



ADAPTAÇÕES METODOLÓGICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ÁLCOOL DESIDROGENASE EM RAÍZES E NÓDULOS DE SOJA

**Badinelli, Pablo Gerzson¹; Luciano do Amarante²; Denise dos Santos Colares²;
Lílian Tunes³;**

¹ Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal/UFPEL, pgbagro@yahoo.com.br

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Química e Geociências – UFPEL

³ Departamento de Fitotecnia, Ciência e Tecnologia de Sementes – FAEM/UFPEL
Campus Universitário, Capão do Leão, RS – CEP 96001-900.

1. INTRODUÇÃO

Na natureza as plantas são constantemente expostas a condições ambientais desfavoráveis ao seu desenvolvimento. A deficiência de oxigênio ocasionada por inundações temporárias devido a chuvas e irrigações pode-se tornar freqüente em regiões de solos hidromórficos, onde a drenagem é deficiente, também conhecidos como solos de várzea, cuja principal característica é o relevo predominantemente plano, com freqüência associado a um perfil de camada superficial pouco profunda e a sub-superficial praticamente impermeável (Pinto et al., 1999). Neste contexto, enquadra-se a cultura da soja, que, embora introduzida e melhorada para áreas bem drenadas no Brasil, é uma espécie originária de áreas alagadiças do norte da China (Evans, 1996) e apresenta variabilidade genética para tolerar o excesso de umidade no solo (Van Toai et al., 1994; Thomas et al., 2000; Pires et al., 2002).

O oxigênio serve como um acceptor de elétrons na fosforilação oxidativa que regenera o ATP, principal fonte de energia para o metabolismo aeróbico celular. Na sua ausência o metabolismo fermentativo é ativado com a intenção de manter a produção de energia e agentes redutores através da regeneração do NAD⁺ reduzindo o NADH (Dennis et al, 2000). Estudos com ressonância magnética têm mostrado que o pH citosólico acidifica-se durante o alagamento em raízes de milho, e que após um prolongado tratamento, o álcool é o principal produto da fermentação (Fox et al, 1995). Plantas que são mais tolerantes ao alagamento têm a via de fermentação alcoólica mais ativa. A enzima álcool desidrogenase (ADH; EC 1.1.1.1) é uma das principais enzimas fermentativas, que converte o acetaldeído em etanol, considerado menos tóxico à planta do que o acetaldeído e por ser translocado para fora da célula, inclusive para rizosfera.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os genótipos de soja [*Glycine Max* (L.) Merr.], BRS-154 (tolerante) e BRS-153 (susceptível), inoculados com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SEMIA 587, foram

cultivados em casa de vegetação, em vasos de polietileno de 3L contendo como substrato a vermiculita e nutridas com solução nutritiva de Hoagland & Arnon(1938), sem N, na proporção de 250 mL por vaso administrada duas vezes por semana. As plantas foram coletadas em estágio de desenvolvimento R2 e as amostras de tecido de raízes (2g) e nódulos (0,5g) foram coletadas do terço inferior do sistema radicular, lavadas com água destilada gelada para diminuir a atividade do metabolismo do tecido e retirado o excesso de água com papel toalha. A extração da ADH foi realizada conforme descrito por Good & Crosby (1989), com algumas modificações e dosadas conforme a metodologia descrita por Kato-Noguchi e Watada (1997), no Laboratório de Bioquímica Vegetal do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química e Geociência da UFPel. O meio de reação com volume final de 3000 μ L, foi composto pelo extrato de tecido dessalinizado em coluna Shephadex G-25 (PD-10, Amersham Pharmacia), β -NADH (0,2 mM), tampão de dosagem (Tris-HCl 50 mM pH 7,5) e acetaldeído (150 mM). A reação foi iniciada com a adição de acetaldeído no meio de reação pré-incubado a 30°C. A cinética enzimática foi determinada pelas leituras de queda de absorbância a 340 nm pela oxidação de β -NADH e a reação ocorreu no sentido da formação do etanol, registradas a cada 10 segundos para o extrato de nódulos e a cada 30 segundos para extrato de raízes por um período de 10 minutos. Os testes foram realizados em pelo menos 8 extratos de nódulo e raízes.

O objetivo deste trabalho foi determinar a linearidade de reação para intervalo de tempo e concentração de enzima, para assim realizar a quantificação da enzima ADH em raízes e nódulos de duas cultivares contrastantes quanto à tolerância ao alagamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram realizados testes variando-se o tempo de dosagem e volume de extrato enzimático, em intervalos de 10 para nódulos e 30 para raízes segundos por pelo menos oito minutos. Observou-se que a linearidade de reação foi obtida com volumes de extrato entre 50 e 100 μ L para nódulos e entre 800 e 1600 μ L para raízes. O intervalo adotado para leitura foi de 30 segundos, considerado adequado à medição da ADH, para nódulos e raízes nos genótipos BRS 153 e BRS 154 (Figuras 1, 2 e 3).

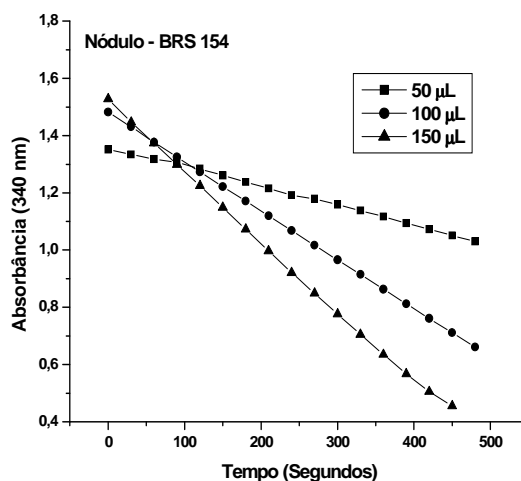
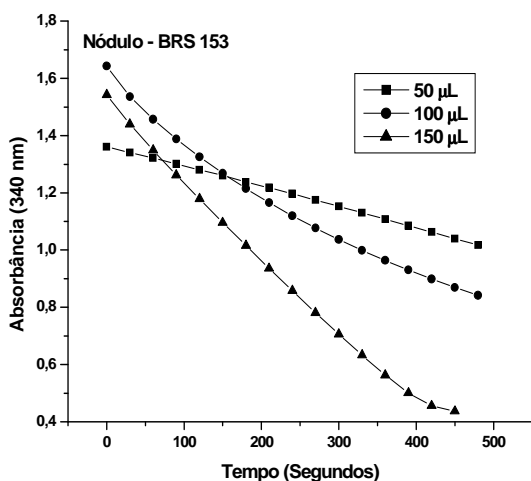


Figura 1. Queda de absorvância a 340 nm em ensaio enzimático da ADH em diferentes volumes de extrato enzimático de nódulos dos genótipos de soja BRS 153 e BRS 154 em função do tempo de reação, medido em intervalo de 30 segundos.

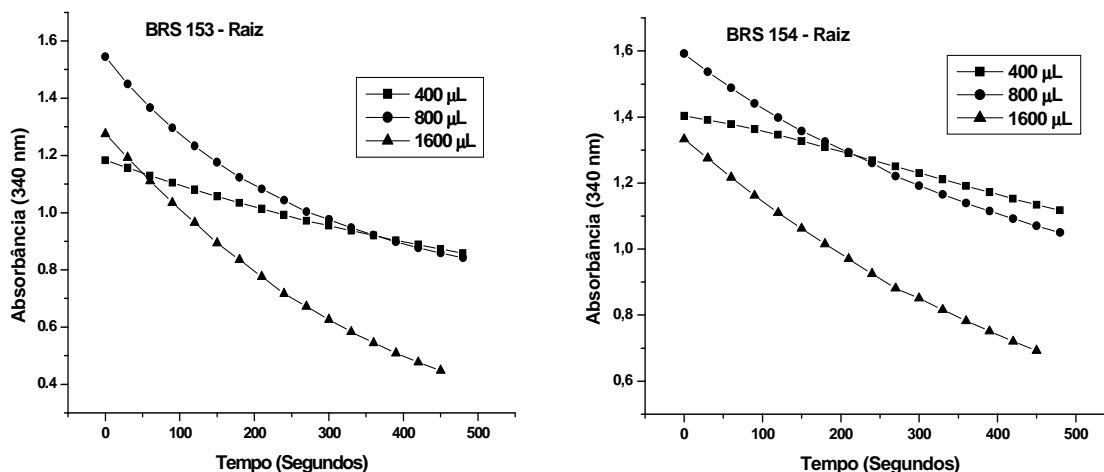


Figura 2. Queda de absorvância a 340 nm em ensaio enzimático da ADH em diferentes volumes de extrato enzimático de raízes dos genótipos de soja BRS 153 e BRS 154 em função do tempo de reação, medido em intervalo de 30 segundos.

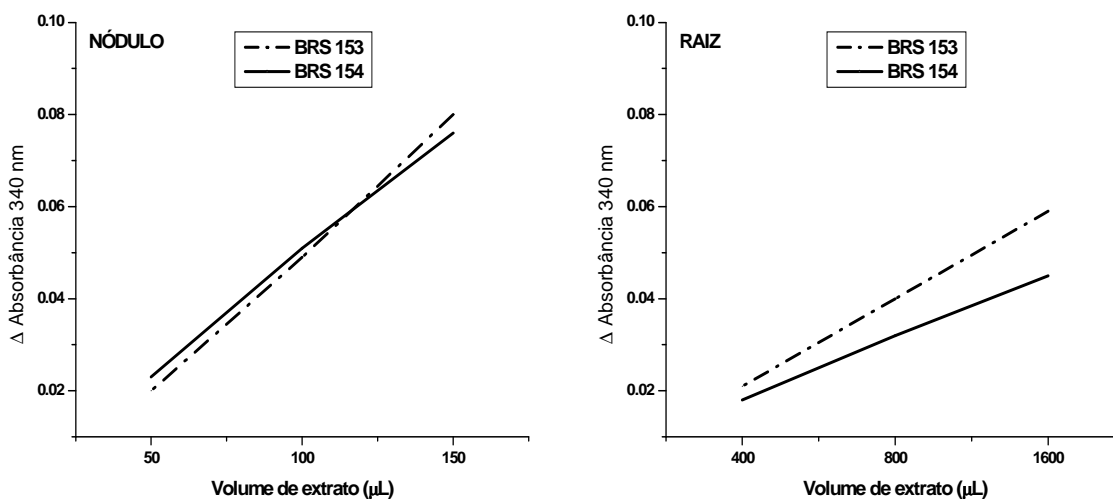


Figura 3. Variação de absorvância a 340 nm em diferentes volumes de extrato enzimático de nódulos e de raízes dos genótipos BRS 153 e BRS 154 em função do tempo de reação para a enzima ADH.

4. CONCLUSÕES

A linearidade na queda de absorvância foi constatada até 240 segundos para os volumes entre 400 µL e 1600 µL de extrato enzimático de raízes e até 180 segundos para extrato enzimático de nódulos em volumes variando entre 50 µL e 150 µL para 3.000 µL de volume final de meio de reação.

Os resultados demonstraram atividade superior da ADH nos nódulos em relação às raízes de plantas crescidas sob condições não limitantes de disponibilidade de O₂.

Palavras- chave: ADH, soja, *Glycine max*, estresse, hipoxia, alagamento

5. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos: CAPES, FAPERGS, EMBRAPA-CPACT, FEPAGRO e IRGA

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dennis, E.S., Dolferus, R., Ellis, M., Rahman, M., Wu, Y., Hoeren, F.U., Grover, A., Ismond, K.P., Good, A.G. & Peacock, W.J.,. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. **Journal of Experimental Botany**, 2000, vol. 51, n. 342, p.89-97.

Evans, L.T. Crop evolution, adaptation and yield. Cambridge, **University Press**, 1996, 500p.

Fox, T.C., Kennedy, R.A.& Rumpho, M.E. Energetics of plant growth under anoxia: metabolic adaptations of *Oryza sativa* and *Echinochloa phyllopogon*. **Annals of Botany**. Vol, 74, p.445-455, 1995.

GOOD, A.G & CROSBY, W.L. Anaerobic induction of alanina aminotransferase in barley root tissue. **Plant Physiology**. 1989, v.90, p.1305-1309.

HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. 1938. The water culture method of growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**, Bull. 347, 1-39.

PIRES, L.F.S.; PAULETTO, E.A.;GOMES, A.da S. & SOUSA, R.O..1999. Caracterização de solos de várzea. In: Gomes,A.da S. & PAULETTO,E.A., ed. **Manejo do solo e da água em solos de várzea**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado.p.12-36

Pires, J.L.; Soprano, E. & Cassol, B. Adaptações morfo-fisiológicas da soja em solo inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 2002, vol. 37, p.41-50.

KATA-NOGUCHI,H &WATADA, A.E.: Effects of low-oxygen atmosphere on ethanolic fermentation in fresh-cut carrots – **Journal Societ American for Horticultural Science (USA)**.122; 107–111, 1997.

VanToai, T.T; Beuerlein, J.E.; Schmittherrner, A.F. & Martin, S.K.St. Genetic variability for flooding tolerance in soybeans. **Crop Science**. 1994, vol. 34, p. 1112-1115.

Thomas, A.L.; Pires, J.L.F. & Menezes, V.G. Rendimento de grãos de cultivares de soja na várzea. **Pesquisa Agropecuária gaúcha**. 2000, vol.6, p. 1294-1301.