

TEORES DE ETANOL EM RAÍZES DE SOJA SOB CONDIÇÕES DE HIPÓXIA

CORREA, Giovana H. N. Fülber^{1*}; VIEIRA, Denis Corte¹; ALENCASTRO, Sidnei Silva¹; BORELLA, Junior²; AMARANTE, Luciano³

¹ Universidade Federal de Pelotas (UFPe), Graduando (a) em Agronomia. *E-mail: giovana_correa@hotmail.com; ² Universidade Federal de Pelotas (UFPe), Doutorando Fisiologia Vegetal; ³ Universidade Federal de Pelotas (UFPe)/CCQFA, lucianoamarante@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Na natureza existem plantas que são expostas a condições ambientais desfavoráveis ao seu desenvolvimento. A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é um exemplo que se enquadra neste contexto. Embora introduzida e melhorada para áreas bem drenadas no Brasil, é uma espécie originária de áreas alagadiças do norte da China (EVANS, 1996). Existe variabilidade genética em soja para a tolerância ao excesso de umidade do solo (THOMAS et al., 2000), o que possibilita o seu cultivo em áreas de várzea do Rio Grande do Sul, como alternativa ao arroz-irrigado.

Estudos referentes a gradientes de oxigênio em várias estruturas das plantas, como raiz, caule, nódulos, entre outros (ARMSTRONG et al., 1994; VAN DONGEN et al., 2003), mostram que, as concentrações de oxigênio sob condições de hipóxia, podem variar, dependendo exclusivamente da atividade metabólica do tecido (VAN DONGEN et al., 2003). Logo, as respostas do metabolismo ao déficit de oxigênio estão diretamente envolvidas na otimização do status de energia, consumindo o mínimo possível de oxigênio (VAN DONGEN et al., 2011).

Com o déficit de O₂ ocorre a ativação do metabolismo fermentativo, resultando no acúmulo de produtos como o etanol, através da oxidação do piruvato proveniente da glicólise, por meio de duas reações subsequentes catalisada pela piruvato descarboxilase (PDC) e álcool desidrogenase (ADH) (TADEGE et al., 1999). No entanto, a produção de etanol pela ADH possui algumas desvantagens; sendo ele volátil, se difunde rapidamente para fora das células, ocasionando perda considerável de carbono durante a hipóxia (ROCHA et al., 2010).

Este trabalho teve por objetivo analisar os teores de etanol em raízes de duas cultivares de soja, submetidas a diferentes períodos de hipóxia do sistema radicular.

2. METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

O experimento foi desenvolvido com plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] cv. Embrapa 45 e BR 4, provenientes de sementes fornecidas pela Embrapa Clima Temperado, cultivadas em casa de vegetação sob condições naturais de luz e temperatura. As sementes foram semeadas em bandejas contendo vermiculita como substrato e, ao atingirem o estágio V0 (plântulas com cotilédones abertos) (FEHR et al., 1971), foram transferidas para sistema hidropônico, constituído de vasos de três litros contendo solução nutritiva sob aeração contínua de ar atmosférico via

aeradores de aquário comercial. Foram mantidas doze plantas por vaso durante todo o experimento, as quais foram nutridas com solução nutritiva conforme HEWITT (1963). Semanalmente, a solução nutritiva foi substituída visando manter a estabilidade na concentração dos nutrientes, assim como o pH em 6,6.

O tratamento hipóxico nas plantas foi aplicado ao atingirem o estágio de desenvolvimento V1 (folhas unifolioladas completamente desenvolvidas) (FEHR et al., 1971). Nessa ocasião, as plantas foram transferidas para vasos com solução nutritiva sob fluxo contínuo de gás N₂ (99,99% N₂), quando o teor de O₂ na solução estava próximo a zero mg.L⁻¹. O tratamento foi aplicado nas plantas nos intervalos de tempo de 0,5h; 4h; 24h e 72h. A concentração de oxigênio na solução foi monitorada com o auxílio de um oxímetro (Handylab OX1). Plantas mantidas no sistema hidropônico sob aeração contínua de ar atmosférico foram utilizadas como controle.

O etanol foi extraído por maceração de raízes, com auxílio de N₂ líquido em almofariz, seguindo da adição de 8 mL de ácido perclórico (6%) e centrifugado a 3000g por 20 minutos a ±4°C. O sobrenadante foi neutralizado com K₂CO₃ (4M), acompanhado da adição prévia de alaranjado de metila (0,5 mg mL⁻¹) levando à precipitação de perclorato de potássio após 1h em geladeira. O sobrenadante foi coletado e o volume aferido. Após centrifugação (14.000g por 5 minutos ±4°C), o pH foi corrigido para 7, quando necessário. A quantificação de etanol foi determinada pelo registro da redução de NAD⁺ a NADH a 340 nm em espectrofotômetro, através de Kits de ensaio (Boehringer, Mannheim, Germany) conforme descrito por Kolb e Joly (2009).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 x 2 [genótipos de soja (Embrapa 45 e BR 4) x períodos de tratamento (0,5h; 4h; 24h e 72h) x condição de tratamento (normóxia e hipóxia), com quatro repetições. A unidade experimental foi constituída por seis plantas. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As análises foram realizadas com o auxílio do programa SAS (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de O₂ monitorados ao longo do período de inundação foram próximos a zero mg L⁻¹, caracterizando a hipóxia na solução de cultivo. Os valores de etanol em raízes variaram ao longo do experimento, sendo observada uma resposta diferenciada ao déficit de O₂ no sistema radicular entre os dois genótipos (Figura 1).

A inundação promoveu um aumento significativo no teor de etanol no período de 4h de hipóxia para o genótipo Embrapa 45, seguido de uma constante queda dos teores em 24 e 72h em relação ao controle. Para BR4 o período de inundação não foi suficiente para elevar o teor de etanol do sistema radicular, permanecendo os níveis próximos ao controle (Figura 1). O aumento significativo dos valores de etanol do genótipo Embrapa 45 em relação a BR4 demonstra que este é mais responsivo aos efeitos da inundação, sendo capaz de alterar o seu metabolismo para o provimento de energia.

O etanol é provavelmente o maior produto de tecidos em plantas e sua rota de formação é responsável pela tolerância ao déficit de O₂. Ele é produzido

sequencialmente pela ação da PDC, através da oxidação e descarboxilação do piruvato em acetaldeído, que é substrato para ADH produzir etanol (GOOD; CROSBY, 1989).

As concentrações de etanol normalmente encontradas em plantas são insuficientes para causar toxicidade. Por outro lado, o etanol não é facilmente metabolizado e, sendo solúvel na bicamada lipídica das membranas celulares (DREW, 1997), pode quase que totalmente ser difundido para fora do meio circundante, resultando em perda de carbono (GOOD; CROSBY, 1989; ROCHA et al., 2010). Este fato explica provavelmente a queda dos teores de etanol em 24 e 72h de hipóxia.

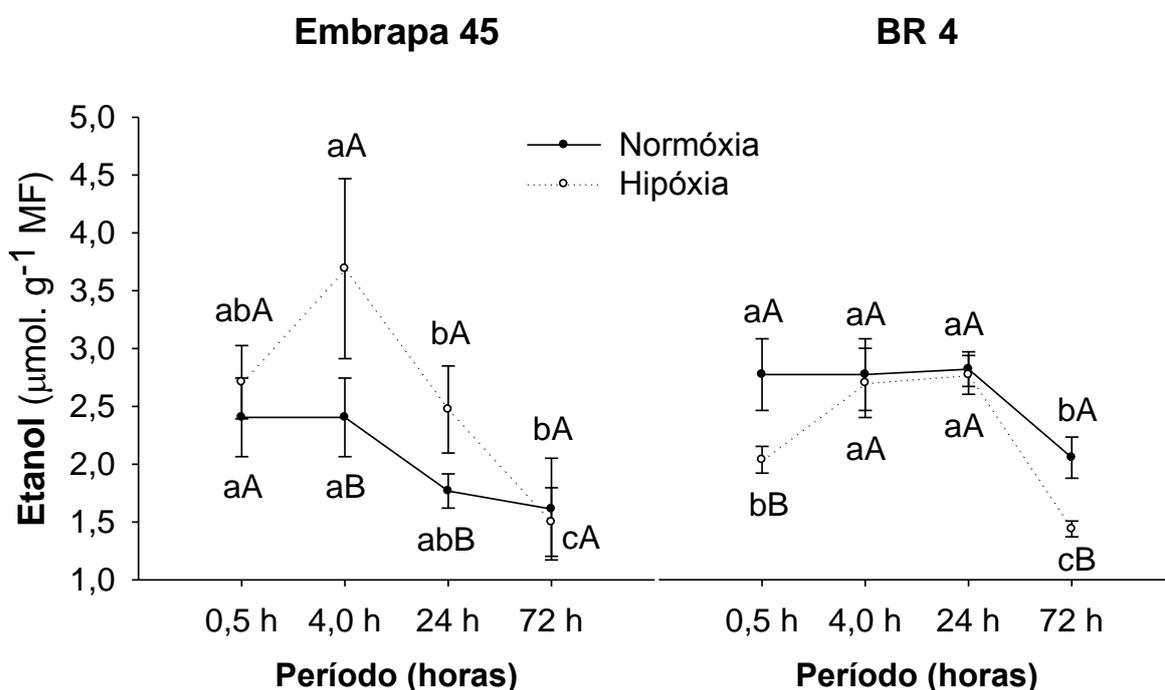


Figura 1. Teor de etanol em raízes de soja das cultivares Embrapa 45 e BR 4, submetidas a diferentes períodos de hipóxia do sistema radicular. Letras maiúsculas comparam os tratamentos de normóxia e de hipóxia entre si para os períodos de 0,5, 4, 24 e 72h e letras minúsculas comparam o tratamento de normóxia ou de hipóxia isoladamente entre períodos de avaliação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

4. CONCLUSÃO

O estresse por hipóxia em sistema hidropônico é capaz de induzir em curtos períodos o acúmulo de etanol em raízes de soja em estágio V1, resultante da atividade da fermentação alcoólica. Os resultados indicam que a capacidade de rápida resposta é influenciada pelo genótipo, sugerindo que Embrapa 45 apresenta uma maior tolerância à hipóxia que o genótipo BR 4.

5. AGRADECIMENTOS

À Embrapa Clima Temperado e à Monsanto pelo auxílio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, W.; STRANGE, M.E.; CRINGLE, S.; BECKETT, P.M. Microelectrode and modeling study of oxygen distribution in roots. **Annals of Botany**, v. 74, p. 287-299, 1994.
- DREW, M.C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.48, p. 223–250, 1997.
- EVANS, L.T. **Crop evolution, adaptation and yield**. Cambridge, University Press, 1996, 500p.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merril. **Crop Science**, v.11, p. 929-931, 1971.
- GOOD, A.G & CROSBY, W.L. Anaerobic induction of alanina aminotransferase in barley root tissue. **Plant Physiology**, v.90, p.1305-1309, 1989.
- HEWITT, E.J. Mineral nutrition of plants in culture media. In: STEWART, F.C. (ed) **Plant Physiology**. Academic Press, New York, 97-134, 1963.
- KOLB, R.M.; JOLY, C.A. Flooding tolerance of *Tabebuia cassinoides*: Metabolic, morphological and growth responses. **Flora**, v. 204, p. 528-535, 2009.
- ROCHA, M., LICAUSI, F., ARAÚJO, W.L., NUNES-NESE, A., SODEK, L., FERNIE, A.R., VAN DONGEN, J.T. Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle Are Linked by Alanine Aminotransferase during Hypoxia Induced by Waterlogging of *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, v. 152, p. 1501-1513, 2010.
- THOMAS, A.L.; PIRES, J.L.F.; MENEZES, V.G. Rendimento de grãos de cultivares de soja na várzea. **Pesquisa Agropecuária gaúcha**, v.6, p. 1294-1301, 2000.
- TADEGE, M.; DUPUIS, I.; KUHLEMEIER, C. Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. **Trends in Plant Sciences**, v. 4, n. 8, p. 320-325, 1999.
- VAN DONGEN, J.T.; GUPTA, K.J.; RAMÍREZ-AGUILAR, S.J.; ARAÚJO, W.L.; NUNES-NESE, A.; FERNIE, A.R. Regulation of respiration in plants: A role for alternative metabolic pathways. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 1434-1443, 2011.
- VAN DONGEN, J.T.; SCHURR, U.; PFISTER, M.; GEIGENBERGER, P. Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. **Plant Physiology**, v. 131, p. 1529-1543, 2003.