

ATIVIDADE DA ENZIMA ÁLCOOL DESIDROGENASE E CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS EM RAÍZES DE CULTIVARES DE SOJA SUBMETIDAS À HIPÓXIA

RAFAEL SILVA DA SILVA¹; KASSIA LUIZA TEIXEIRA COCCO²; ANA CLAUDIA BARNECHE DE OLIVEIRA³; SUZANA LEITZKE⁴; JOÃO VICTOR LEMOS DA SILVA⁵; LUCIANO DO AMARANTE⁶

^{1,4,5}UFPel/Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – rafa.silvadasilva@hotmail.com;
suzanaleitzke@outlook.com; joaovictorls97@hotmail.com

^{2,3}Embrapa Clima Temperado – kassiacocco@hotmail.com;
ana.barneche@embrapa.br

⁶UFPel/CCQFA – lucianodoamarante@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merill] é uma cultura de grande importância no Brasil, apresentando uma produção de aproximadamente 119 milhões de toneladas em uma área de cerca de 35 milhões de hectares, sendo que destes, o Estado do Rio Grande do Sul contribui com 5,71 milhões de hectares (CONAB, 2018). Porém, um dos fatores que limitam a expansão da área de produção do grão no Estado é a composição de parte dos solos agricultáveis, que possuem características hidromórficas, tornando-os sujeitos à inundação. Nessas condições, ocorre a redução do suprimento de oxigênio (O_2) para as raízes, levando ao desvio do metabolismo aeróbico para o anaeróbico, o que diminui o saldo de ATP devido ao bloqueio da fosforilação oxidativa, afetando assim o crescimento e desenvolvimento da cultura (LIMAMI et al., 2014). Para manter a glicólise sob hipóxia, as enzimas fermentativas são rapidamente ativadas para regenerar continuamente o NAD^+ (VAN DONGEN; LICAUSI, 2015), sendo a álcool desidrogenase (ADH) a principal enzima envolvida neste processo. Outro aspecto importante na superação do estresse hipóxico pelas plantas diz respeito ao suprimento e regulação do metabolismo de carboidratos, podendo resultar no acúmulo de açúcares (SAIRAM et al., 2009) e amido (BARTA, 1987). Portanto, espécies ou genótipos que apresentam maiores concentrações de carboidratos nas raízes e um metabolismo fermentativo eficiente apresentam maior tolerância para enfrentar a privação de O_2 .

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da enzima ADH e as alterações nos conteúdos de açúcares solúveis totais (AST) e amido em raízes de duas cultivares de soja submetidas a dois períodos de hipóxia e um de recuperação.

2. METODOLOGIA

O experimento foi conduzido com duas cultivares comerciais de soja: BRS 246 RR e NA 5909 RG, cultivadas em condições de campo, na Estação Experimental Terras Baixas, da Embrapa Clima Temperado, localizada no município de Capão do Leão/RS.

Os tratamentos consistiram em estresse (hipóxia e recuperação pós-hipóxia) e controle. O tratamento de hipóxia foi iniciado a partir do estádio fenológico V6 por meio da manutenção de lâmina de água de 5 cm acima da superfície do solo, sendo avaliado pela coleta do material vegetal nos períodos de um e cinco dias após a formação da lâmina de água. O tratamento de recuperação foi iniciado pela drenagem da área e avaliado aos sete dias. No tratamento controle, as plantas

foram cultivadas em solo com umidade mantida na capacidade de campo. Cada tratamento foi composto por quatro repetições, e cada uma destas, constituída por uma parcela de campo de 2,0 x 5,0m, com espaçamento de 0,4m entre linhas.

A atividade da enzima ADH foi quantificada a partir de extratos de raízes obtidos pela maceração dos tecidos com N₂ e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 5% (p/p MF), homogeneização em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5 contendo ditiotreitol (DTT) 1mM, seguido de centrifugação a 12.000g por 20min a 4°C e dessalinização do sobrenadante em coluna de cromatografia de exclusão molecular PD10 – Sephadex G-25 M. O extrato dessalinizado foi utilizado como fonte da enzima em meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,0 e NADH 0,2mM, sendo a reação iniciada pela adição de acetaldeído 5mM ao meio, e monitorada em espectrofotômetro pela queda da absorbância a 340nm, a uma temperatura de 30°C (HANSON et al., 1984).

A extração de carboidratos (AST e amido) foi realizada conforme metodologia de Bielecki e Turner (1966) com modificações, utilizando-se como solvente extrator MCW (metanol:clorofórmio:água), na proporção 12:5:3. Os AST foram dosados na fase aquosa do extrato “MCW” após separação de fases pela adição de clorofórmio. O amido foi extraído pela ressuspensão do precipitado em ácido tricloroacético 10% p/v e hidrolisado com ácido perclórico 30% p/v para posterior quantificação dos açúcares resultantes de sua digestão (McCREADY et al., 1950). As dosagens de AST e amido foram realizadas com base na metodologia de Graham e Smydzuk (1965), utilizando-se solução de antrona (0,15% p/v em ácido sulfúrico concentrado) e leituras das densidades ópticas das amostras e padrões (glicose em concentrações variando de 10 a 100 µg de glicose/mL) a 620nm. Para a quantificação do amido os valores obtidos foram multiplicados pelo fator de correção 0,9, segundo McCready et al. (1950).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 (tratamentos x períodos de exposição). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, quando significativos pelo Teste F, foram comparados pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A deficiência de O₂ refletiu no aumento significativo da atividade da enzima ADH em ambos os genótipos, sendo os maiores valores observados aos cinco dias de hipóxia. A atividade também permaneceu superior ao controle mesmo após sete dias de recuperação, embora inferior aos valores encontrados aos cinco dias de hipóxia. Essa resposta foi bem mais expressiva em BRS 246 RR (Figura 1). Os resultados obtidos estão de acordo com Borella et al. (2014) que constataram que a atividade da ADH em raízes de soja sob hipóxia aumenta ao longo do período de inundação.

Durante a hipóxia, a concentração de AST em raízes da cultivar BRS 246 RR foi superior no primeiro dia de exposição, apresentando redução significativa aos cinco dias, quando igualou-se ao controle. Com o retorno às condições de normoxia, observou-se novo aumento na concentração de AST, superando os níveis encontrados nas plantas controle. Em NA 5909 RG, o conteúdo de AST em raízes foi superior nas plantas sob hipóxia, mantendo teores semelhantes durante o período avaliado. Aos sete dias de recuperação houve redução, porém a valores ainda superiores ao controle (Figura 2). Badinelli (2009) também verificou que a deficiência de O₂ refletiu em aumento da produção de AST em raízes de soja. O

acúmulo de açúcares solúveis em raízes de plantas sob alagamento é descrito como forma de tolerância aos efeitos da hipóxia (LIAO; LIN, 2001).

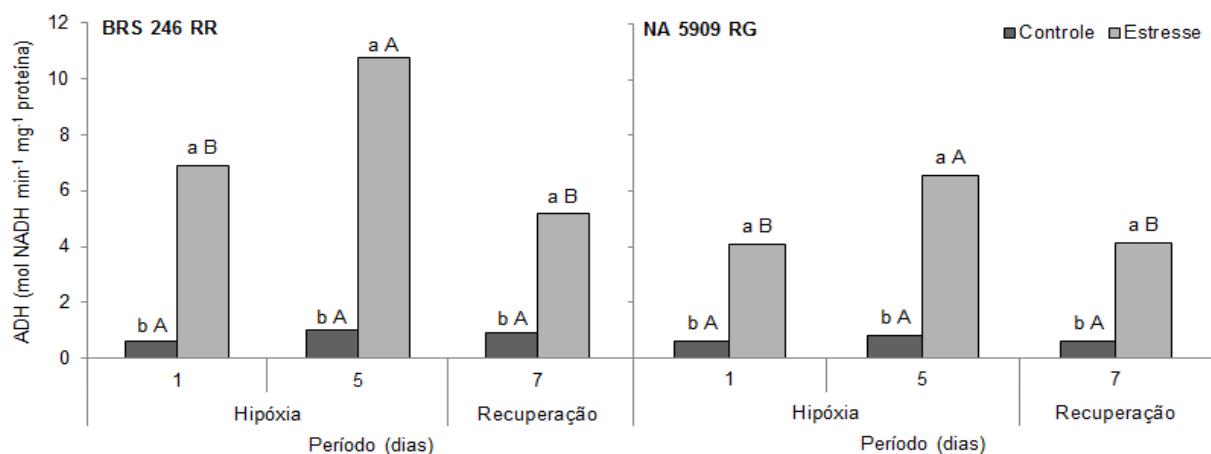


Figura 1. Atividade específica da enzima ADH em raízes de duas cultivares de soja expostas a dois períodos de hipóxia e um de recuperação. Letras minúsculas comparam os tratamentos em cada período e letras maiúsculas comparam períodos dentro de cada tratamento.

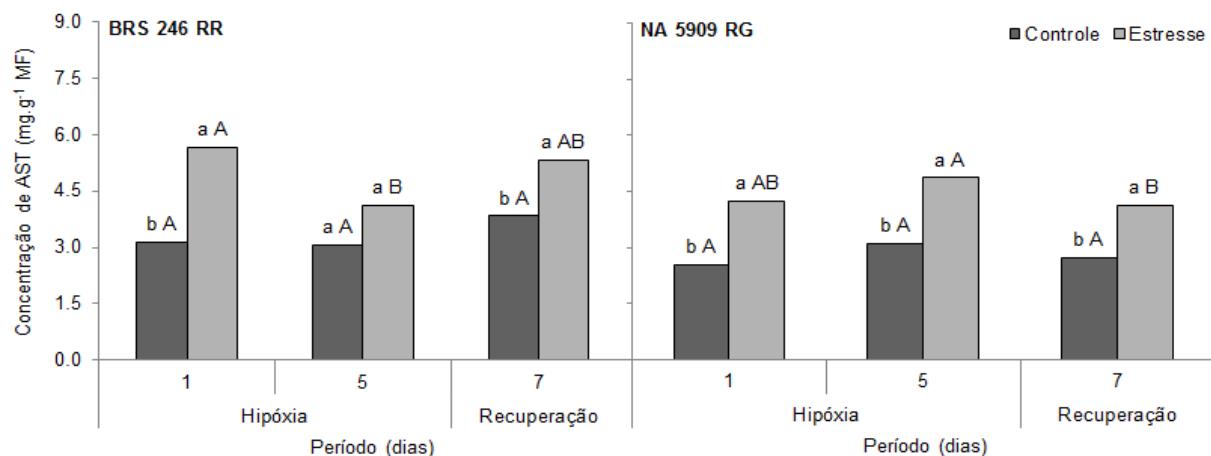


Figura 2. Concentração de AST em raízes de duas cultivares de soja expostas a dois períodos de hipóxia e um de recuperação. Letras minúsculas comparam os tratamentos em cada período e letras maiúsculas comparam períodos dentro de cada tratamento.

Para a cultivar BRS 246 RR, houve um aumento significativo nos teores de amido em raízes conforme o avanço do período de hipóxia, reduzindo aos níveis do controle com o retorno à normoxia, aos sete dias de recuperação (Figura 3). Em raízes da cultivar NA 5909 RG, os teores de amido mantiveram-se equivalentes aos das plantas controle durante o período de hipóxia e de recuperação.

A diminuição da concentração de AST e o aumento dos conteúdos de amido com um e cinco dias de hipóxia na cultivar BRS 246 RR, associado ao aumento de atividade da ADH, pode indicar um aumento no fluxo de carboidratos provenientes da parte aérea, como forma de suprir esta demanda nas raízes, visto que o aumento da atividade da ADH é resultado de uma maior atividade glicolítica (consumo de açúcares).

Por outro lado, na cultivar NA 5909 RG o aumento da atividade da enzima ADH durante o avanço do período de hipóxia foi menor do que na cultivar BRS 246

RR, o que sugere uma atividade fermentativa menor, resultando em menor consumo de AST e de amido, o que poderia indicar um mecanismo diferenciado desse genótipo em relação à BRS 246 RR.

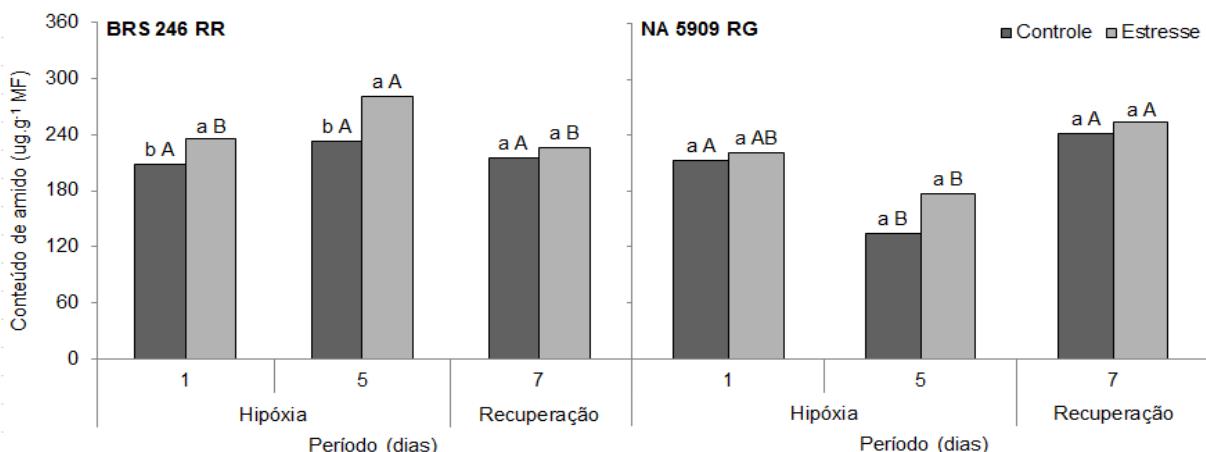


Figura 3. Conteúdo de amido em raízes de duas cultivares de soja expostas a períodos de hipóxia e recuperação. Letras minúsculas comparam os tratamentos em cada período, e letras maiúsculas comparam períodos dentro de cada tratamento.

4. CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que a cultivar BRS 246 RR apresenta um mecanismo de tolerância distinto da NA 5909 RG em relação aos ajustes do metabolismo de carboidratos durante o período de hipóxia. Embora a maior resposta em relação à atividade de ADH na condição de hipóxia pareça conferir vantagem adaptativa à cultivar BRS 246 RR em relação à NA 5909 RG, estudos mais aprofundados deverão ser realizados com a finalidade de se compreender melhor os ajustes metabólicos que conferem tolerância à deficiência de O₂.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BADINELLI, P. G. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, 2008, 100p.
- BARTA, A.L. **Plant Cell and Environmental**, v. 10, p. 151-156, 1987.
- BIELESKI, R.L.; TURNER, N.A. **Analytical Biochemistry**, v.17, p. 278- 293, 1966.
- BORELLA, J.; AMARANTE, L.; OLIVEIRA, D.S.C., OLIVEIRA, A.C.B., BRAGA, E.J. B. **Scientia Agricola**, v.71, n.6, p.499-508, 2014.
- CONAB., v. 5, safra 2017/18, nº 11 – 11º levantamento, agosto 2018.
- GRAHAM, D.; SMYDZUC, J. **Analytical Biochemistry**, v. 11, p. 246-255, 1965.
- HANSON, A.D.; JACOBSEN, J.V.; ZWAR, J.A. **Plant Physiology**, v.75, p.573-581, 1984.
- LIAO, C.T.; LIN, C.H. **Proceedings National Science Council**, v.25, p.148-157, 2001.
- LIMAMI, A.M.; DIAB, H.; LOTHIER, J. **Planta**, e. 239, p. 531–541, 2014.
- MCREADY, R.M.; GUGGOLS, J.; SILVEIRA, V.; OWENS, H.S. **Analytical Chemistry**, v. 22, p. 1156-1158, 1950.
- SAIRAM, R. K.; KUMUTHA, D.; VISWANATHAN, C.; RAMESH, C.M. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 602-616, 2009.
- VAN DONGEN, J.T.; LICAUSI, F. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, 2015.