

ATIVIDADE DA ÁLCOOL DESIDROGENASE E TEORES DE ETANOL EM RAÍZES E NÓDULOS DE SOJA SOB CONDIÇÕES DE HIPOXIA E PÓS-HIPOXIA

**BORELLA, Junior¹; AMARANTE, Luciano²; COLARES, Denise dos Santos²,
EMYGDIO, Beatriz Marti³; BERNARDI, Eduardo⁴**

¹Universidade Federal de Pelotas, PPG Fisiologia Vegetal – borellaj@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, CCQFA – lucianoamarante@yahoo.com.br

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA - Clima Temperado

⁴Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, dos 28 milhões de hectares de solos sujeitos à inundação, 5,4 milhões encontram-se no Rio Grande do Sul. Poucas são as culturas adaptadas a esses ambientes e que apresentam retorno econômico viável, restringindo-se basicamente na cultura de arroz irrigado (SCOTT e NORMAN, 2000).

Nas atuais condições brasileiras, a soja é uma cultura potencialmente viável para ser incorporada nas regiões de várzea, em rotação de culturas, principalmente com o arroz, pois além de ser originária de regiões alagadiças e apresentar variabilidade genética para tolerar o excesso de umidade no solo (THOMAS et al., 2000), apresenta uma cadeia produtiva bem estruturada, com uma ampla rede de pesquisas que assegura soluções rápidas para possíveis problemas associados à cultura, oferece rápido retorno do investimento e é de fácil comercialização. O déficit de O₂ ocasionado pelo excesso de água no solo, constitui o fator limitante à incorporação de culturas em áreas com drenagem deficiente. A maioria das plantas resiste à falta de O₂ por curtos períodos antes de sofrerem danos irreversíveis, devido à inibição da via aeróbica de produção de energia, visto que o O₂ atua comoceptor final de elétrons nesse processo (DREW, 1997). Em detrimento a sua falta, as plantas ativam a via anaeróbica, porém a obtenção de energia é prejudicada, sendo a glicólise a única fonte de produção de ATP (TADEGE et al., 1999).

A ativação do metabolismo fermentativo desencadeia um acúmulo de produtos como o etanol através da oxidação do piruvato proveniente da glicólise, por meio de duas reações subsequentes catalisada pelas enzimas piruvato descarboxilase (PDC) e álcool desidrogenase (ADH) (TADEGE et al., 1999). No entanto, a produção de etanol pela ADH apresenta desvantagens, pois o etanol é volátil e difunde-se rapidamente para fora das células, significando perda considerável de carbono para a planta durante a hipoxia (ROCHA et al., 2010).

Nesse contexto o objetivo do trabalho foi analisar a atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH) e os teores de etanol em raízes e nódulos de soja de duas cultivares de ciclo precoce, submetidas a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

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 (250 mL/vaso) e irrigadas com água sempre que necessário. Ao atingirem o estágio R2 (FEHR et al., 1971) as plantas foram transferidas para um sistema hidropônico contendo solução nutritiva diluída 1/3 da concentração normal, no qual o sistema radicular permaneceu sob borbulhamento de gás N₂ durante 72h (condição de hipoxia), sendo os níveis de O₂ monitorados diariamente com um oxímetro (Handylab OX1). Após esse período, um grupo de plantas foi transferido para vasos com vermiculita por mais 72h (condição pós-hipoxia). Raízes e nódulos foram coletados e armazenados (- 80°C) nos períodos de 24 e 72h de inundação e recuperação.

As amostras de raízes e nódulos, 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 molecular em coluna de sephadex G-25 médio (PD 10; Amersham Pharmacia Biotech). O extrato dessalinizado foi utilizado para a dosagem da ADH (EC 1.1.1.1) no sentido de formação do etanol (acetaldeído→ADH→etanol) em meio de reação de volume de 1,5mL contendo uma alíquota do extrato dessalinizado, β-NADH (0,2mM), tampão de dosagem (Tris-HCl 50mM pH 7,5) e acetaldeído (5mM). O meio de reação em cubetas de polimetilmetacrilato foi incubado em sistema de aquecimento peltier a 30°C. As leituras foram registradas em intervalos de 10s a 340nm com base na oxidação do NADH em espectrofotômetro (T80 UV/VIS Espectrometer – PG Instruments).

O etanol foi extraído por maceração de nódulos e de raízes, na presença de N₂ líquido em almofariz, seguido da adição de 10 mL de ácido perclórico (6%) e centrifugado a 3000g por 20 min a ±4°C. O sobrenadante foi neutralizado com K₂CO₃ (5M), acompanhado da adição prévia de alaranjado de metila (0,5mg 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 min a ±4°C) e pH corrigido para 7, a quantificação de etanol foi determinada pelo registro da redução de NAD⁺ a NADH a 340 nm em espectrofotômetro através de kits de ensaios (Boehringer, Mannheim, Germany) conforme descrito por JOLY e BRANDLE (1995).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro 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 8.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os valores de O₂ monitorados ao longo da inundação foram próximos a zero mg L⁻¹ caracterizando a hipoxia. A atividade da álcool desidrogenase (ADH) e dos teores de etanol em raízes e nódulos de soja variaram ao longo da inundação e

recuperação, sendo observada resposta diferenciada ao déficit de O₂ no sistema radicular entre os dois genótipos.

Em ambos os genótipos a atividade da ADH aumentou significativamente nas 24 e 72h de hipoxia em relação ao controle e decresceu com o retorno a normoxia (24 e 72h de recuperação) (Fig. 1 A e B). Porém as diferenças entre os tratamentos foram mais acentuadas em raízes do que em nódulos e o genótipo Fundacep 53 RR respondeu de forma mais efetiva aos efeitos da inundação, comparado com BRS Macota, restabelecendo a atividade enzimática mais rapidamente aos níveis do controle com a recuperação, principalmente nos tecidos radiculares (Fig. 1A e B).

As variações dos teores de etanol foram semelhantes aquelas observadas para a atividade da ADH. A inundação promoveu aumento significativo dos teores de etanol em 24 e 72h de hipoxia para raízes, ocorrendo ainda, aumento dos teores nas primeiras 24h de recuperação em ambos os genótipos, com a consequente queda dos teores próximos ao nível do controle as 72h de recuperação (Fig. 1C). Em nódulos, os teores de etanol não variaram significativamente durante o tratamento de hipoxia em ambos os genótipos, porém para Fundacep 53RR houve aumento nas primeiras 24h de recuperação com a consequente queda dos teores após 72h, demonstrando a continuidade da via fermentativa alcóolica para obtenção de energia nos primeiros períodos de recuperação (Fig 1D).

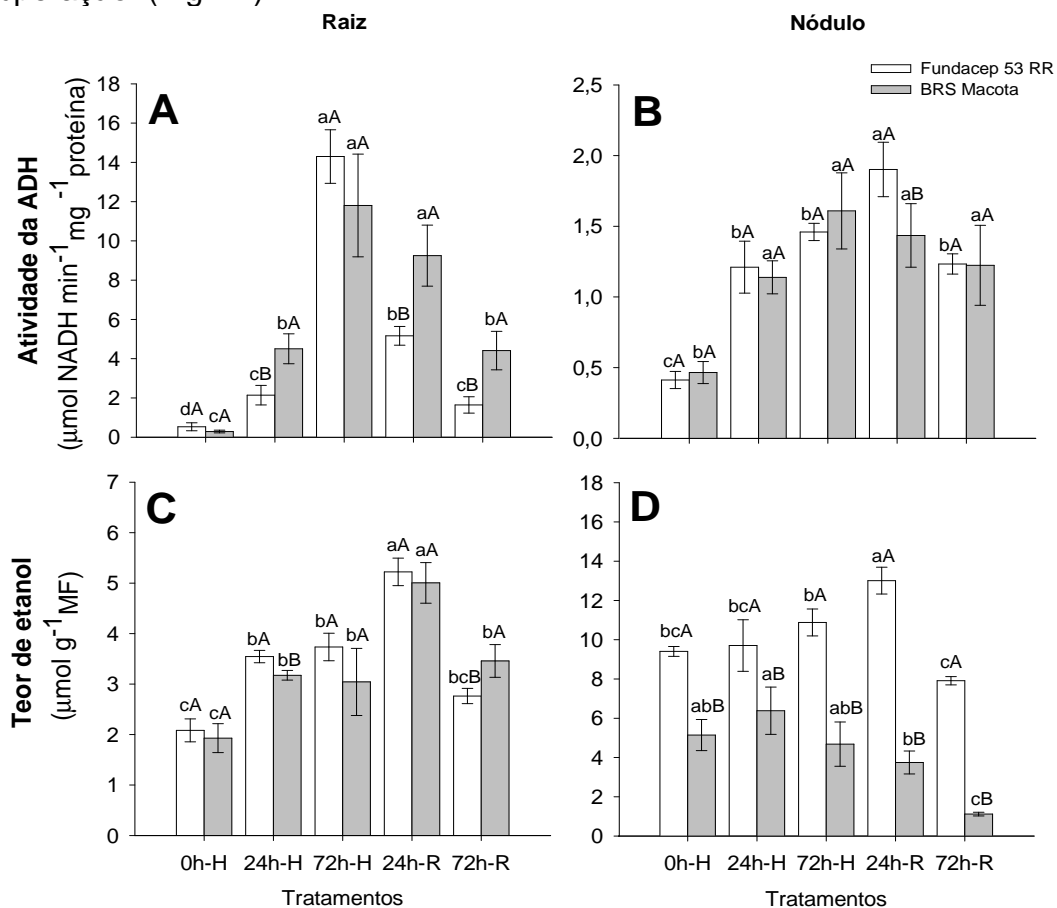


Figura 1. Atividade da álcool desidrogenase (A e B) e teores de etanol (C e D) em raízes e nódulos de soja sob condições de hipoxia (0h-H, 24h-H e 72h-H) e pós-hipoxia (recuperação; 24h-R e 72h-R) após 72h de tratamento hipóxico. Letras minúsculas comparam os tratamentos de inundação e recuperação para cada genótipo separadamente e letras maiúsculas comparam os genótipos para cada tratamento (controle, inundação e recuperação). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Os resultados para os teores de etanol em nódulos demonstraram grande atividade fermentativa nos nódulos em relação às raízes. A pequena variação dos teores desse metabólito durante os períodos de inundação, em relação ao controle, pode estar associada aos maiores danos provocados pelo tratamento hipóxico nos nódulos em relação às raízes, favorecendo sua dissipação ao ambiente, uma vez que esse metabólito, além de volátil, é facilmente difundido pelos tecidos.

4. CONCLUSÕES

A inundação promove aumento significativo da atividade da álcool desidrogenase e dos teores de etanol em raízes e nódulos de soja. O genótipo Fundacep 53 RR responde de forma mais efetiva aos efeitos da inundação, pois retoma, com o retorno das condições de normoxia, a atividade do metabolismo pré-hipóxico mais rapidamente que BRS Macota.

5. AGRADECIMENTOS

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

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.) Merrill. **Crop Science**, v.11, p. 929-931, 1971.
- 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.
- JOLY, C.A.; BRÄNDLE, R. Fermentation and adenylate metabolism of *Hedychium coronarium* J. G. Koenig (Zingiberaceae) and *Asorus calamus* L. (Araceae) under hypoxia and anoxia. **Functional Ecology**, v.9, p. 505-510, 1995.
- 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.
- 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.
- SCOTT, H.D.; NORMAN, R.J. Rice cropping systems of the southern Mississippi Delta Region of the United States. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 1; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 23, 1999, Pelotas. **Palestras...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000, p. 149-154.
- 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.
- 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, 2002.