

ATIVIDADE DA ALANINA AMINOTRANSFERASE EM RAÍZES DE DUAS CULTIVARES DE SOJA SOB HIPOXIA

BORELLA, Junior¹; DURIGON, Marcel Angelo²; LIMA, Milene Conceição³; COLARES, Denise dos Santos⁴; EMYGDIO, Beatriz Marti⁵ OLIVEIRA, Ana Claudia Barneche⁵

¹ Mestrando PPG Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Caixa postal 354 CEP 96010-900, Capão do Leão-RS, Brasil. E-mail: borellaj@gmail.com, ² Graduando em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), ³ Doutoranda PPG Fisiologia Vegetal, UFPel; ⁴Instituto de Química e Geociências, Universidade Federal de Pelotas (UFPel); ⁵ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA - Clima Temperado, Caixa Postal 403 CEP 96010-971, Pelotas-RS, Brasil

AMARANTE, Luciano

Instituto de Química e Geociências, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Caixa postal 354 CEP 96010-900, Capão do Leão-RS, Brasil

1 INTRODUÇÃO

Uma forma de aumentar a eficiência do sistema produtivo brasileiro é diversificar culturas nas áreas de várzea (sujeitas ao alagamento). Nas condições brasileiras, a cultura de soja, principal produtora de óleo vegetal, matéria prima para a produção de biodiesel, apresenta-se como uma alternativa interessante e potencialmente viável para ocupar esse segmento. No entanto, o cultivo em solos hidromórficos de forma a possibilitar retorno econômico, depende da existência de cultivares tolerantes ao excesso de água no solo, pois a deficiência de oxigênio altera o metabolismo celular, prejudicando a via aeróbica de produção de energia, pela falta de aceptor final de elétrons, e ativa a via anaeróbica, através do metabolismo fermentativo (DREW, 1997). A alanina se destaca entre os aminoácidos que se acumulam sob condições anaeróbicas (RICARD et al., 1994), sendo a alanina aminotransferase (AlaAT – EC 2.6.1.2) a enzima envolvida em sua síntese e produção sob déficit de O₂ (ROCHA et al., 2010).

A produção de Ala é importante, pois confere tolerância às plantas sob deficiência de O₂, é um produto do metabolismo que não causa toxidez à planta (DREW, 1997) e fornece um “pool” de reserva de nitrogênio que poderia ser usado para a síntese de aminoácidos, após o retorno à normoxia, pela sua conversão em piruvato por meio da reação de transaminação catalisada pela atividade da enzima alanina aminotransferase (SOUZA e SODEK, 2003; MIYASHITA et al., 2007). Várias vias metabólicas têm sido propostas para explicar o acúmulo de Ala sob condições de deficiência de O₂. A rápida indução da expressão da AlaAT, por ativação de um gene que codifica a enzima alanina aminotransferase, bem como um aumento na atividade da enzima durante inundações, têm sido documentados (GOOD e MUENCH, 1992; ROCHA et al., 2010). As transaminases estão entre as enzimas mais importantes em plantas sob metabolismo anaeróbico, no entanto são enzimas poucos estudadas, com exceção de alguns trabalhos (SOUZA e SODEK, 2003; MIYASHITA et al., 2007; ROCHA et al., 2010).

Em soja, os mecanismos morfofisiológicos de tolerância ao estresse de encharcamento têm sido caracterizados, bem como a existência de variabilidade

genética para a tolerância a esse estresse (PIRES et al., 2002). No entanto ainda são poucas as informações a respeito da atividade de enzimas, especialmente a AlaAT no sistema radicular sob condições de déficit de O₂. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade da enzima AlaAT em raízes de duas cultivares de soja submetidas a diferentes períodos de inundação do sistema radicular.

2 METODOLOGIA

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill) de dois cultivares, Fundacep 53 RR e BRS Macota, ambos de ciclo precoce, fornecidas pela Embrapa Clima Temperado, foram semeadas em vasos de polietileno furados, de três litros e contendo vermiculita média expandida lavada, como substrato. Inicialmente, oito sementes foram semeadas por vaso e após a germinação, no estágio V0 (FEHR et al., 1971), foi realizado o desbaste permanecendo três plântulas/vaso e a inoculação, com *Bradyrhizobium elkanii*, estirpe Semia 587 (FEPAGRO). Esta foi realizada por pipetagem de 2,5 mL de meio líquido de NORIS e DATE (1976) ao redor de cada plântula. As plantas de soja foram nutridas duas vezes por semana com solução de HOAGLAND e ARNON (1938) sem nitrogênio mineral, na proporção de 250 mL/vaso e irrigadas com água sempre que necessário. No estágio R2 (FEHR et al., 1971), o sistema radicular foi submetido à inundação, para isso um segundo vaso, de mesmo modelo e sem perfurações, foi encaixado nos vasos contendo as plantas e inundado com solução nutritiva diluída a 1/3 da concentração original, de forma a se manter uma lâmina de 20 mm sobre a superfície do substrato. O teor de O₂ na solução nutritiva dos vasos inundados foi monitorado diariamente com o auxílio de um oxímetro (Handylab OX1). O material vegetal (1g de raízes) foi coletado no 2º, 4º, 6º e 8º dias após a inundação (DAI) para a dosagem da atividade da enzima AlaAT, baseado em SOUZA e SODEK(2003), com algumas modificações.

As amostras de raízes, previamente coletadas e armazenadas a -86°C, foram maceradas em almofariz com 100mL de nitrogênio líquido e com PVPP a 5% p/pMF, posteriormente foi adicionado tampão extração (Tris – HCl 50mM, pH 7,5 contendo DTT 1mM). Os homogenatos obtidos foram centrifugados a 10.000 x g/20min a ±4°C. Do sobrenadante, uma alíquota de 2,5mL foi dessalinizada por cromatografia de exclusão em coluna de sephadex G-25 médio (PD 10; Amersham Pharmacia Biotech). O extrato dessalinizado foi utilizado para a dosagem da AlaAT através de uma reação acoplada na direção de formação do piruvato ($\text{Ala} + \alpha\text{-KG} \rightarrow \text{Pyr} + \text{Glu}$), a reação de conversão de piruvato (Pyr) em lactato (Lac), através da enzima lactato desidrogenase (LDH), utilizando o NADH como doador de elétrons ($\text{Pyr} + \text{NADH} \rightarrow \text{Lac} + \text{NAD}^+$). Os ensaios foram conduzidos em cubetas de 1,5mL de polimetilmetacrilato, contendo Ala (10mM), α -KG (α -cetogluturato; 5mM), β -NADH (0,2mM), Tris-HCl pH 7,5 (50mM), LDH (5U) e extrato enzimático dessalinizado. As cubetas contendo o meio de reação, foram previamente incubadas em sistema de aquecimento peltier a 30°C por 2 min e a atividade da enzima foi registrada pelo decréscimo de absorbância em 340 nm, em intervalos de 10s, por pelo menos três minutos, em espectrofotômetro de duplo feixe (T80 UV/VIS Spectrometer - PG Instruments) acoplado a um computador.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 x 2 (regime hídrico x período de inundação x genótipos) com três repetições. A unidade experimental consistiu em um vaso com três plantas. Os dados foram submetidos à ANOVA e nos casos significativos as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do programa SAS.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A atividade da alanina aminotransferase (AlaAT) em raízes de soja variou ao longo do período de inundação, sendo observada resposta diferenciada ao déficit de O₂ no sistema radicular entre os dois genótipos. Embora a atividade da AlaAT em raízes de soja da cultivar Fundacep 53 RR tenha sido maior que o controle, não houve diferença significativa entre o regime hídrico e o período de inundação (Figura 1A). A atividade da AlaAT em raízes de BRS Macota mostrou variação ao longo da inundação, sendo estimulada sob hipoxia com o aumento do tempo de inundação e fortemente ativa no período de 8 dias de inundação em relação ao controle (Figura 1B). Os valores de O₂ monitorados ao longo da inundação foram próximos a zero mg L⁻¹ caracterizando a hipoxia (dados não mostrados).

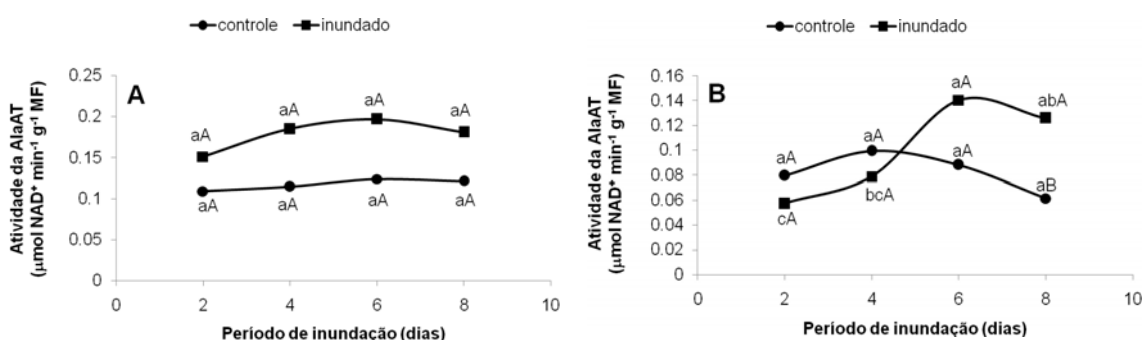


Figura 1. Atividade da alanina aminotransferase (AlaAT) em raízes de soja da cultivar Fundacep 53 RR (A) e BRS Macota (B) submetidas a diferentes períodos de inundação do sistema radicular. Letras minúsculas comparando o período de inundação e letras maiúsculas comparando o regime hídrico (controle e inundado). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Para GOOD e MUENCH (1992) a indução da enzima AlaAT pode capacitar as raízes a aumentar a biossíntese de Ala, que seria importante para a planta com o retorno a normoxia. Para SOUZA e SODEK (2003) a atividade da AlaAT em raízes de soja não-nodulada também foi máxima aos seis dias de inundação, semelhante aos dados do genótipo BRS Macota.

MIYASHITA et al. (2007), com o intuito de identificar o papel da AlaAT na produção da alanina, relacionando sua atividade com a sobrevivência das plantas ao estresse por hipoxia, alteraram a expressão desta enzima através do uso de mutantes para a isoforma AlaAT1 em *Arabidopsis thaliana*. Estes pesquisadores sugeriram que a síntese de alanina independe da atividade da AlaAT, mas que sua atividade é de extrema importância durante o período pós-hipóxico, para a rápida conversão da alanina acumulada em piruvato.

4 CONCLUSÕES

Nas condições em que foram desenvolvidos os experimentos, conclui-se que o déficit de O₂ estimula a atividade da AlaAT em raízes de soja nodulada, a qual é diferenciada entre genótipos, possivelmente resultante de mecanismos adaptativos distintos aos efeitos da hipoxia.

5 AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado ao primeiro autor, ao Convênio Embrapa/Monsanto pelos recursos financeiros e à Fepagro pela estirpe de *Bradyrhizobium*.

6 REFERÊNCIAS

- 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.
- GOOD, A.G., MUENCH, D.G. Purification and characterization of an aerobically induced alanine aminotransferase from barley roots. **Plant Physiol.**, v.99, p. 1520-1525, 1992.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method of growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**. n.347, p. 1- 39, 1938.
- MIYASHITA, Y.; DOLFERUS, R.; ISMOND, K.P.; GOOD, A.G. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanina after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 49, p. 1108–1121, 2007.
- NORRIS, D.O.; DATE, R.A. Legume bacteriology. In: Tropical Pastures Research; Principles and Methods. SHAW, N.H. e BRYAN, W.W. (Eds). **Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, Bull.**, p. 134-174, 1976.
- PIRES, J.L.; SOPRANO, E.; CASSOL, B. Adaptações morfo-fisiológicas da soja em solo inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 37, p.41-50, 2002.
- RICARD, B.; COUÉE, I.; RAYMOND, P.; SAGLIO, P.H.; SAINTt - GES, V.; PRADET, A. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. **Physiology Biochemistry** . v. 32, p. 1-10, 1994.
- ROCHA, M., LICAUSI, F., ARAÚJO, W.L., NUNES-NESI, A., SODEK, L., FERNIE, A.R., DONGEN, J.T.van. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. **Plant Physiol.**, v. 152, p. 1501-1513, 2010.
- SOUSA, C.A.F. DE; SODEK, L. Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. **Experimental Botany**. v.50, p.1-8, 2003.