorrer manchas, enrugamento e queima das folhas, o que leva à paralisação temporária do crescimento da cultura. Em contrapartida, o óxido nítrico (NO) é uma molécula capaz de eliminar diretamente as ERMO e assim finalizar reações propagadas em cadeia, atuando como um antioxidante. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o pré-tratamento de plantas de soja com solução de nitroprussiato de sódio (SNP), substância doadora de NO, promove proteção contra o estresse oxidativo gerado pelo lactofen. Assim, plantas de soja no estágio fenológico V3, após pré-tratamento com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) por dois dias consecutivos, foram pulverizadas com lactofen na dose recomendada para esta cultura, equivalente a 0,7 L.ha⁻¹. Em seguida, folíolos foram coletados às 24, 48, 72, 96 e 120 h após a aplicação de lactofen (HAAL) para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes glutatona S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD). O NO apresentou capacidade de eliminação das ERMO geradas pela ação do herbicida lactofen, o que acarretou tanto diminuição de substrato

disponível para as enzimas antioxidantes SOD, CAT e POD, essenciais na proteção das plantas em situações indutoras de estresse oxidativo, como ausência de indução da GST pelo H₂O₂.

PALAVRAS-CHAVE: *Glycine max* L. Merrill, estresse oxidativo, espécies reativas do metabolismo do oxigênio.

ABSTRACT – Nitric oxide action on antioxidant enzyme activity in soybean plants submitted to lactofen. Lactofen is an herbicide applied in soybean fields to control broadleaf weeds due to inhibition of protoporphyrinogen oxidase (Protox) action, which leads to a decrease in chlorophyll and cytochrome biosynthetic pathway enzyme activity, besides the appearance of lipid drops in chloroplasts from membrane lipid peroxidation. These alterations can cause an excessive production of reactive oxygen species (ROS) and decrease of photosynthetic pigment levels. Consequently, spots, wrinkles and leaf burn can occur, which results in transitory cessation of crop growth. However, nitric oxide (NO) is a molecule able to scavenge ROS directly and to end chain reactions, thus acting as an antioxidant. So, the present research aimed to evaluate if the pre-treatment of soybean plants with sodium nitroprusside (SNP) solution, a NO donor substance, promotes protection against oxidative stress generated by lactofen. Thus, soybean plants at V3 phenologic stage were pre-treated with different SNP levels (0, 50, 100 and 200 μmol.L⁻¹) for two consecutive days and on third day they were sprayed with lactofen at recommended rate for this crop, equivalent to 0.7 L.ha⁻¹. Afterwards, leaflets were harvested at 24, 48, 72, 96 e 120 h after application of lactofen (HAAL) in order to quantify the activity assay of glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) antioxidant enzymes. NO was able to scavenge ERMO generated by lactofen herbicide action, which lead to a decrease in the available substrate for antioxidant enzymes SOD, CAT and POD, which are essential in protecting plants under oxidative stress situations, as well as the absence of GST induction by H₂O₂.

KEY-WORDS: *Glycine max* L. Merrill, oxidative stress, reactive oxygen species.

INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de estresses abióticos incluindo seca, salinidade, radiação ultravioleta, poluentes atmosféricos e metais pesados causam danos moleculares às plantas, direta ou indiretamente pela formação de espécies reativas do metabolismo do oxigênio – ERMO (Laspina et al., 2005).

O estresse oxidativo em sistemas biológicos, incluindo os vegetais, é resultante de uma superprodução das ERMO, tais como radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto (1O_2). Estas ERMO são capazes de alterar quimicamente as principais classes de biomoléculas, causando mudanças estruturais e funcionais em lipídios, proteínas, clorofilas e ácidos nucléicos (Scandalios, 1993; Smirnov, 1993; Thérond et al., 2000). Dentre estas alterações podem-se destacar quebra das clorofilas, fragmentação do DNA, extravasamento iônico, peroxidação de lipídios e, finalmente, morte celular (Dodge, 1994).

Alguns herbicidas também produzem estresse oxidativo. Desta forma, o lactofen [1'-(carboetoxi)etil 5-(2-cloro-4-(trifluoro-metil)fenoxi)-2-nitrobenzoato], herbicida do grupo químico dos difenil-éteres, atua na inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (Protox) (Vidal, 1997; Rodrigues & Almeida, 1998). Como consequência, ocorre quebra de ligações eletrolíticas, diminuição da produção de ascorbato e glutathiona, bem como da atividade das enzimas da rota de síntese de clorofila (Merotto Junior & Vidal, 2001). Paralelamente a esses processos, ocorre o surgimento de gotas lipídicas nos cloroplastos provenientes da peroxidação de lipídios das membranas (Devine et al., 1993). Devido a estas alterações moleculares, a evolução dos efeitos tem como consequência uma excessiva produção de ERMO, além de diminuição dos teores de clorofila e carotenóides (Merotto Junior & Vidal, 2001).

As plantas, porém, apresentam um sistema de defesa antioxidante, responsável pela eliminação das ERMO, que confere proteção contra o estresse oxidativo. Tal sistema é composto por enzimas como por exemplo peroxidases (POD), glutathiona S-transferases (GST), glutathiona redutase (GR), superóxido dismutases (SOD) e catalase (CAT), além de compostos não-enzimáticos, como glutathiona (GSH), carotenóides, ascorbato, α -tocoferol e flavonóides, entre outros (Foyer et al., 1994; Laspina et al., 2005).

As glutationa S-transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) são consideradas como enzimas de desintoxicação, por metabolizarem uma ampla variedade de compostos exógenos tóxicos, denominados “xenobióticos”. Assim, a GST promove a conjugação de tais compostos ao tripeptídeo glutationa (GSH, γ -glutamil-cisteinil-glicina), produzindo conjugados solúveis em água destes compostos, com toxicidade reduzida (Jepson et al., 1994; Marrs, 1996).

As superóxido dismutases (SODs, EC 1.15.1.1) são enzimas que catalisam a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2) (Chi Yu et al., 2005). São ubíquas nos organismos aeróbicos e divididas em três classes, as Cu/Zn-SODs, encontradas no citosol e nos cloroplastos, as Fe-SODs, nos cloroplastos, e as Mn-SODs, na matriz mitocondrial (Tsang et al., 1991).

A catalase (CAT, EC 1.11.1.6) é considerada juntamente com as SODs como as mais eficientes enzimas antioxidantes. Ambas as enzimas apresentam uma função combinada, de modo que a CAT converte o H_2O_2 , originado em função da atividade da SOD, em H_2O e O_2 (Scandalios, 1993).

As peroxidases (POD, EC 1.11.1.7) possuem uma variedade de isoformas, que usam diferentes redutores e estão localizadas em diferentes compartimentos celulares (Campa, 1991). Estas enzimas, além de desempenharem importante papel na biossíntese da parede celular, catalisam a reação entre um agente redutor e o H_2O_2 , para produzir um composto oxidado e água (IUBMB, 2007).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula altamente reativa e o fato de ser um radical livre permite-lhe eliminar outros intermediários reativos e assim finalizar reações propagadas em cadeia (Kopyra & Gwózdź, 2003). Seu efeito protetor em combater o estresse oxidativo pode se dar ou por atuar como um antioxidante, eliminando diretamente as ERMO (Radi et al., 1991; Laspina et al., 2005), ou por atuar como uma molécula sinalizadora, numa cascata de eventos, levando a mudanças de expressão gênica (Lamattina et al., 2003; Laspina et al., 2005). Enquanto que alguns autores consideram o NO como um agente indutor de estresse (Leshem, 1996), outros mencionam seu papel protetor contra o estresse oxidativo (Beligni & Lamattina, 1999a, b; Hsu & Kao, 2004), dependendo de sua concentração, tecido vegetal, idade da planta e tipo de estresse.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do NO sobre a atividade das enzimas antioxidantes GST, SOD, CAT e POD, em plantas de soja tratadas com lactofen.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

O experimento foi conduzido entre janeiro e fevereiro de 2005 em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas, situado na Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Bauru-SP, até a realização das coletas das plantas de soja. Posteriormente, as avaliações bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Xenobióticos, pertencente ao Departamento de Química e Bioquímica, no Instituto de Biociências da UNESP, Câmpus de Botucatu-SP.

Material vegetal

No presente experimento foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill) cv. Pintado. Doze sementes foram colocadas para germinar em vasos de 8 L de capacidade preenchidos com substrato da marca Rendimax Floreiras[®], de seguinte composição: a) em porcentagem na matéria seca: 1,08 de N; 0,40 de P₂O₅; 0,21 de K₂O; 14,00 de umidade; 58,00 de matéria orgânica; 32,23 de C; 0,59 de Ca; 1,04 de Mg; 0,25 de S; b) em mg.kg⁻¹ de matéria seca: 240 de Na; 54 de Cu; 8150 de Fe; 88 de Mn e 112 de Zn. A relação C/N correspondeu a 29/1, enquanto que o pH (CaCl₂) foi de 4,94. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação a temperatura entre 31 - 35°C e com umidade relativa igual a 52,8%.

Delineamento experimental

Os vasos foram distribuídos inteiramente ao acaso, em esquema fatorial quatro x cinco, isto é, quatro doses de nitroprussiato de sódio (SNP) x cinco épocas de coleta, com quatro repetições, num total de 80 vasos. As doses de SNP, utilizado como doador de

NO, foram equivalentes a 0, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. As épocas de coleta corresponderam às 24, 48, 72, 96 e 120 h após a aplicação de lactofen (HAAL).

Aplicações das doses de SNP e lactofen

Os tratamentos das plantas de soja foram realizados quando estas encontravam-se no estágio fenológico V3. As plantas foram pulverizadas com as doses de SNP acima mencionadas por dois dias consecutivos, a um intervalo de 24 h. Aquelas não tratadas com SNP ($0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) receberam aplicação de água destilada. No terceiro dia, após 24 h da última aplicação de SNP, todas as plantas receberam a aplicação de lactofen na dose recomendada para a cultura de soja, equivalente a $0,7 \text{ L.ha}^{-1}$. Para tais procedimentos, utilizou-se um pulverizador manual com capacidade de 250 mL, cuja vazão correspondeu a $6,3 \text{ mL.s}^{-1}$.

Coletas

Padronizou-se como amostragem os folíolos laterais adultos das folhas trifolioladas. Cada amostra coletada correspondeu a duas lâminas foliares, de cujo par se registrou a matéria fresca. Em seguida, as amostras foram embaladas em sacos plásticos e em papel alumínio, sendo posteriormente congeladas em gelo seco e armazenadas em *freezer* a -80°C para as posteriores avaliações bioquímicas.

Obtenção dos extratos enzimáticos

Os extratos enzimáticos foram obtidos conforme o método descrito por Ekler et al. (1993). As amostras foram homogeneizadas com a utilização de almofariz gelado, em 5 mL de tampão gelado TRIS-HCl $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,8 contendo 1 mmol.L^{-1} de EDTA e 7,5% (peso.volume⁻¹) de polivinilpirrolidona e uma pequena quantidade de areia previamente lavada e esterilizada. O homogeneizado foi centrifugado a $14.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C . O sobrenadante obtido de cada amostra foi coletado e armazenado em *freezer* a -20°C para posterior determinação da atividade das enzimas GST, SOD, CAT e POD, bem como dos teores de proteínas solúveis.

Determinações enzimáticas

A atividade da GST foi determinada de acordo com o método descrito por Wu et al. (1996). O sistema de reação foi composto de 30 μL de extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 100 mmol.L^{-1} pH 6,9, glutationa reduzida (GSH) 3,3 mmol.L^{-1} e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 30 mmol.L^{-1} , num volume final de 3,03 mL. A reação foi conduzida a 25°C durante 30 minutos. A utilização de CDBN simula a presença de compostos sintéticos, como herbicidas (Figura 1). A absorbância do conjugado GSH-CDNB foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 340 nm. Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do conjugado, igual a 10 $\text{mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Mannervik & Guthenberg, 1981). A atividade da enzima foi expressa em $\text{nmol de GSH-CDNB.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína.

Para a determinação da atividade da CAT, o sistema de reação, mantido a 20°C por 60 segundos, foi composto de 50 μL de extrato enzimático, tampão fosfato de sódio 0,05 mol.L^{-1} pH 7,0 contendo 1 mmol.L^{-1} de EDTA e H_2O_2 20 mmol.L^{-1} , num volume final de 1 mL. Após leituras de absorbância a 240 nm, utilizou-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 (39,4 $\text{mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). A atividade da enzima foi expressa em $\text{nmol de H}_2\text{O}_2 \text{ consumido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína (Bor et al., 2003).

Para a determinação da atividade da SOD, seguiu-se o método de Bor et al. (2003). O sistema de reação foi composto de 30 μL de extrato enzimático, tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 7,8, mistura “nitroblue tetrazolium” (NBT) 33 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ + EDTA 0,66 mmol.L^{-1} (5:4) e mistura L-metionina 10 mmol.L^{-1} + riboflavina 3,3 mol.L^{-1} (1:1), totalizando um volume de 3,0 mL. Após iluminação dos tubos por dez minutos a 25°C, a redução do NBT a “blue formazan” foi medida por leituras de absorbância em espectrofotômetro UV-visível a 560 nm. A atividade da SOD foi expressa em U.mg^{-1} de proteína. Neste caso, uma unidade (U) representa a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a razão de redução do NBT.

A atividade da POD foi determinada de acordo com as condições citadas no trabalho de Teisseire & Guy (2000). O sistema de reação foi composto de 30 μL de extrato enzimático diluído (1:10 em tampão de extração), tampão fosfato de potássio 50 mmol.L^{-1} pH 6,5, pirogalol (1,2,3-benzenotriol) 20 mmol.L^{-1} e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 5 mmol.L^{-1} , totalizando um volume de 1,0 mL. A reação foi conduzida a temperatura ambiente por 5 minutos. A formação de purpurogalina foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 430 nm e seu coeficiente de extinção molar

(2,5 mmol.L⁻¹.cm⁻¹) foi usado para calcular a atividade específica da enzima, expressa em μmol de purpurogalina.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

Quantificação dos teores de proteínas solúveis

Os teores de proteínas solúveis dos extratos enzimáticos, necessários para o cálculo da atividade específica das enzimas estudadas, foram quantificados pelo método de Bradford (1976). Leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível a 595 nm, utilizando-se caseína como proteína de referência.

Análise estatística dos resultados

Todos os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, pelo teste F, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa computacional SAS. Em seguida, modelos de regressão polinomial foram construídos, quando verificada interação significativa entre doses de SNP ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) + lactofen (0,7 L.ha⁻¹) x HAAL. Nas épocas de coleta onde tal interação não foi observada, somente os pontos foram plotados nos gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversas condições de estresse, tais como a utilização de herbicidas, podem promover nas plantas elevada produção de ERMO, acarretando em estresse oxidativo (Scandalios, 1993; Smirnoff, 1993; Thérond et al., 2000; Couée et al., 2006). Como consequência, as ERMO podem causar peroxidação de lipídios, modificações protéicas, rompimento das cadeias de DNA, destruição de clorofilas e extravasamento iônico, entre outras alterações, de modo que tais eventos podem culminar com a morte celular (Halliwell & Gutteridge, 1984; Baker & Orlandi, 1995; Giardi et al., 1997; Beligni & Lamattina, 1999b).

Porém, as plantas possuem enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e POD (Elstner, 1982; Winston, 1990; Smirnoff, 1993; Sies, 1997; Radetski et al., 2000). Além destas, as GSTs catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos sintéticos com o tripeptídeo glutathiona (γ -glutamil-cisteinil-glicina, GSH) e os produtos S-glutationilados polares formados são então ativamente removidos do citosol por transportadores ligados ao ATP, sendo exportados das células, no caso dos animais, ou importados para os

vacúolos das plantas, antes de serem posteriormente metabolizados (Sanchez-Fernandez et al., 2001).

Por pertencerem ao sistema de defesa de proteção das plantas, as GSTs atuam na metabolização dos xenobióticos, como lactofen em soja (Remaeh, 2004), oxyfluorfen em células de soja (Knörzer et al., 1996) e plantas de trigo (Cataneo et al., 2002), glyphosate (Cataneo et al., 2003) e atrazine (Nemat Alla & Hassan, 2006) em plantas de milho.

No presente trabalho, observou-se interação significativa entre doses de SNP + lactofen x HAAL em relação à atividade da GST e das enzimas antioxidantes SOD, CAT e POD (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de variância referente às atividades da GST, SOD, CAT e POD em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP, seguido de lactofen (X), em cinco épocas de coleta (Y).

variáveis	interação	F	Pr > F	CV%
GST	X*Y	17,59	<0,0001*	12,59
SOD	X*Y	35,92	<0,0001*	11,34
CAT	X*Y	10,57	<0,0001*	23,27
POD	X*Y	87,21	<0,0001*	10,89

*Significativo a 5% de probabilidade.

A atividade da GST foi maior nas plantas de soja tratadas somente com o lactofen, em comparação com as que receberam pré-tratamento com SNP, exceto na primeira avaliação realizada, às 24 HAAL (Figura 1). As plantas pré-tratadas com 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP apresentaram aumento linear de atividade da enzima ao longo do tempo, enquanto que naquelas pré-tratadas com a maior dose (200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) houve um decréscimo dessa atividade após 24 HAAL.

Para nosso conhecimento, não existem relatos da ação de NO sobre a atividade de GST em plantas submetidas ao tratamento com herbicidas. Porém, estudos demonstram que o NO promove a expressão gênica da GST em plantas de soja (Delledone et al., 1998) e tabaco (Durner et al., 1998) expostas à presença de patógenos. A GST também pode sofrer um aumento de sua expressão gênica na presença de H_2O_2 , fato observado por Desikan et al. (1998) em células de *Arabidopsis*, e por Levine et al. (1994) em plantas de soja.

Assim, no presente estudo, o fato de as plantas pré-tratadas com SNP terem apresentado menor atividade da GST, principalmente naquelas que receberam a maior dose (200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), pode ter sido decorrente da ação antioxidante do NO na eliminação do H_2O_2 gerado em consequência da ação do lactofen.

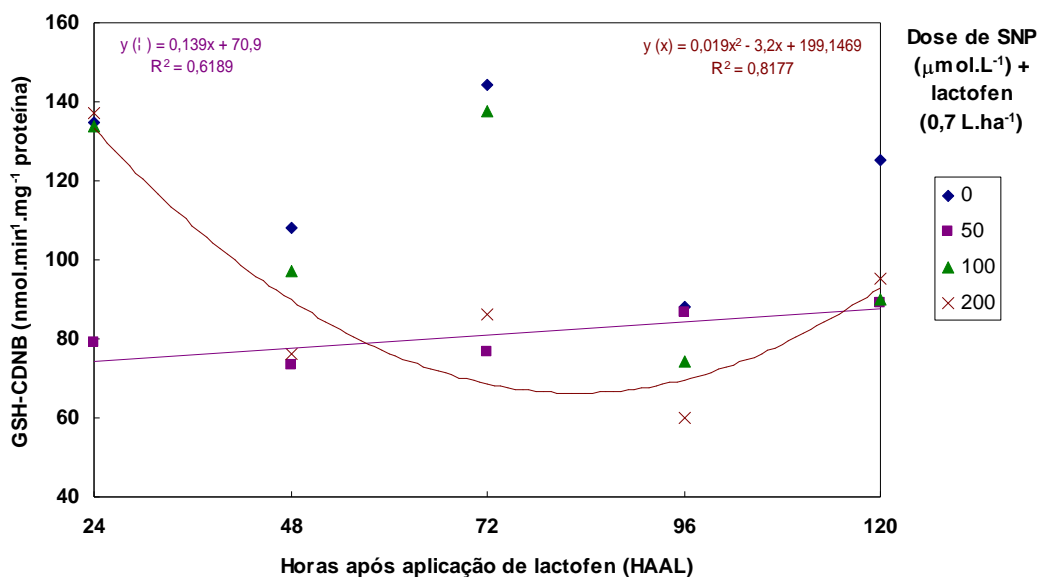


Figura 1. Atividade da GST (nmol de GSH-CDNB.min⁻¹.mg⁻¹ proteína) em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), seguido de lactofen (0,7 L.ha⁻¹), às 24, 48, 72, 96 e 120 HAAL. Na ausência de SNP e no pré-tratamento com 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, não houve interação significativa entre doses de SNP + lactofen x DAAL, a 5% de probabilidade – sem ajuste. Médias de quatro repetições. HAAL: horas após aplicação de lactofen.

A SOD é uma enzima participante da eliminação de radicais $\text{O}_2^{\cdot*}$ formados em plantas expostas a agentes oxidantes (Bowler et al., 1992; Scandalios, 1993). Trabalhos relatam aumentos de atividade da SOD em plantas promovendo proteção e tolerância à herbicidas. Como exemplos, Iannelli et al. (1999) constataram que um aumento de atividade da SOD promoveu resistência de plantas de milho ao paraquat, enquanto que Nemat Alla & Hassan (2006) observaram aumentos de atividade da SOD em plantas de milho híbrido 351 pulverizadas com atrazine. Remaeh (2004) também verificou aumento de atividade da SOD em plantas de soja tratadas com lactofen.

No presente estudo, pode ser verificado que na ausência do pré-tratamento das plantas com SNP, maior atividade da SOD foi detectada nas avaliações iniciais com estabilização a partir das 72 HAAL (Figura 2). Foi detectado que nas primeiras avaliações ocorreu maior atividade da SOD em decorrência do aumento da dose de SNP. Porém, este comportamento inverteu-se no transcorrer do tempo, onde na última avaliação realizada (120 HAAL) a atividade da SOD diminuiu em função do aumento da dose de SNP.

Estudos mostram que, na presença de NO ou de substâncias doadoras, uma baixa atividade da SOD, acompanhada de redução dos teores de lipoperóxidos e impedimento da degradação de pigmentos fotossintéticos, indicam proteção das plantas contra o estresse oxidativo gerado em diferentes situações, como é o caso da presença de cádmio em plantas de girassol (Laspina et al., 2005). De maneira similar, Hung & Kao (2003) observaram que o ácido abscísico (ABA) promoveu estresse oxidativo e senescência em folhas de arroz, caracterizados pelo aumento dos teores de H_2O_2 e de lipoperóxidos e pelo aumento de atividade da SOD. Porém, quando as folhas foram expostas à presença de ABA e de N-tert-butil-a-fenilnitrona (PBN), substância doadora de NO, houve uma redução na atividade da SOD, dos teores de lipoperóxidos e de H_2O_2 . É válido registrar o trabalho de Caro & Puntarulo (1998), que observaram redução na produção de radicais O_2^* em eixos embrionários de soja na presença de NO.

Baseado na literatura, é evidente que a diminuição da atividade da SOD detectada no presente trabalho é devida à menor disponibilidade de substrato (O_2^*) como efeito da ação do NO, amenizando-se o estresse oxidativo gerado pelo lactofen.

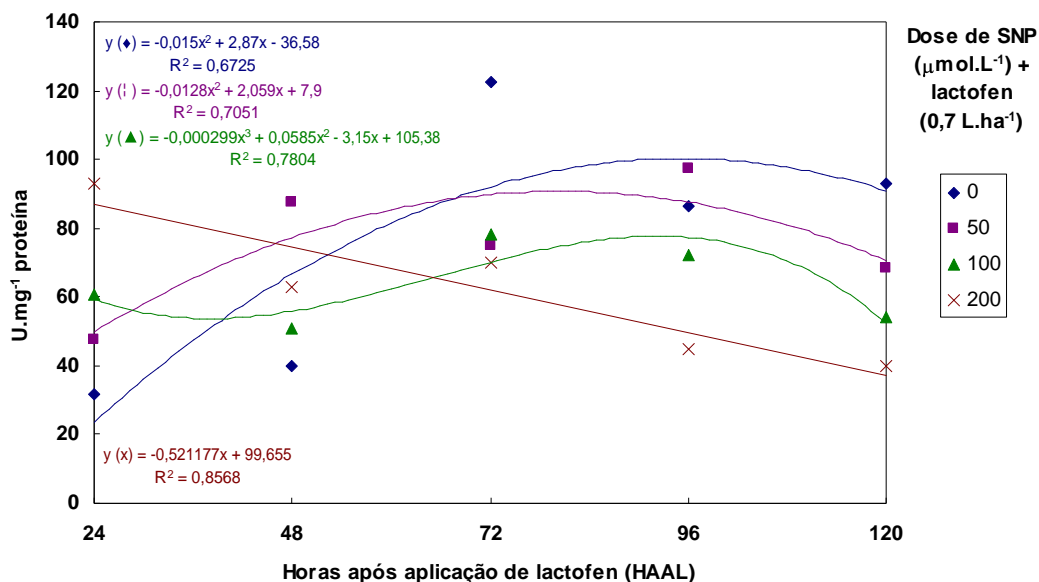


Figura 2. Atividade da SOD (U.mg^{-1} proteína) em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP ($0, 50, 100$ e $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$), seguido de lactofen ($0,7 \text{ L.ha}^{-1}$), às 24, 48, 72, 96 e 120 HAAL. Médias de quatro repetições. HAAL: horas após aplicação de lactofen.

A CAT também atua como antioxidante, por converter o H_2O_2 em H_2O e O_2 (Scandalios, 1993). No presente trabalho, foi observado que às 24, 72 e 96 HAAL, as plantas pré-tratadas com SNP apresentaram menor atividade da CAT (Figura 3). Quando se aplicou SNP na dose de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em pré-tratamento, as plantas apresentaram baixa atividade da CAT às 24 e 120 HAAL.

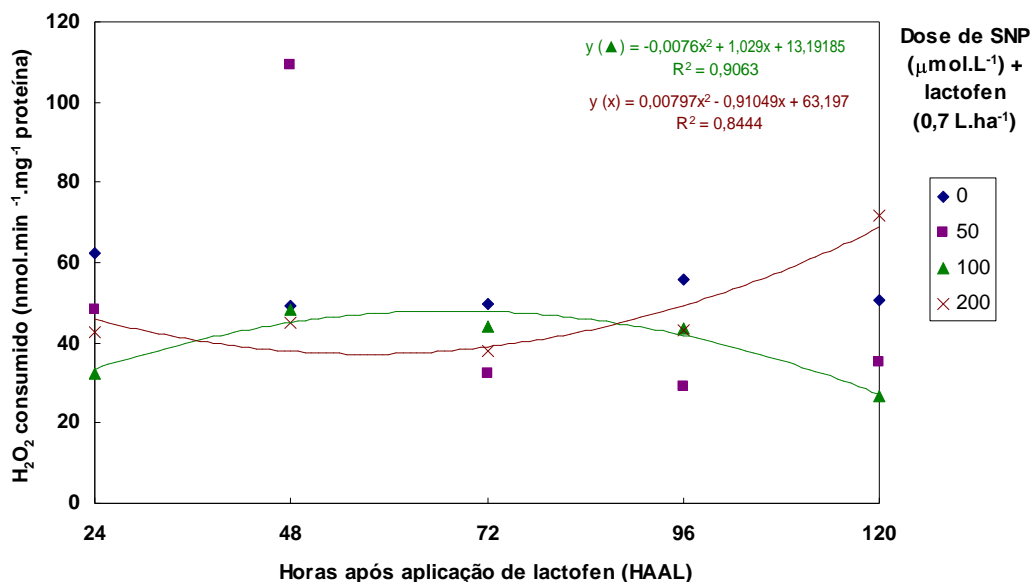


Figura 3. Atividade da CAT (nmol de H₂O₂ consumido.min⁻¹.mg⁻¹ proteína) em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 µmol.L⁻¹), seguido de lactofen (0,7 L.ha⁻¹), às 24, 48, 72, 96 e 120 HAAL. Na ausência de SNP e no pré-tratamento com 50 µmol.L⁻¹, não houve interação significativa entre doses de SNP + lactofen x DAAL, a 5% de probabilidade – sem ajuste. Médias de quatro repetições. HAAL: horas após aplicação de lactofen.

Como efeito isolado, observou-se um pico de atividade da CAT às 48 HAAL nas plantas pré-tratadas com 50 µmol.L⁻¹ de SNP, período onde a atividade da SOD também foi elevada. Tais resultados indicam a ação antioxidante conjunta da CAT e da SOD no combate ao estresse oxidativo, de modo que a SOD converte o radical O₂^{•-} em H₂O₂, que posteriormente é hidrolisado pela CAT, produzindo H₂O e O₂ (Halliwell & Gutteridge, 1990; Laspina et al., 2005).

De acordo com Polidoros & Scandalios (1999) a expressão gênica da CAT em milho pode ser inibida por baixas concentrações de H₂O₂ ou induzida por elevadas concentrações. Além disso, em folhas de arroz tratadas com ácido abscísico (ABA), Hung & Kao (2003) observaram aumentos concomitantes dos níveis de H₂O₂ e da atividade da CAT.

Estas informações permitem sugerir que no presente estudo a redução de atividade da CAT nas plantas pré-tratadas com SNP pode ter sido decorrente da menor produção

de H_2O_2 , como efeito do NO, o que reitera sua ação protetora nas plantas de soja pela eliminação das ERMO geradas pelo lactofen.

Porém, foi detectado aumento de atividade da CAT nas plantas pré-tratadas com a maior dose de SNP ($200 \mu\text{mol.L}^{-1}$) às 120 HAAL. Tal fato não era esperado, pois neste período as plantas apresentaram baixas atividades das enzimas GST e SOD. Uma possível explicação seria que a CAT estaria removendo parte do H_2O_2 gerado e ainda não eliminado por ação do NO, contribuindo para a defesa antioxidante das plantas contra o estresse oxidativo induzido pelo lactofen.

As PODs apresentam função antioxidante nas células vegetais expostas a condições de estresse por decompõem o H_2O_2 produzido pela SOD, tendo ação semelhante à da CAT (Bor et al., 2003). Pesquisas relatam aumentos de atividade da POD em resposta a diferentes condições de estresses ambientais, como presença de ozônio em folhas de *Sedum album* (Castillo et al., 1984), dióxido de enxofre em plantas de cevada (Navari-Izzo & Izzo, 1994), elevada luminosidade em plântulas de trigo (Mishra et al., 1995), baixas temperaturas e presença de H_2O_2 em plântulas de milho (Prasad et al., 1994) e presença do herbicida oxyfluorfen em células de soja (Knörzer et al., 1996). Nesses casos, foi considerado que a POD desempenhou importante papel na eliminação do H_2O_2 durante as referidas condições geradoras de estresse oxidativo.

Nos momentos iniciais da avaliação, até 72 HAAL, as plantas pré-tratadas com $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP apresentaram aumento de atividade da POD, seguido de redução nos períodos posteriores, semelhante ao observado em relação às atividades da SOD e da CAT (Figura 4).

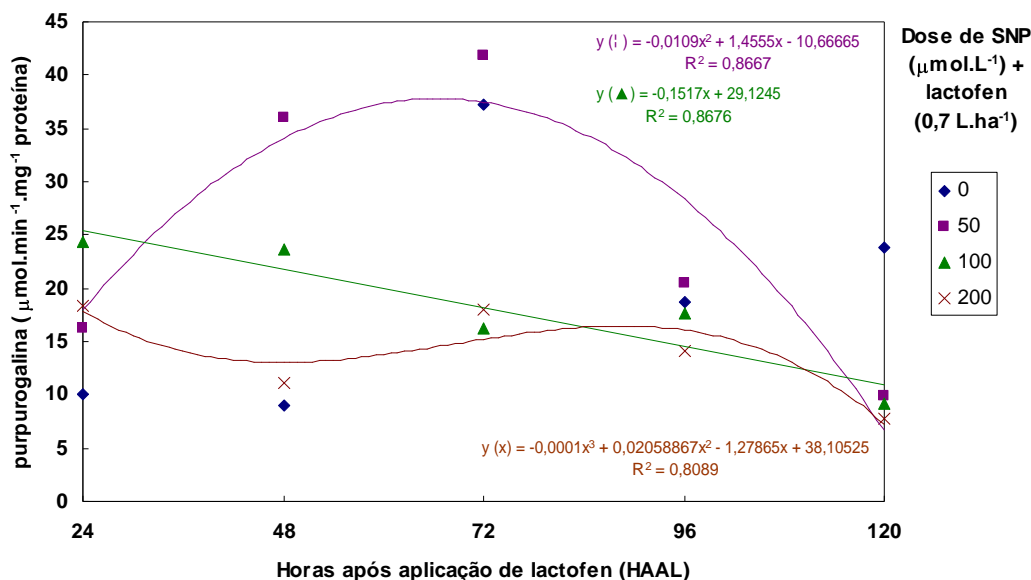


Figura 4. Atividade da POD (μmol de purpurogalina. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), seguido de lactofen (0,7 L.ha⁻¹), às 24, 48, 72, 96 e 120 HAAL. Na ausência de SNP, não houve interação significativa entre doses de SNP + lactofen x DAAL, a 5% de probabilidade – sem ajuste. Médias de quatro repetições. HAAL: horas após aplicação de lactofen.

Nas plantas pré-tratadas com as maiores doses de SNP (100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), houve tendência à redução de atividade da POD com o decorrer do tempo. Similarmente, Chi Yu et al. (2005) observaram ausência de indução de atividade da POD em folhas de arroz pré-tratadas com SNP sob estresse induzido pela presença de cobre.

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, pode ser concluído que em plantas de soja, o NO apresenta capacidade de eliminação das ERMO geradas pela ação do herbicida lactofen, o que acarretou tanto diminuição de substrato disponível para as enzimas antioxidantes SOD, CAT e POD, essenciais na proteção das plantas em situações indutoras de estresse oxidativo, como ausência de indução da GST pelo H₂O₂.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo financiamento deste trabalho.

LITERATURA CITADA

BAKER, C.J., ORLANDI, E.W. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v.33, p.299-321, 1995.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Is nitric oxide toxic or protective? *Trends Plant Sci.*, v.4, p.299-300, 1999a.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta*, v.208, p.337-344, 1999b.

BOR, M., ÖZDEMİR, F., TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Sci.*, v.164, p.77-84, 2003.

BOWLER, C., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v.43, p.83-116, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976.

CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: EVERSE, J., EVERSE, K.E., GRISHAM, M.B. *Peroxidases in chemistry and biology*. Boca Raton, CRC Press, 1991. p.25-50.

CARO, A., PUNTARULO, S. Nitric oxide decreases superoxide anion generation by microsomes from soybean embryonic axes. *Physiol. Plant.*, v.104, p.357-364, 1998.

CASTILLO, F.J., PENEL, C., GREPPIN, H. Peroxidase release induced by ozone in *Sedum album* leaves. *Plant Physiol.*, v.74, p.846-851, 1984.

CATANEO, A.C. et al. Glutathione S-transferase activity in acetochlor, atrazine and oxyfluorfen metabolization in maize (*Zea mays* L.), sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) (Poaceae). *Acta Sci.*, v.24, p.619-623, 2002.

CATANEO, A.C. et al. Atividade de glutathiona S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). *Planta Daninha*, v.21, p.307-312, 2003.

CHI YU, C., HUNG, K.T., KAO, C.H. Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced NH₄⁺ accumulation in rice leaves. *J. Plant Physiol.*, v.162, p.1319-1330, 2005.

COUÉE, I. et al. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.*, v.57, p.449-459, 2006.

DELLEDONNE, M. et al. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, v.394, p.585-588, 1998.

DESIKAN, R. et al. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem. J.*, v.330, p.115-120, 1998.

DEVINE, M., DUKE, S.O., FEDTKE, C. *Physiology of herbicide action*. New Jersey: Englewood Clifts, 1993. 441p.

DODGE, A. Herbicide action and effects on detoxification processes. In: FOYER, C.H., & MULLINEAUX, P.M. *Causes of photoactive stress and amelioration of defense systems in plants*. Boca Raton, CRC Press, 1994. p.219-236.

DURNER, J., WENDEHENNE, D., KLESSIG, D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.95, p.10328-10333, 1998.

EKLER, Z., DUTKA, F., STEPHENSON, G.R. Safener effects on acetochlor toxicity, uptake, metabolism and glutathione S-transferase activity in maize. *Weed Res.*, v.33, p.311-318, 1993.

ELSTNER, E.F. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, v.33, p.73-96, 1982.

FOYER, C.H., DESCOURVIERES, P., KUNERT, K.J. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.*, v.17, p.507-523, 1994.

GIARDI, M.T., MASOJIDEK, J., GODDE, D. Effects of abiotic stresses on the turnover of the D₁ reaction centre II protein. *Physiol. Plant.*, v.101, p.635-642, 1997.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals, and disease. *Biochem. J.*, v.219, p.1-14, 1984.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. An overview. *Methods Enzymol.*, v.186, p.1-85, 1990.

HSU, Y.T., KAO, C.H. Cd toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regul.*, v.42, p.227-238, 2004.

HUNG, K.T., KAO, C.H. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *J. Plant Physiol.*, v.160, p.871-879, 2003.

IANNELLI, A.M. et al. Tolerance to low temperature and paraquat-mediated oxidative stress in two maize genotypes. *J. Exp. Bot.*, v.50, p.523-532, 1999.

IUBMB. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Enzyme nomenclature – EC 1.11.1.7. (Peroxidase). Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/11/1/7.html>>. Acesso em: 25 jun. 2007.

JEPSON, I. et al. Cloning and characterization of maize herbicide safener-induced cDNAs encoding subunits of glutathione S-transferase isoforms I, II and IV. *Plant Mol. Biol.*, v.26, p.1855-1866, 1994.

KNÖRZER, O.C., DURNER, J., BÖGER, P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiol. Plant.*, v.97, p.388-396, 1996.

KOPYRA, M., GWÓZDZ, E.A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol. Biochem.*, v.41, p.1011-1017, 2003.

LAMATTINA, L. et al. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v.54, p.109-136, 2003.

LASPINA, N.V. et al. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Sci.*, v.169, p.323-330, 2005.

LESHEM, Y.Y. Nitric oxide in biological systems. *Plant Growth Regul.*, v.18, p.155-159, 1996.

LEVINE, A. et al. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, v.79, p.583-593, 1994.

MANNERVIK, B., GUTHENBERG, C. Glutathione transferases (human placenta). *Methods Enzymol.*, v.77, p.231-235, 1981.

MARRS, K.A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v.47, p.127-158, 1996.

MEROTTO Jr., A., VIDAL, R.A. Herbicidas inibidores de PROTOX. In: VIDAL, R.A., & MEROTTO Jr., A. *Herbicidologia*. Porto Alegre, Evangraf, 2001. p.69-86.

MISHRA, N.P., FATMA, T., SINGHAL, J.S. Development of antioxidative defence system of wheat seedlings in response to high light. *Physiol. Plant.*, v.95, p.77-82, 1995.

NAVARI-IZZO, F., IZZO, R. Induction of enzyme activities and antioxidant production in barley plants as a result of SO₂ fumigation. *Plant Sci.*, v.96, p.31-40, 1994.

NEMAT ALLA, M.M., HASSAN, N.M. Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments. *Plant Physiol. Biochem.*, v.44, p.202-210, 2006.

POLIDOROS, A.N., SCANDALIOS, J.G. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol. Plant.*, v.106, p.112-120, 1999.

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

RADETSKI, C.M., COTELLE, S., FÉRARD, J.F. Classical and biochemical endpoints in the evaluation of phytotoxic effects caused by the herbicide trichloroacetate. *Environ. Exp. Bot.*, v. 44, p.221-229, 2000.

RADI, R. et al. Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation: cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.228, p.481-487, 1991.

REMAEH, L.M.R. Estresse oxidativo induzido pelo herbicida lactofen em plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill): resposta de enzimas antioxidantes. 2004. 87 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Estadual Paulista, 2004.

RODRIGUES, B.N., ALMEIDA, F.L.S. Guia de herbicidas. 4. ed. Londrina: IAPAR, 1998. 648p.

SANCHEZ-FERNANDEZ, R. et al. Do plants have more genes than humans? Yes, when it comes to ABC proteins. *Trends Plant Sci.*, v.6, p.347-348, 2001.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.*, v.101, p.7-12, 1993.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, v.82, p.291-295, 1997.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.*, v.125, p.27-28, 1993.

TEISSEIRE, H., GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Sci.*, v.153, p.65-72, 2000.

THÉRON, P. et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, v.3, p.373-384, 2000.

TSANG, E.W.T. et al. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell*, v.3, p.783-792, 1991.

VIDAL, R.A. Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas. Porto Alegre: Pallotti, 1997. 165p.

WINSTON, G.W. Physicochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses. In: ALSCHER, R.G., & CUMMING, J.R. Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms. New York, Wiley-Liss, 1990. p.57-86.

WU, J., OMOKAWA, H., HATZIOS, K.K. Glutathione S-transferase activity in unsafened and fenclorim-safened rice (*Oryza sativa*). *Pest. Biochem. Physiol.*, v.54, p.220-229, 1996.