

## EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ÁLCOOL DESIDROGENASE, PIRUVATO DESCARBOXILASE E LACTATO DESIDROGENASE EM RAÍZES E NÓDULOS DE SOJA

**DURIGON, Marcel Angelo<sup>1</sup>; BORELLA, Junior<sup>2</sup>; LIMA, Milene Conceição<sup>3</sup>; MINOTTO, Elisandra<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Graduando em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Caixa postal 354 CEP 96010-900, Capão do Leão - RS, Brasil, [marceldurigon@bol.com.br](mailto:marceldurigon@bol.com.br); <sup>2</sup> Mestrando em Fisiologia Vegetal, UFPEL; <sup>3</sup> Doutoranda em Fisiologia Vegetal, UFPEL; <sup>4</sup> Laboratório de Microbiologia, UFPEL

**AMARANTE, Luciano do**

*Professor adjunto, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química e Geociências, UFPEL*

### 1 INTRODUÇÃO

Em ambientes hipóxicos, as plantas convertem piruvato a acetaldeído através da enzima piruvato descarboxilase (PDC; EC 4.1.1.1) e acetaldeído a etanol através da álcool desidrogenase (ADH; EC 1.1.1.1), regenerando, assim,  $\text{NAD}^+$  para sustentar a glicólise (BAILEY-SERRES AND VOESENEK, 2008). Estas vias mantêm uma geração de energia (ATP) mesmo que em pequena quantidade, assegurando a sobrevivência da planta em condições de alagamento temporário. O  $\text{NAD}^+$  pode também ser regenerado pela conversão de piruvato a lactato através da lactato desidrogenase (LDH; EC 1.1.1.27).

Afirma-se que em milho a formação de lactato e etanol é regulada pelo pH citoplasmático. Um pH baixo favorece a formação de etanol e um alto pH favorece a via para formação de lactato (ROBERTS et al. 1984). Em soja, existem trabalhos que caracterizam as enzimas envolvidas nesses processos (BARTHOVA, 1978; KIMMERER, 1987; TIHANYI, 1988), porém estes estudos se limitam a alguns tecidos, sendo restritas as análises em nódulos radiculares. Estes órgãos são responsáveis pelo suprimento de nitrogênio à planta, quando em associação simbiótica com rizóbio, cuja atividade metabólica está diretamente envolvida na recuperação da planta após inundações. Assim, este trabalho teve por objetivo verificar o pH ótimo para a atividade das enzimas ADH, PDC e LDH em raízes e nódulos de soja sob hipoxia.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Plantas de soja da cultivar Fundacep 53 RR foram cultivadas em casa de vegetação em vasos de polietileno de três litros contendo vermiculita como substrato. As plantas foram inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SEMIA 587 (Fepagro) no estágio V0 (FEHR et al., 1971) e os nutrientes foram disponibilizados pela aplicação de 200mL de solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND E ARNON, 1938) desprovida de nitrogênio, duas vezes por semana. O tratamento de inundação ocorreu no estágio V5 (FEHR et al., 1971) através da aplicação de solução nutritiva três vezes diluída, com o encaixe de um vaso de mesmas dimensões e sem furos abaixo do vaso que continham as plantas. Manteve-se uma lâmina de 2cm de solução acima do substrato durante todo o período de inundação. Após onze dias de alagamento, em plantas em estágio R2 (FEHR et al., 1971), foram coletados raízes (2g) e nódulos (0,5g) e imediatamente

armazenados em ultra-freezer (-86°C) para posterior análise. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições e a unidade experimental foi constituída de um vaso com três plantas.

O extrato enzimático foi obtido conforme KATO NOGUCHI (2000) com modificações. Manteve-se uma temperatura de aproximadamente 4°C durante todas as fases da extração. As amostras foram maceradas em almofariz com o auxílio de pistilo. Para raízes foram utilizados aproximadamente 100mL de nitrogênio líquido para auxiliar na fragmentação dos tecidos. Nesta etapa adicionou-se 5% de polivinilpolipirrolidona e de 4 a 6mL de tampão de extração tris-HCl 50mM pH 7,5 contendo ditiotretitol 1mM. O extrato obtido foi submetido à centrifugação durante 20min a 10.000xg sob temperatura de 2 a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi dessalinizado por cromatografia de exclusão em coluna de sephadex G-25 médio (PD 10; Amersham Pharmacia Biotech) e o eluído utilizado como fonte das enzimas.

As atividades das enzimas foram observadas através da oxidação do NADH, com base na leitura em espectrofotômetro (modelo T80 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments) de feixe duplo a 340nm durante 1min, com intervalos de 5s. Os ensaios enzimáticos foram conduzidos em cubetas descartáveis de polimetilmetacrilato, previamente incubadas em sistema de aquecimento Peltier sob 30°C, sendo o volume final do meio de reação de 1,5mL. As determinações da atividade das enzimas ADH, PDC e LDH foram realizadas conforme metodologias de KATO-NOGUCHI E WATADA (1997), RIVOAL et al. (1990) e HOFFMAN et al. (1986), respectivamente, com pequenas modificações.

Os tampões de ensaio utilizados foram: citrato (pHs 4,0 e 5,0), MES (pHs 5,5; 6,0 e 6,5), fosfato (pHs 7,0 e 7,5), tris-HCl (pH 8,0) e borato (pH 9,0). Os ensaios enzimáticos foram conduzidos em triplicata para cada unidade experimental.

O ensaio para determinação da atividade da ADH foi conduzido em meio de reação contendo  $\beta$ -NADH 0,2mM; 5 a 20 $\mu$ L de extrato enzimático obtido de nódulos ou 35 a 200 $\mu$ L de extrato enzimático de raízes, acetaldeído 5mM para iniciar a reação e tampão de ensaio 50 mM.

A composição do ensaio para dosagem da LDH consistiu em  $\beta$ -NADH 0,2mM; 40 a 100 $\mu$ L de extrato enzimático obtido de nódulos ou 150 a 300 $\mu$ L de extrato de raízes; KCN 3 $\mu$ M; metilpirazol 4mM (para inibir a atividade da ADH); piruvato de sódio 10mM para iniciar a reação e tampão de ensaio 50mM.

O meio de reação para dosagem da PDC consistiu em  $\beta$ -NADH 0,2mM; 100 $\mu$ L de extrato enzimático para nódulos e 200 a 300 $\mu$ L para raízes; tiamina pirofosfato 0,5mM; cloreto de magnésio 1mM; ADH 10U; ácido oxâmico 20mM (para inibir a LDH); piruvato de sódio 10mM e tampão de ensaio 50mM

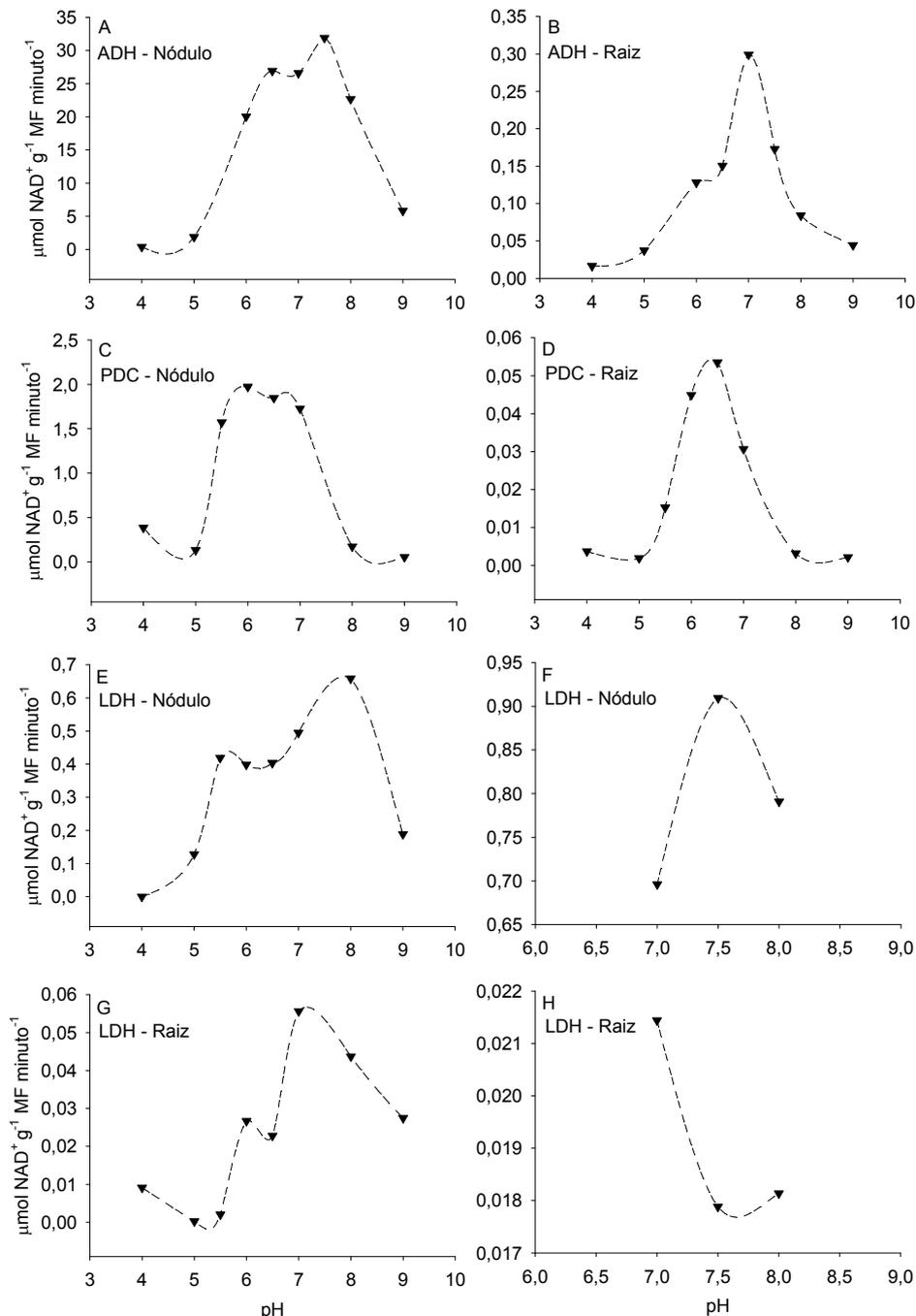
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Houve diferença na atividade da ADH em nódulos e raízes com a variação do pH (Figuras 1A e 1B). Foi identificada uma maior atividade enzimática em pH 7,5 para nódulos e em pH 7,0 para raízes. Resultados semelhantes para a ADH com pH ótimo próximo do neutro foram observados por KATO-NOGUCHI e SAITO (2000) em plântulas de alface sob hipoxia.

Já para a PDC (Figuras 1C e 1D), a maior atividade foi encontrada em pH 6,0 para nódulos e em pH 6,5 para raízes.

A maior atividade da LDH foi verificada nos mesmos pHs ótimos da ADH, conforme mostra as figuras 1E e 1G e com maior detalhe nas figuras 1F e 1H.

Os resultados sugerem que a PDC atua em pHs menores que as demais enzimas diretamente ligadas à fermentação, confirmando, deste modo, que a maior ativação da PDC ocorre após a acidificação do citoplasma devido ao acúmulo de ácido láctico. Assim, esta enzima guia o piruvato para a via de formação de etanol, que é o principal produto da fermentação (DREW, 1997), evitando a acidose celular, provocada pela contínua atividade da LDH.



**Figura 1.** Atividade das enzimas fermentativas em raízes e nódulos de soja cv. Fundacep 53 RR no estágio R2 em função do pH após 11 dias de inundação do sistema radicular

## 4 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que foram conduzidos os ensaios enzimáticos, sugere-se que as enzimas ADH e LDH apresentam maior atividade em pH 7,5 em nódulos e pH 7,0 em raízes, enquanto a PDC é mais ativa em pH 6,0 em nódulos e pH 6,5 em raízes.

## 5 AGRADECIMENTOS

Ao convênio Embrapa/Monsanto pelo apoio financeiro e à Fepagro

## 6 REFERÊNCIAS

- BAILEY-SERRES, J. e VOESENECK, L. A. C. J. Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.59, p.313-339, 2008.
- BARTHOVA, J., JANOUSEK, S., LEBLOVA, S. Effect of pH and temperature on rate of reaction catalyzed by lactate-dehydrogenase from soybean plants. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v.43, n.11, p.2960-2966, 1978.
- 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.
- 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.
- HOAGLAND, D. R. e ARNON, D. I. The water culture method of growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**, v.347, p.1-39, 1938.
- HOFFMAN, N.E., BENT, A.F., HANSON, A.D. Induction of lactate dehydrogenase isozymes by oxygen deficit in barley root tissue. **Plant Physiol.**, v.82, p.658-663, 1986.
- KIMMERER, T. W. Alcohol Dehydrogenase and Pyruvate Decarboxylase Activity in Leaves and Roots of Eastern Cottonwood (*Populus deltoids* Bartr.) and Soybean (*Glycine max* L.). **Plant Physiol.**, v.84, p.1210-1213, 1987.
- KATO-NOGUCHI, H. Evaluation of the importance of lactate for the activation of ethanolic fermentation in lettuce roots in anoxia. **Physiologia Plantarum**, v.109, p.28-33, 2000.
- KATO-NOGUCHI, H. e SAITO, H. Induction of alcohol dehydrogenase in lettuce seedlings by flooding stress. **Biologia Plantarum**, v.43, n.2, p.217-220, 2000.
- KATO-NOGUCHI, H. e WATADA, A. E. Effects of low-oxygen atmosphere on ethanolic fermentation in fresh-cut carrots. **J. Am. Soc. Hortic., Sci.**, v.122, p.107-111, 1997.
- RIVOAL J., RICARD B., PRADET A. Purification and partial characterization of pyruvate decarboxylase from *Oryza-sativa* L. **European Journal Of Biochemistry**, v.194, n.3, p.791-797, 1990.
- ROBERTS J.K.M., CALLIS J., WEMMER D., WALBOT V., JARDETZKY O. Mechanisms of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under anoxia. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.81, p.3368–3372, 1984.
- TIHANYI, K., TALBOTA, B., BRZEZINSKIA, R., THIRION, J. P. Purification and characterization of alcohol dehydrogenase from soybean. **Phytochemistry**, v.28, n.5, p.1335-1338, 1989.