

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

**Metabolismo fermentativo em raízes e nódulos de soja sob
condições de hipoxia e pós-hipoxia**

Junior Borella

Pelotas, 2011

Junior Borella

Metabolismo fermentativo em raízes e nódulos de soja sob condições de hipoxia e pós-hipoxia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dario Munt de Moraes

Co-orientadores: Dr. Luciano do Amarante
Dr.^a Denise dos Santos Colares de Oliveira

PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Outubro de 2011

Catlogação na publicação:
Maria Fernanda Monte Borges
CRB10/1011

B731m Borella, Junior

Metabolismo fermentativo em raízes e nódulos de soja sob condições de hipoxia e pós-hipoxia / Junior Borella ; orientador : Dario Munt de Moraes ; co-orientadores : Luciano do Amarante, Denise dos Santos Colares. - Pelotas, 2011.

61 f.

Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Departamento de Botânica. Universidade Federal de Pelotas.

1. *Glycine max*. 2. Alagamento. 3. Deficit de oxigênio. 4. Enzimas fermentativas. 5. Metabólitos. I. Moraes, Dario Munt de, orient. II. Amarante, Luciano do, co-orient. III. Colares, Denise dos Santos, co-orient. IV. Título.

CDD 581.1
633.34

Junior Borella

Metabolismo fermentativo em raízes e nódulos de soja sob condições de hipoxia e pós-hipoxia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Márcio Paim Mariot

Pesq. Dr^a Ana Cláudia Barneche de Oliveira

Prof. Dr. Luciano do Amarante
(Co-orientador)

Aos meus pais,

Caitano e Elenir

Dedico.

E a minha irmã,

Juliane

Ofereço.

"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano."

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

A Deus, independente de crença ou religião, por mostrar através da vida, dos fatos e das pessoas, que enquanto existe luta e vontade de vencer também existem grandes vitórias.

Ao orientador Prof. Dr. Luciano do Amarante pela amizade, confiança, incentivo, orientação, ética, profissionalismo e pelo exemplo de humildade. Minha gratidão e respeito.

Aos meus pais Caitano e Elenir e a minha irmã Juliane, por estarem ao meu lado em todos os momentos difíceis da vida, pela dedicação, carinho e apoio incondicional. Hoje, venço mais uma etapa, vejo que tudo somente foi possível por ter vocês junto a mim.

Aos meus amigos, colegas e doutorandos Tiago e Emanuela pela amizade, confiança, incentivo, apoio, conselhos, ética e profissionalismo. Hoje venço mais uma etapa, e vocês fizeram muito para que ela se tornasse possível. Minha gratidão!

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (PPGFV) por tornar possível a realização deste sonho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao convênio Embrapa/Monsanto por disponibilizar os recursos para o desenvolvimento do projeto.

A prof. Dr.^a Denise Colares, co-orientadora. Pela amizade, orientação, ética e profissionalismo.

À banca examinadora, Dr. Márcio e Dr^a Ana Claudia pela contribuição.

A todos os professores do PPGFV pelo valioso ensinamento.

Ao meu amigo e colega de laboratório Marcel, pela amizade, convivência, ética e profissionalismo. Por tudo que aprendi nesse período, “Grande pessoa”!

A minha amiga, colega e doutoranda Milene “tampinha”, pela amizade, conselhos, carinho, aprendizado e boas risadas.

Ao Prof. Dr. Marcos A. Bacarin por disponibilizarem a estrutura do Laboratório de Metabolismo Vegetal para a realização de algumas análises.

Aos amigos e colegas de mestrado do PPG em Fisiologia Vegetal, pela amizade e ensinamentos.

Às amigas e colegas Daniela, Letícia e Cristina, pela amizade, carinho, incentivo, estudos, conversas e momentos de descontração.

As amigas e Dr^{as}. Cristina e Caroline, pela amizade, carinho, colaboração e principalmente incentivo.

À secretária do PPGFV, Sandra “Ester”, pelo carinho, atenção e momentos de descontração.

À Adriana e à Renata do PPG em Agronomia - Fitomelhoramento, pela ajuda.

E por fim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

Muito Obrigado !!

RESUMO

BORELLA, Junior. **Metabolismo fermentativo em raízes e nódulos de soja sob condições de hipoxia e pós-hipoxia**. 2011. 61f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O metabolismo das plantas reage sensivelmente às mudanças de disponibilidade de oxigênio impostas pelo alagamento. Uma das consequências imediatas da depleção do oxigênio é a ativação do metabolismo anaeróbico e uma redução significativa na produção de energia. Este trabalho teve por objetivo avaliar o metabolismo fermentativo em raízes e nódulos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] sob condições de hipoxia e pós-hipoxia. Para isso dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação com os genótipos Fundacep 53 RR e BRS Macota, cultivados em vasos de 3L contendo vermiculita como substrato, em associação com *Bradyrhizobium elkanii*. Os tratamentos foram aplicados quando as plantas atingiram o estágio R2 (reprodutivo). Experimento I - o sistema radicular da soja foi submetido à hipoxia pelo encaixe de um segundo vaso sem perfurações 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. A inundação das plantas foi conduzida por 8 dias, após este período foi retirado os vasos sem perfurações para avaliação da recuperação. O material vegetal foi coletado no 2º, 4º, 6º e 8º dia após a inundação (DAI) ou recuperação (DAR), juntamente com seus respectivos controles (mantidos em normoxia) para a dosagem da atividade das enzimas fermentativas, álcool desidrogenase (ADH), piruvato descarboxilase (PDC) e lactato desidrogenase (LDH) em raízes e nódulos. Experimento II - as plantas foram transferidas para um sistema hidropônico e submetidas à hipoxia do sistema radicular pelo borbulhamento de N₂ gasoso por 24 e 72 h ou mantidas em vermiculita (controle). Posteriormente retornaram para vermiculita sob condições de normoxia por 24 e 72 h. Foram avaliadas a atividade das enzimas ADH, PDC e LDH, metabólitos anaeróbicos (etanol, lactato e piruvato) e conteúdo de carboidratos (sacarose, açúcares solúveis totais, amido e polissacarídeos solúveis em água) em raízes e nódulos. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. No experimento I a inundação promoveu aumento significativo da atividade da ADH, PDC e LDH, bem como a diminuição da atividade com a recuperação em raízes e nódulos. Fundacep 53 RR respondeu de forma mais efetiva aos tratamentos. No experimento II, a atividade das enzimas ADH, PDC e LDH, bem como os teores de etanol e lactato, aumentaram com a hipoxia em raízes

e nódulos e retornaram aos níveis pré-hipóxicos com a recuperação em ambos os genótipos. O teor de piruvato aumentou nos nódulos e diminuiu nas raízes e os teores de açúcares e sacarose aumentaram nas raízes e diminuíram nos nódulos em hipoxia para ambos os genótipos. Fundacep 53 RR foi mais responsiva aos efeitos provocados pela hipoxia e pós-hipoxia que BRS Macota. Os efeitos foram mais pronunciados nas plantas submetidas à hipoxia pelo sistema hidropônico em função da rápida depleção do oxigênio na solução.

Palavras-chave: *Glycine max*, alagamento, déficit de oxigênio, enzimas fermentativas, metabólitos.

ABSTRACT

BORELLA, Junior. **Fermentative metabolism in soybean roots and nodules under hypoxia and post-hypoxia conditions**. 2011. 61f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Plant metabolism is sensitively to changes in oxygen availability by waterlogging. The immediate consequences of oxygen depletion are the activation of anaerobic metabolism and a reduction in energy production. This study aimed to evaluate the fermentative metabolism in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] roots and nodules under hypoxia and post-hypoxia conditions. Two experiments were conducted in greenhouse conditions with soybean genotypes Fundacep 53 RR and BRS Macota grown in 3L pots containing vermiculite as substrate, in association with *Bradyrhizobium elkanii*. The treatments were applied when the plants reached the R2 stage (reproductive). Experiment I - the root system of plants was subjected to hypoxia by fitting a second pot without holes and flooded with nutrient solution diluted to one-third of the original, in order to keep a blade of 20 mm on the surface of the substrate. Plants were maintained flooded for eight days, and so the pot without drilling holes was removed for recovery assessment. Non-waterlogging plants were maintained as control (normoxic condition). The activities of fermentation enzymes, alcohol dehydrogenase (ADH), pyruvate decarboxylase (PDC) and lactate dehydrogenase (LDH) were quantified in roots and nodules collected at 2, 4, 6 and 8 days after flooding or recovery. Experiment II - soybean plants were transferred to a hydroponic system and roots were subjected to hypoxia by flowing N₂ gas during 24 and 72 h. For recovery, plants returned to vermiculite for 24 and 72 h. A control group of plants was maintained in vermiculite. The enzymatic activities of ADH, PDC and LDH, levels of anaerobic metabolites (ethanol, lactate and pyruvate) and carbohydrate content (sucrose, soluble sugars, starch and water soluble polysaccharides) were quantified in roots and nodules. The experiments were completely randomized with four replications and data were analyzed by ANOVA and compared by the Tukey test ($P \leq 0.05$). Experiment I - activities of ADH, PDC and LDH increased significantly in roots and nodules of flooded plants and decreased during recovery. Fundacep 53 RR responded more effectively to treatments effects. Experiment II - the activity of ADH, PDC and LDH enzymes, as well as the content of ethanol and lactate, increased with hypoxia in roots and nodules, and returned to pre-hypoxic levels with the recovery in both genotypes. The pyruvate content increased in nodules and decreased in roots, sugars and sucrose levels increased in roots and decreased in nodules under hypoxia for both genotypes. Fundacep RR 53

was more responsive to the effects caused by hypoxia and post-hypoxia than BRS Macota. The effects were more pronounced in plants subjected to hypoxia by hydroponic system due to the rapid depletion of oxygen in the solution.

Keywords: *Glycine max*, waterlogging, oxygen deficiency, fermentative enzymes, metabolites.

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Material vegetal e condições de cultivo	20
3.2 Determinações analíticas	21
3.2.1 Atividade enzimática	21
3.2.2 Conteúdo de metabólitos anaeróbicos.....	22
3.2.3 Conteúdo de carboidratos.....	22
3.3 Delineamento experimental e análise estatística	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Experimento I	25
4.2 Experimento II	33
4.2.1 Atividade enzimática	34
4.2.2 Teores de metabólitos anaeróbicos	37
4.2.3 Teores de carboidratos	40
5. DISCUSSÃO	44
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
ANEXO	59

1. INTRODUÇÃO

O alagamento do solo é um estresse abiótico relativamente comum nas áreas cultivadas do planeta e influencia a composição e produtividade de inúmeras espécies vegetais (JACKSON; COLMER, 2005). Em solos alagados, a queda da disponibilidade de oxigênio é o principal fator de estresse, levando a uma cascata de sinalização que desencadeia uma série de alterações metabólicas (HORCHANI et al., 2009). A inundação impede as trocas gasosas entre o sistema radicular e o espaço poroso do solo, pois a resistência de difusão de muitos gases é aproximadamente 1.000 vezes maior na água que no ar (ARMSTRONG et al., 1994; VAN DONGEN et al, 2003; ZABALZA et al, 2009).

Uma das consequências imediatas da depleção de oxigênio é a ativação do metabolismo anaeróbico e uma redução significativa na produção de energia, que passa ser obtida principalmente pela via glicolítica em detrimento à fosforilação oxidativa (TADEGE et al., 1999; HORCHANI et al., 2009; ZABALZA et al., 2009). A sobrevivência das plantas nessas condições passa a depender quase exclusivamente do metabolismo anaeróbico.

Com a falta de O_2 como aceptor final de elétrons, ocorre o acúmulo de intermediários do ciclo de Krebs, diminuição da disponibilidade de $NAD(P)^+$, acúmulo de piruvato e alterações nos níveis de ATP, que atuam como sinal para posteriores respostas adaptativas (HORCHANI et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009). Essas respostas adaptativas são conhecidas como síndrome do baixo escape de oxigênio (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008), entre elas mudanças morfológicas e anatômicas, como a formação de aerênquima, raízes adventícias (CRAWFORD; BRAENDLE, 1996; YIN et al., 2010), alongamento do caule (ARMSTRONG et al., 1994; FUKAO; BAILEY-SERRES, 2004) e formação de um filme de gás no entorno das folhas (PEDERSEN et al., 2009).

Gradientes de oxigênio têm sido observadas em tecidos de várias estruturas das plantas como raízes, nódulos, caules, sementes ou tubérculos (ARMSTRONG et al, 1994.; GEIGENBERGER et al., 2000; VAN DONGEN et al., 2003; ZABALZA et al., 2009) demonstrando que durante o desenvolvimento das plantas e,

principalmente sob condições de hipoxia, as concentrações de oxigênio podem variar, dependendo da atividade do metabolismo do tecido (VAN DONGEN et al., 2003; FUKAO; BAILEY-SERRES; 2004; BENAMAR et al., 2008). Portanto, as respostas metabólicas ao déficit de oxigênio estão diretamente envolvidas na otimização do status de energia, consumindo o mínimo possível de oxigênio (VAN DONGEN et al., 2011).

Nessas condições, a síntese de muitas proteínas da célula é suprimida enquanto que a síntese de um grupo específico de proteínas aumenta (SACHS et al., 1980; ZABALZA et al., 2009; CHRISTIANSON et al., 2010). Incluídas neste grupo estão enzimas de duas vias importantes; a primeira utiliza o piruvato como substrato para produzir lactato pela ação da lactato desidrogenase (LDH) e a segunda produz etanol através de duas reações subsequentes catalisada pela piruvato descarboxilase (PDC) e álcool desidrogenase (ADH) (TADEGE et al., 1999; ZABALZA et al., 2009). No entanto, estas duas vias têm desvantagens claras: lactato é tóxico para as células e etanol se difunde rapidamente para fora das células, o que leva a uma perda considerável de carbono durante a hipoxia (ROCHA et al., 2010a).

Embora a atividade conjunta da glicólise e fermentação permitam apenas a síntese limitada de ATP, pela fosforilação ao nível de substrato com produção de ATP de 36 para 2 moles por mol de glicose metabolizada (DENNIS et al., 1992; SOUSA; SODEK, 2002; SAÍRAM et al., 2009), estas vias regeneram NAD^+ e removem o excesso de prótons (ARMSTRONG et al., 1994, RICARD et al., 1994; DREW, 1997; SOUSA; SODEK, 2002).

Algumas pesquisas sugerem o acúmulo de compostos pela diminuição na taxa de crescimento (BARRET-LENNARD et al., 1988; EVANS, 2003) e pela diminuição da taxa de respiração (HUANG e JOHNSON, 1995), como aumento dos teores de carboidratos, como açúcares e sacarose nas raízes e principalmente na parte aérea, quando submetidas ao estresse hipóxico, mesmo havendo diminuição na taxa fotossintética (SAIRAM et al., 2009).

Em plantas sob condições normais de oxigenação, as vias do metabolismo fermentativo estão ausentes ou com atividade bastante reduzida, mas são rapidamente induzidas em baixa concentração de O_2 , o que sugere um papel no mecanismo de sobrevivência das plantas, embora não se conheça qual a extensão

da contribuição e como elas se relacionam em baixo teor de O₂ (DENNIS et al., 2000).

Soja 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 (THOMAS et al., 2000). Muitos estudos têm sido realizados para elucidar os efeitos do déficit de oxigênio em plantas, no entanto, poucos trabalhos são relacionados com plantas noduladas, especialmente em soja. Nesse contexto, visando melhor entender os efeitos ocasionados pela depleção de oxigênio no sistema radicular, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o metabolismo anaeróbico através de alterações no metabolismo fermentativo e alocação de carboidratos em raízes e nódulos de dois genótipos soja sob condições de hipoxia e pós-hipoxia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O alagamento é um fator ambiental relativamente comum nas áreas cultivadas do planeta, gerando dificuldades para a produção agrícola e florestal (JACKSON; COLMER, 2005; KUMUTHA et al., 2008). A América do Sul possui vários ambientes sujeitos a inundações, como florestas de galeria, o Pantanal e os chamados solos de várzea resultantes de um alagamento periódico na época das chuvas ou em cheias de rios (ANDRADE et al., 1999). No Brasil, aproximadamente 28 milhões de hectares de solos estão sujeitos ao encharcamento (solos aluviais e hidromórficos), parte encontra-se na região dos Cerrados e parte na região Sul do Brasil (VITORINO et al., 2001; MAGALHÃES et al., 2005). Cerca de 5,4 milhões de hectares situam-se no Estado do Rio Grande do Sul e poderiam ser incorporados ao processo produtivo (SCOTT e NORMAN, 2000).

Uma forma de aumentar a eficiência do sistema produtivo brasileiro é diversificar as espécies cultivadas nas áreas de várzea (sujeitas ao alagamento), como a incorporação de culturas de milho e de soja em rotação com o arroz irrigado, práticas que estão sendo desenvolvidas nos EUA (SCOTT e NORMAN, 2000).

O Brasil é um dos maiores produtores de soja do mundo (SCOTT e NORMAN, 2000). Além da importância econômica mundial, a soja é uma leguminosa que oferece proteínas de alta qualidade (BALESTRASSE et al., 2001). 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. Uma vez que, 90% do óleo vegetal produzido no Brasil é de soja, embora seja a oleaginosa com menor teor de óleo por unidade de peso, sua produção está atrelada à demanda, sempre crescente, por farelo proteico, principal matéria prima da ração animal.

A soja também apresenta uma cadeia produtiva bem estruturada, com uma ampla rede de pesquisa que assegura soluções rápidas para possíveis problemas associados à cultura, oferece rápido retorno do investimento e é de fácil comercialização (OLIVEIRA; REYS, 2009). Embora seja uma cultura amplamente

difundida, o seu cultivo em solos sujeitos ao alagamento de forma a possibilitar retorno econômico, depende da existência de cultivares tolerantes ao excesso de água no solo. Por ser espécie originária de áreas alagadiças do norte da China (EVANS, 1996), apresenta variabilidade genética para tolerar o excesso de umidade no solo (THOMAS et al., 2000).

Os vegetais superiores necessitam de grande demanda de O_2 para manter o metabolismo e o crescimento. Em condições de campo, é comum ocorrer deficiência de oxigênio no sistema radicular das plantas (KENNEDY et al., 1992; PEDERSEN et al., 2006.; VOESENEK et al., 2006) e na maioria das plantas cultivadas durante o seu ciclo (JACKSON et al., 1982), pois mesmo solos bem drenados tornam-se encharcados por curtos períodos, depois de fortes chuvas, submetendo as raízes a ambientes hipóxicos (ARMSTRONG et al., 1994; COLMER, 2003; FUKAO; BAILEY-SERRES, 2004; THOMAS et al., 2005; BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008; PEDERSEN et al., 2009).

A limitação de oxigênio afeta negativamente o desempenho da planta (GEIGENBERGER, 2003; BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008; HORCHANI et al., 2009), principalmente das raízes que requerem suficiente fornecimento para atingirem as suas funções plenamente (VAN DONGEN et al., 2003; ARMSTRONG et al., 2009; ZABALZA et al., 2009). As plantas respondem ao estresse por déficit de O_2 ativando a via de metabolismo anaeróbico (SACHS et al., 1980), desencadeando várias mudanças metabólicas, dentre as quais, a obtenção de energia passa a ser principalmente pela via glicolítica em detrimento à fosforilação oxidativa (TADEGE et al., 1999; KUMUTHA et al., 2008; HORCHANI et al., 2009; ZABALZA et al., 2009). A glicólise produz dois ATP e duas moléculas de piruvato por unidade de hexose (DENNIS et al., 1992; SOUSA; SODEK, 2002; SAIRAM et al., 2009), enquanto concomitantemente, ocorre a redução do NAD^+ para NADH. A fim de manter a glicólise sob condições anóxicas, o NAD^+ precisa ser continuamente regenerado a partir de NADH via reações fermentativas (Esquema 1) (ARMSTRONG et al., 1994; RICARD et al., 1994; DREW, 1997; TADEGE et al., 1999; SOUSA; SODEK, 2002).

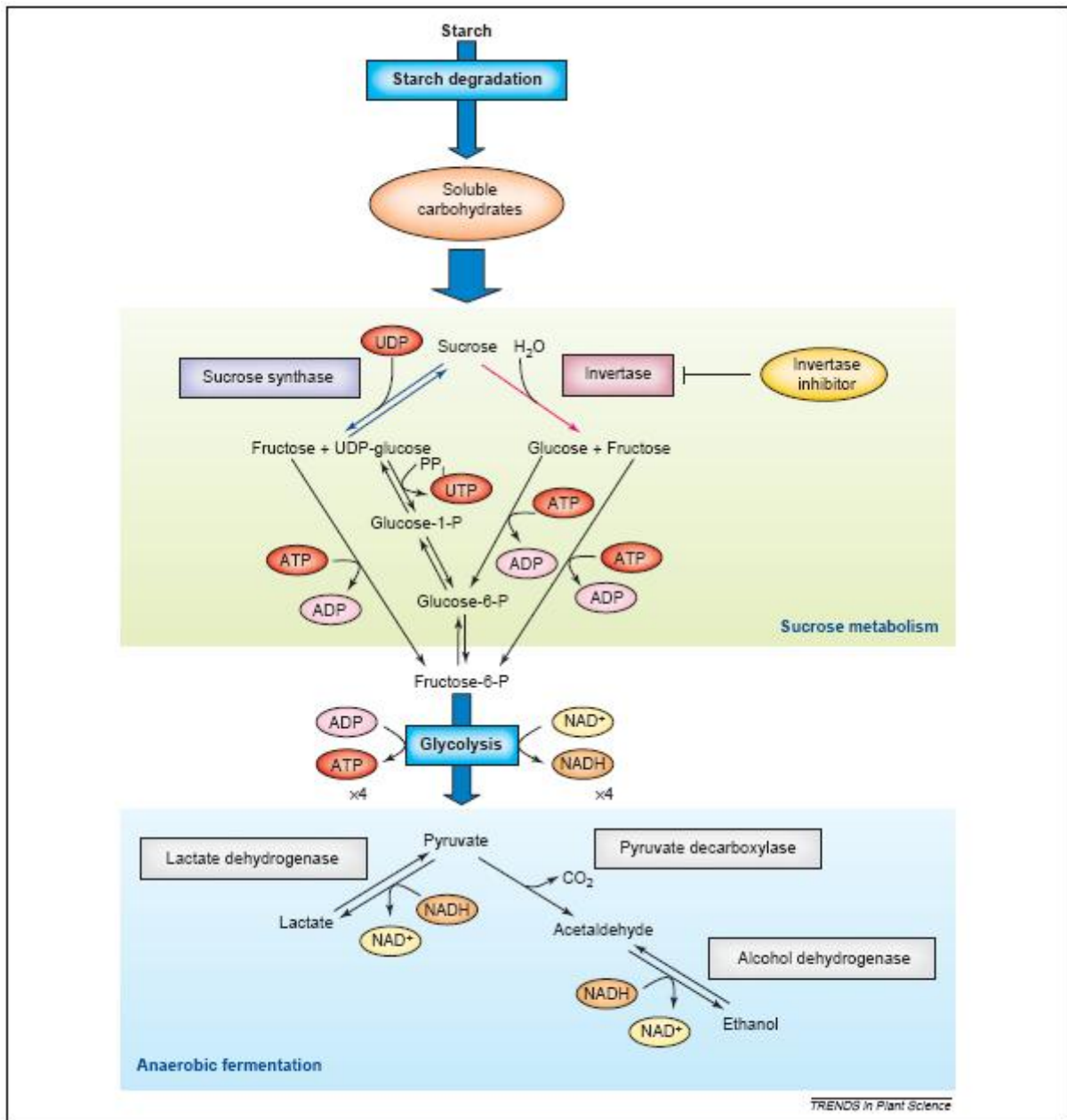
Em soja, o alagamento do sistema radicular provocou amarelecimento e abscisão das folhas dos nós inferiores, diminuição no crescimento, na fotossíntese e no rendimento de grãos (SCOTT et al., 1989). O suprimento de carboidratos e a regulação do metabolismo de carboidratos e de energia, são importantes na superação do estresse hipóxico (ANDREEV et al., 1991; KUMUTHA et al., 2008), e

muitas plantas acumulam açúcares (SAIRAM et al., 2009), aminoácidos (FAN et al., 1988; ROCHA et al., 2010a; SHINGAKI-WELLS et al., 2011) e reservas como amido (BARTA, 1987), quando submetidas a deficiência de O₂.

Algumas pesquisas sugerem que o acúmulo desses compostos se deve pela diminuição na taxa de crescimento (BARRET-LENNARD et al., 1988; EVANS et al., 2003) e pela diminuição da taxa de respiração (HUANG e JOHNSON, 1995). O aumento dos teores de carboidratos, como açúcares, nas raízes e principalmente na parte aérea, ocorre quando as raízes são submetidas ao estresse hipóxico, mesmo havendo diminuição na taxa fotossintética (SAIRAM et al., 2009).

A ativação do metabolismo fermentativo desencadeia um acúmulo de produtos, como o etanol, lactato e alanina (Ala) principalmente (FAN et al., 1997; SOUZA; SODEK, 2002; ROCHA et al., 2010a), derivados do piruvato, produto final da glicólise (DREW, 1997).

Usando o piruvato como substrato, o metabolismo fermentativo produz lactato através da lactato desidrogenase (LDH) ou etanol através de duas reações subsequentes catalisada pela piruvato descarboxilase (PDC) e álcool desidrogenase (ADH) (Esquema 1) (TADEGE et al., 1999; ZABALZA et al., 2009). No entanto, estas duas vias têm desvantagens claras: lactato é tóxico para as células e etanol se difunde rapidamente para fora das células, o que leva a uma perda considerável de carbono durante a hipoxia (ROCHA et al., 2010a). Embora a indução da atividade da ADH, PDC e LDH podem contribuir para a sobrevivência e superar a escassez de energia através da fermentação de carboidratos para manter a produção de ATP na ausência de oxigênio (WANG et al., 2009), o benefício sob tais condições vai depender do tipo de tecido, estágio de desenvolvimento, espécie, genótipo, da gravidade e da duração do estresse (FUKAO; BAILEY-SERRES, 2004; WANG et al., 2009). De modo geral, espécies ou genótipos que apresentam maior concentração de carboidratos nas raízes e um mecanismo metabólico eficiente associado a sua mobilização via metabolismo fermentativo, apresentam maior tolerância para enfrentar a privação de oxigênio (SAIRAM et al., 2009).



Esquema 1. Adaptações no metabolismo de carboidratos sob déficit de O₂. Fonte: Fukao e Bailey-Serres, 2004).

Além das raízes, o sistema radicular de leguminosas é também constituído de nódulos, estruturas responsáveis pela fixação simbiótica de N₂. Pouco se sabe sobre o comportamento do nódulo durante o alagamento do sistema radicular. Mesmo em condições normais há uma limitação no fornecimento de oxigênio para a fixação de nitrogênio, em função de uma barreira variável à difusão de oxigênio presente nos tecidos externos do nódulo que circundam a região central infectada (HUNT et al., 1989; LAYZELL et al., 1990). Portanto, o nódulo é naturalmente hipóxico (embora levemente) e por este motivo extremamente sensível ao

alagamento em função da baixa disponibilidade de oxigênio (LIMA; SODEK, 2003; AMARANTE; SODEK, 2006).

O processo de fixação de N_2 é bastante prejudicado pelo alagamento, quase que imediatamente (AMARANTE; SODEK, 2006), enquanto que as raízes entram em hipoxia apenas algumas horas depois do alagamento (SOUSA; SODEK, 2003). A falta de O_2 no nódulo é uma situação completamente diferente da de uma raiz inundada, principalmente devido ao mecanismo que envolve a leghemoglobina, que permite ao nódulo funcionar sob baixas concentrações de O_2 (SOUZA; SODEK, 2002).

A recuperação pós-hipoxia depende da espécie, do estágio da planta, da duração e intensidade do estresse hipóxico e do tempo de recuperação (FAN et al., 1988; SCOTT et al., 1989). No entanto, um dos principais aspectos que dificultam a recuperação pós-hipoxia está na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), oxigênio singleto (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^{\bullet}) (SUBBAIAH; SACHS, 2003; JACKSON; COLMER, 2005). As ROS são altamente reativas e podem alterar o metabolismo celular através de danos oxidativos nos lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (KUK et al., 2003; AZEVEDO NETO et al., 2006).

O cultivo de soja, em áreas sujeitas à inundação ou com deficiência de drenagem natural, pode ser viabilizado também por meio da identificação de mecanismos de tolerância à deficiência de O_2 em genótipos, o que contribui para a caracterização e geração de cultivares mais adaptadas, tornando assim, mais eficiente o atual modelo produtivo dessas áreas, que é ocupado, em grande parte, pelo monocultivo de arroz irrigado.

Muitos estudos têm sido realizados para elucidar os efeitos do déficit de oxigênio em plantas, no entanto poucos trabalhos são relacionados com plantas noduladas, especialmente em soja. Nesse contexto, visando melhor entender os efeitos ocasionados pela depleção de oxigênio no sistema radicular, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o metabolismo anaeróbico através de alterações no metabolismo fermentativo e alocação de carboidratos em raízes e nódulos de dois genótipos soja sob condições de hipoxia e pós-hipoxia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi desenvolvido com plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] cv. Fundacep 53 RR e BRS Macota, provenientes de sementes fornecidas pela Embrapa Clima Temperado, cultivadas em casa de vegetação sob condições naturais de luz e temperatura. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos de 3L (três plantas por vaso), contendo vermiculita média expandida como substrato e nutridas duas vezes por semana com 250 mL de solução de Hoagland e Arnon (1938) sem nitrogênio mineral (LIMA; SODEK, 2003). No estágio V0 (plântulas com cotilédones abertos), definido por FEHR et al. (1971), foi realizada a inoculação da soja com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SEMIA 587 (FEPAGRO), cultivado em meio líquido (NORRIS; DATE, 1976). Os tratamentos hipóxicos foram aplicados às plantas em estágio R2, caracterizado pelo início da floração (FEHR et al., 1971).

Experimento I - O sistema radicular foi submetido à inundação por meio do encaixe de um segundo vaso, de mesmo modelo e sem perfurações, 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). A inundação das plantas foi conduzida por 8 dias. Após este período, as plantas destinadas a avaliação da recuperação tiveram os vasos sem perfurações retirados para a drenagem da solução e recuperação por 8 dias. Plantas utilizadas como controle foram mantidas em condições de normoxia. O material vegetal (1g de raízes e 0,5g de nódulos) foi coletado no 2º, 4º, 6º e 8º dias após a inundação (DAI) ou recuperação (DAR), juntamente com seus respectivos controles e armazenados a -80°C, para a dosagem da atividade das enzimas fermentativas.

Experimento II - O tratamento hipóxico foi aplicado às plantas, após a remoção da vermiculita do sistema radicular com água corrente, e transferência a um sistema hidropônico, constituído de vasos de 3L contendo solução nutritiva sem

nitrogênio diluída à 1/3 da concentração normal. Foram mantidas três plantas por vaso, onde os sistemas radiculares inteiros, incluindo nódulos, permaneceram submersos na solução e foram submetidos à hipoxia pelo fluxo de gás N₂ (99,99% N₂) por 24h e 72h. A concentração de oxigênio na solução foi monitorada com o auxílio de um oxímetro (Handylab OX1). O tratamento de recuperação consistiu na transferência das plantas para vasos com vermiculita, nas mesmas condições em que foram cultivadas, por 24h e 72h. Plantas mantidas apenas em vermiculita foram utilizadas como controle. Para as análises, cinco réplicas biológicas de raízes ou nódulos por tratamento foram coletadas e armazenadas em ultra-freezer (- 80°C).

3.2 Determinações analíticas

3.2.1 Atividade enzimática

As atividades das enzimas álcool desidrogenase (ADH - EC 1.1.1.1), piruvato descarboxilase (PDC - EC 4.1.1.17) e lactato desidrogenase (LDH - EC 1.1.1.17) foram avaliadas em raízes e nódulos (Experimentos I e II). Os tecidos foram macerados em gral com N₂ líquido e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 5% (p/p MF) e homogeneizados em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo ditioneitol (DTT) 1 mM. Os extratos foram centrifugados a 12.000g por 20 min a 4°C. Uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante foi dessalinizada em coluna de cromatografia de exclusão molecular PD10 – Sephadex G-25 M (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) (SOUZA; SODEK, 2003). A fração proteica eluída foi utilizada para os ensaios enzimáticos e determinação do conteúdo de proteína de acordo com Bradford (1976), para o experimento II. As atividades das enzimas foram quantificadas a partir do monitoramento da oxidação do NADH, em espectrofotômetro, a 340 nm por 2 min em meio de reação de 1,5 mL mantido a 30°C em cubeta de polimetilmetacrilato .

A atividade da ADH foi monitorada no sentido da formação do etanol (acetaldeído → ADH → etanol) em meio de reação contendo tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 para nódulos e fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 para raízes, NADH 0,2 mM, acetaldeído 5 mM e extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de acetaldeído ao meio (HANSON et al., 1984). A atividade da PDC foi monitorada no sentido de formação do etanol a partir de uma reação acoplada (piruvato → PDC →

acetaldeído → ADH → etanol) em meio de reação contendo tampão MES 50 mM (pH 6,0 para nódulo; pH 6,5 para raízes), NADH 0,2 mM, tiamina pirofosfato 0,5 mM, cloreto de magnésio 1 mM, ácido oxâmico 20 mM, ADH 10 U e piruvato de sódio 10 mM e amostra. A reação foi iniciada pela adição do piruvato ao meio (HANSON et al., 1984). A atividade da LDH foi monitorada no sentido de formação do lactato (piruvato → LDH → lactato) em meio de reação contendo tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 para nódulo e fosfato de potássio, pH 7,0 para raízes, NADH 0,2 mM, cianeto de potássio 3 μ M, metilpirazol 4 mM, piruvato de sódio 10 mM e amostra. O piruvato foi utilizado para iniciar a reação (HANSON; JACOBSEN 1984).

3.2.2 Conteúdo de metabólitos anaeróbicos

Os metabólitos etanol, lactato e piruvato de raízes e nódulos (experimento II), foram extraídos por meio de maceração dos tecidos em gral, com N₂ líquido, seguido de homogeneização em 10 mL de ácido perclórico 6% (p/v) e centrifugação a 3.000g por 20 min a 0°C. À cada sobrenadante coletado, adicionou-se uma gota de alaranjado de metila 0,5 g mL⁻¹, seguido de neutralização com carbonato de potássio 5M em banho de gelo. Após 2h em geladeira para precipitação do perclorato de potássio, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 12.000g por 5 min a 0°C (KOLB; JOLY 2009). Etanol e lactato foram determinados enzimaticamente por meio de kits, conforme recomendações do fabricante (Boehringer, Mannheim, Germany). Piruvato foi determinado de acordo com Lamprecht e Heinz (1984).

3.2.3 Conteúdo de carboidratos

Os extratos para dosagem de açúcares solúveis totais (AST) e sacarose, em raízes e nódulos (experimento II), foram obtidos conforme metodologia de Bieleski e Turner (1966) com modificações. As amostras foram maceradas com N₂ líquido em gral e homogeneizadas com 10 mL g⁻¹ de MF (massa fresca) de MCW (metanol: clorofórmio: água), na proporção de 12:5:3. Após 24 h, os extratos foram centrifugados a 600g por 30 min. Recuperou-se a fração sobrenadante e para cada 4 mL, acrescentou-se 1,0 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água e centrifugou-se

novamente para a separação de fases. O sobrenadante contendo os metabólitos foi coletado e transferido para banho-maria a 38°C, permanecendo por cerca de 30 h para eliminação do resíduo de clorofórmio e concentração das amostras para as análises de açúcares e sacarose. O precipitado obtido da primeira centrifugação foi ressuspenso em 10 mL de ácido tricloroacético 10% p/v. Após 24 h centrifugou-se a 600g por 30 min e coletou-se o sobrenadante para determinação de polissacarídeos solúveis em água (WSP) conforme McCready et al., 1950. No precipitado adicionou-se 10 mL de ácido perclórico 30% p/v. Após agitação por 30 min em agitador, centrifugou-se o extrato a 600g por 30 min e coletou-se o sobrenadante contendo açúcares provenientes da digestão do amido (McCREADY et al., 1950).

A dosagem de AST foi realizada com base em Graham e Smydzuk (1965). Tomou-se 1 mL de cada amostra, de um branco (água) e dos padrões (10-150 µg de glicose mL⁻¹), em tubos de ensaio, mantidos em gelo. Adicionou-se 3 mL de solução de antrona (0,15% p/v em ácido sulfúrico concentrado) resfriada a cada tubo e cobriu-se imediatamente com bolinhas de vidro. Após 15 min, agitaram-se os tubos e incubou-se em banho-maria a 90°C por 20 min. Em seguida, mantiveram-se os tubos no escuro até a atingir temperatura ambiente. Os tubos foram novamente agitados e a densidade óptica (D.O.) dos padrões e amostras foi medida a 620 nm contra o branco.

A dosagem de sacarose foi determinada de acordo com Handel (1968). Pipetou-se alíquotas de 100 µL do branco (água), amostras e padrões (20 -100 µg de sacarose) para tubos de ensaio e adicionou-se 100 µL de KOH 30% p/v. Os tubos foram cobertos com bolinhas de vidro e incubados em banho-maria por 10 min a 100°C. Após atingir em temperatura ambiente, adicionou-se 3 mL de antrona (0,15% p/v em ácido sulfúrico 70% v/v) e novamente foram incubados em banho-maria a 40°C por 15 min. Após, mediu-se a D.O. a 620 nm dos padrões e amostras contra o branco.

A determinação do amido foi realizada de acordo com Graham e Smydzuk (1965), da mesma forma que AST, sendo que ao final, os valores obtidos foram multiplicados pelo fator de correção 0,9, para conversão em teores de amido, segundo McCready et al. (1950). A determinação de WSP foi realizada por mesma metodologia executada para AST.

3.3 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 x 2 (regime hídrico x período de inundação ou recuperação x genótipos) para o experimento I e inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 2 (tratamentos x genótipos), para o experimento II, com quatro repetições. A unidade experimental consistiu em um vaso contendo três plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e em caso de significância pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SAS 8.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Experimento I

Os valores de O_2 monitorados na solução nutritiva caíram de $6,5 \text{ mg L}^{-1}$ sob condições de normoxia, para $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ no primeiro dia de inundação do sistema radicular das plantas, chegando aos níveis de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ no quarto dia de inundação e $0,35 \text{ mg L}^{-1}$ no oitavo dia, caracterizando a hipoxia no sistema de cultivo (Figura 1).

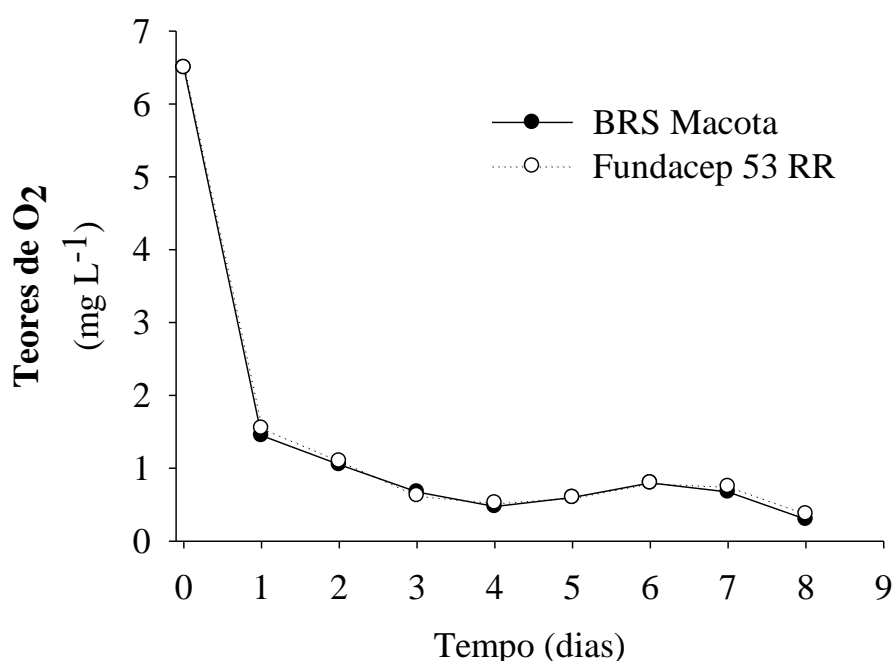


Figura 1. Teores de O_2 na solução nutritiva sob cultivo de plantas de soja Fundacep 53 RR e BRS Macota em normoxia e após indução da hipoxia ao longo de oito dias de inundação.

A atividade das enzimas em raízes e nódulos de soja variou ao longo do período de inundação e recuperação, sendo observada resposta diferenciada ao déficit de O_2 entre os dois genótipos. A atividade da álcool desidrogenase em raízes (Figura 2) mostrou variação ao longo da inundação e recuperação, sendo estimulada sob hipoxia com aumento da atividade ao longo do tempo de inundação e fortemente ativa aos 6 e 8 dias de hipoxia para ambos os genótipos (Figura 2 A e C).

Com o retorno à normoxia os níveis de atividade da ADH caíram consideravelmente já no 2º dia de recuperação em relação à atividade do 8º dia de inundação, no entanto, atingiram os níveis do controle apenas no 6º dia de recuperação para BRS Macota. Embora tenha aumentado novamente no 8º dia de recuperação, a atividade foi baixa (Figura 2 D).

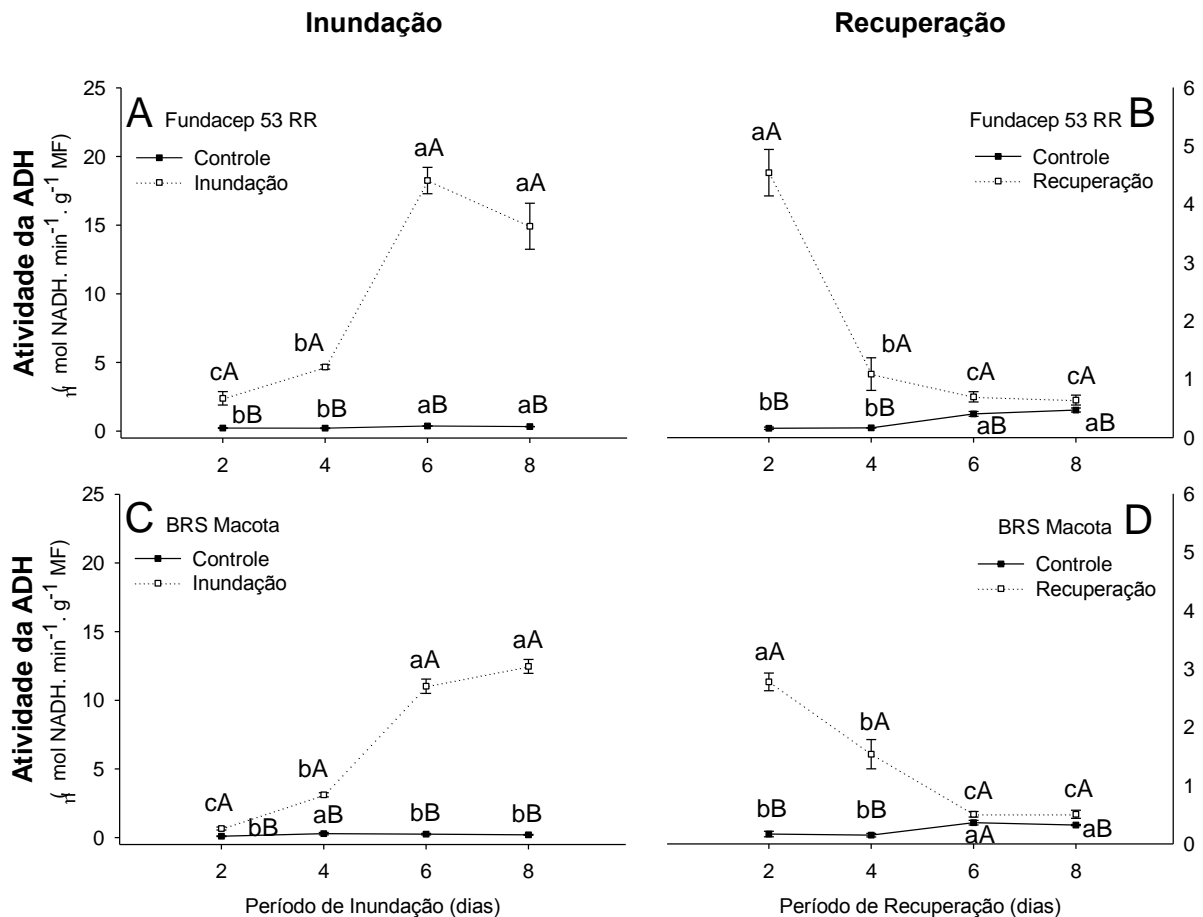


Figura 2. Atividade da álcool desidrogenase (ADH) em raízes de soja das cultivares Fundacep 53 RR (A e B) e BRS Macota (C e D) submetidas a diferentes períodos de inundação e recuperação do sistema radicular. Letras minúsculas comparam os períodos de inundação ou recuperação e letras maiúsculas comparam o regime hídrico (controle e inundação ou recuperação). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores representam média \pm desvio padrão.

Em nódulos (Figura 3), assim com nas raízes, a hipoxia estimulou o rápido aumento da atividade da ADH resultando em forte resposta aos 4 dias de inundação para o genótipo Fundacep 53 RR (Figura 3 A) enquanto que para BRS Macota, o aumento considerável de atividade foi observado no oitavo dia de tratamento (Figura 3 C). Ambos os genótipos responderam de forma efetiva à recuperação, com queda dos níveis de atividade da ADH no decorrer do tempo. No entanto, apenas

Fundacep 53 RR atingiu os níveis do controle com 8 dias de recuperação (Figura 3 B e D).

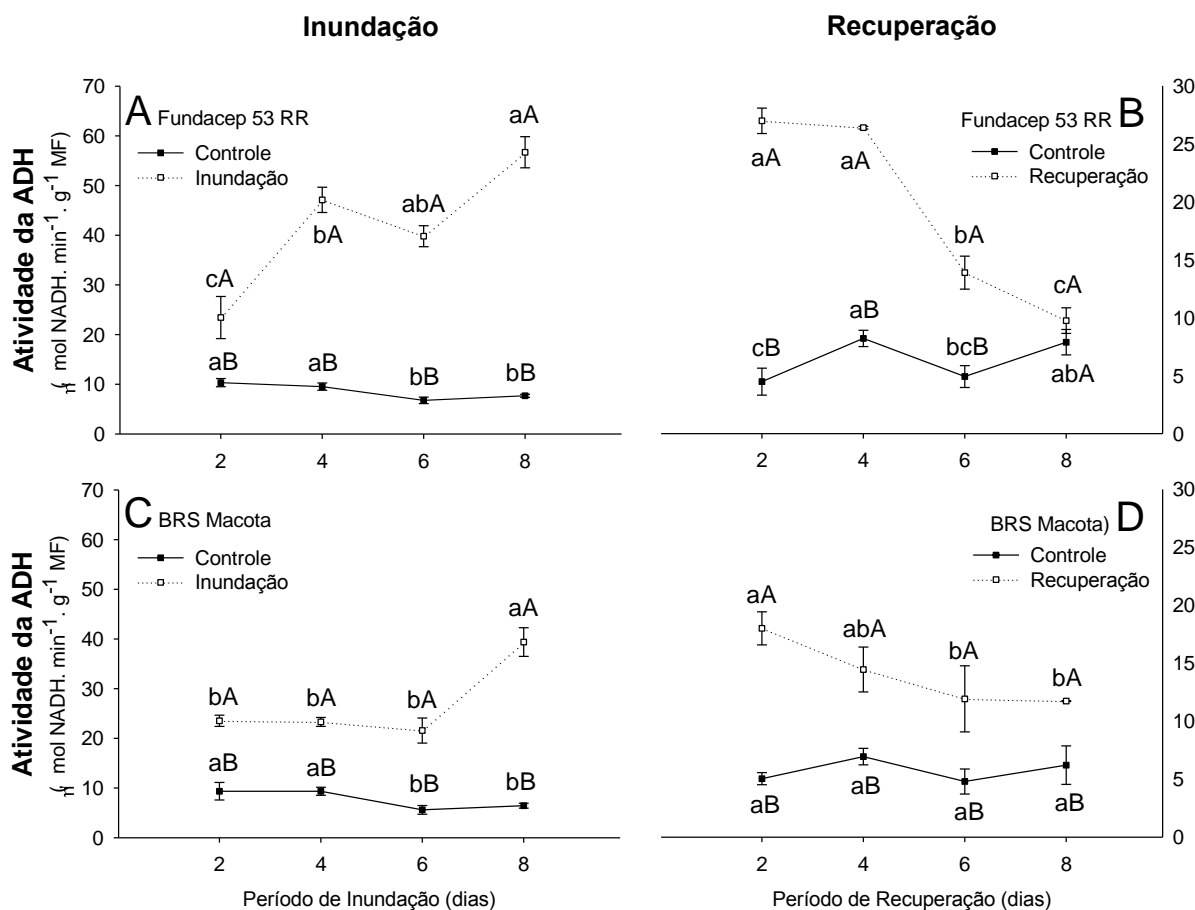


Figura 3. Atividade da álcool desidrogenase (ADH) em nódulos de soja das cultivares Fundacep 53 RR (A e B) e BRS Macota (C e D) submetidas a diferentes períodos de inundação e recuperação do sistema radicular. Letras minúsculas comparam os períodos de inundação ou recuperação e letras maiúsculas comparam o regime hídrico (controle e inundação ou recuperação). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores representam média \pm desvio padrão.

A hipoxia estimulou a atividade da enzima piruvato descarboxilase (PDC) em raízes, em todos os períodos de inundação (Figura 4). Em ambos os genótipos, o aumento foi significativo e proporcional em relação ao tempo de hipoxia (Figura 4 A e C). A atividade da PDC diminuiu consideravelmente aos 2 dias de recuperação, com valores de atividade semelhante aos 2 dias de inundação, caindo significativamente aos 4 dias de recuperação (Figura 4 B e D). Embora a atividade da PDC não tenha atingido os níveis do controle sob condições de normoxia para Fundacep 53 RR, sua atividade foi relativamente baixa e próxima ao controle (Figura 4 B).

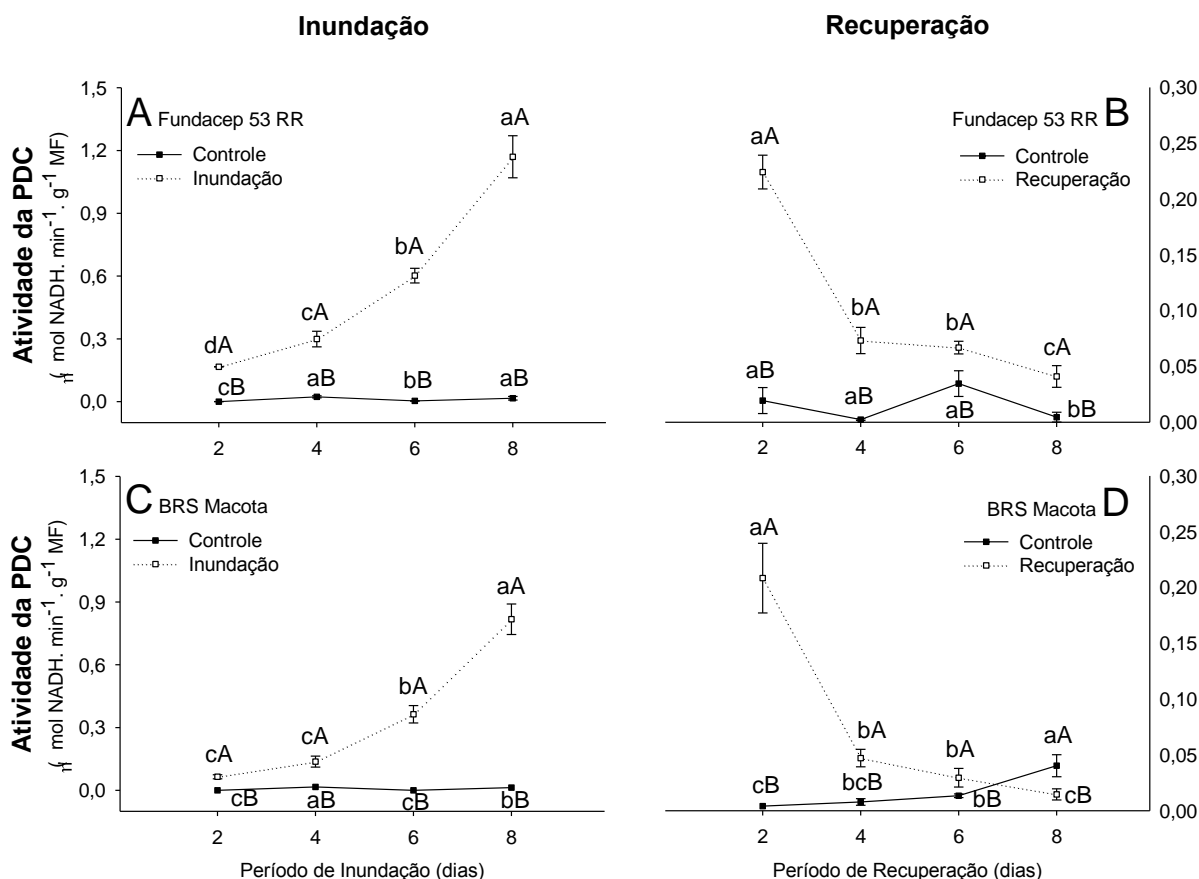


Figura 4. Atividade da piruvato descarboxilase (PDC) em raízes de soja das cultivares Fundacep 53 RR (A e B) e BRS Macota (C e D) submetidas a diferentes períodos de inundação e recuperação do sistema radicular. Letras minúsculas comparam os períodos de inundação ou recuperação e letras maiúsculas comparam o regime hídrico (controle e inundação ou recuperação). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores representam média \pm desvio padrão.

Em nódulos, o aumento significativo da atividade da PDC no genótipo BRS Macota ocorreu apenas aos 6 dias de inundação em relação ao controle (Figura 5 C), sendo consideravelmente elevada aos 8 dias. Fundacep 53 RR respondeu aos efeitos do déficit de O₂ com aumento da atividade da PDC já aos 2 dias de inundação em relação ao controle e tendeu a estabilizar a atividade aos 6 e 8 dias de inundação (Figura 5 A). Com o retorno a normoxia observa-se que em Fundacep 53 RR a atividade da PDC não retornou aos níveis de atividade do controle (Figura 5 B), enquanto que em BRS Macota a atividade decresceu aos níveis pré-hipóxicos aos 8 dias de recuperação (Figura 5 D).

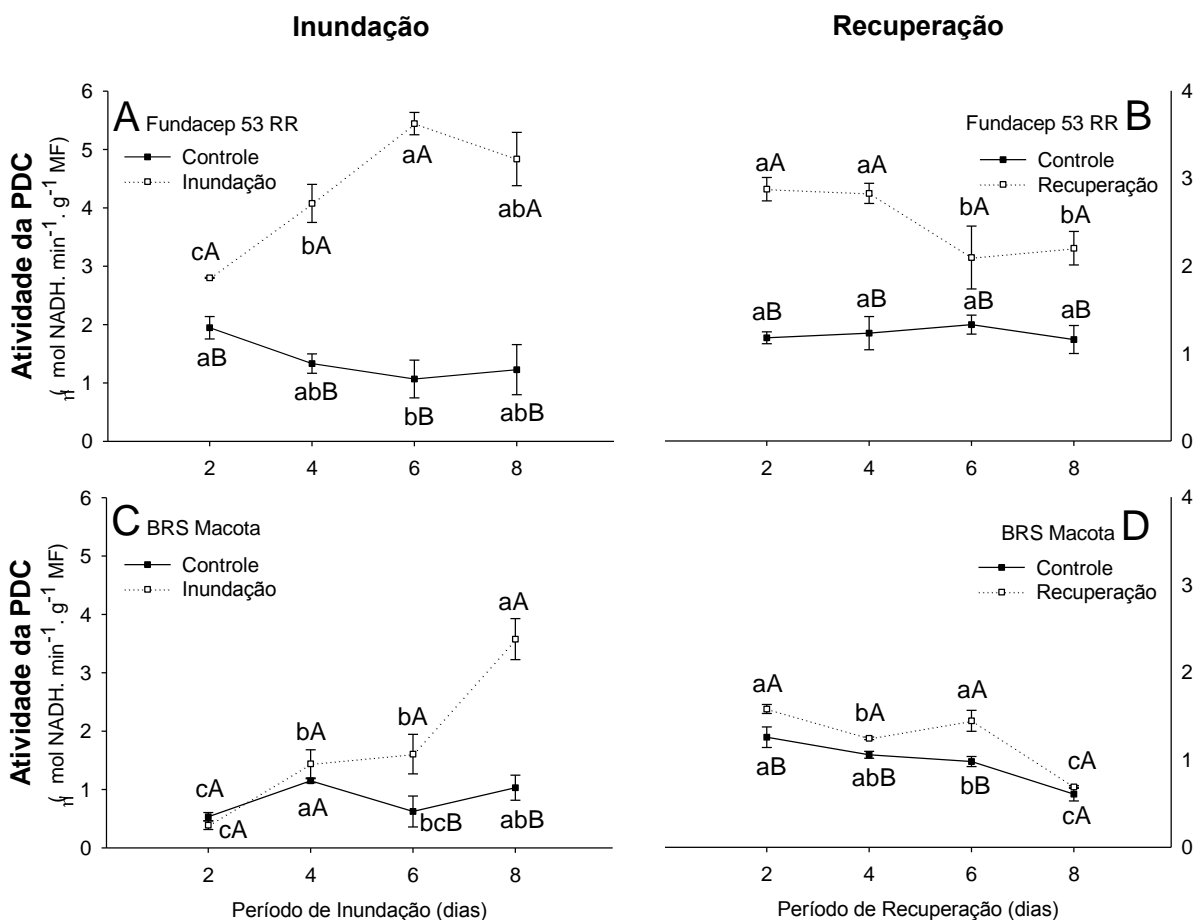


Figura 5. Atividade da piruvato descarboxilase (PDC) em nódulos de soja das cultivares Fundacep 53 RR (A e B) e BRS Macota (C e D) submetidas a diferentes períodos de inundação e recuperação do sistema radicular. Letras minúsculas comparam os períodos de inundação ou recuperação e letras maiúsculas comparam o regime hídrico (controle e inundação ou recuperação). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores representam média \pm desvio padrão.

A atividade da lactato desidrogenase (LDH), tanto em raízes quanto em nódulos, foi extremamente baixa comparada à atividade da PDC e principalmente à atividade da ADH. Em raízes sob inundação, a atividade da LDH aumentou desde o primeiro período de inundação em relação ao controle e tendeu a estabilizar entre o 6^o e 8^o dia em Fundacep 53 RR (Figura 6 A). Resposta semelhante aos efeitos da hipoxia se observa em raízes de BRS Macota, sendo o aumento significativo observado no 4^o dia de inundação quando comparado ao controle (Figura 6 C). Em função da baixa atividade da LDH na maioria dos tecidos em condições de hipoxia, com o retorno à normoxia, a atividade tendeu a diminuir muito rapidamente, com retorno aos níveis pré-hipóxicos aos 2 dias de recuperação para BRS Macota e aos 4 dias para Fundacep 53 RR (Figuras 6 B e D).

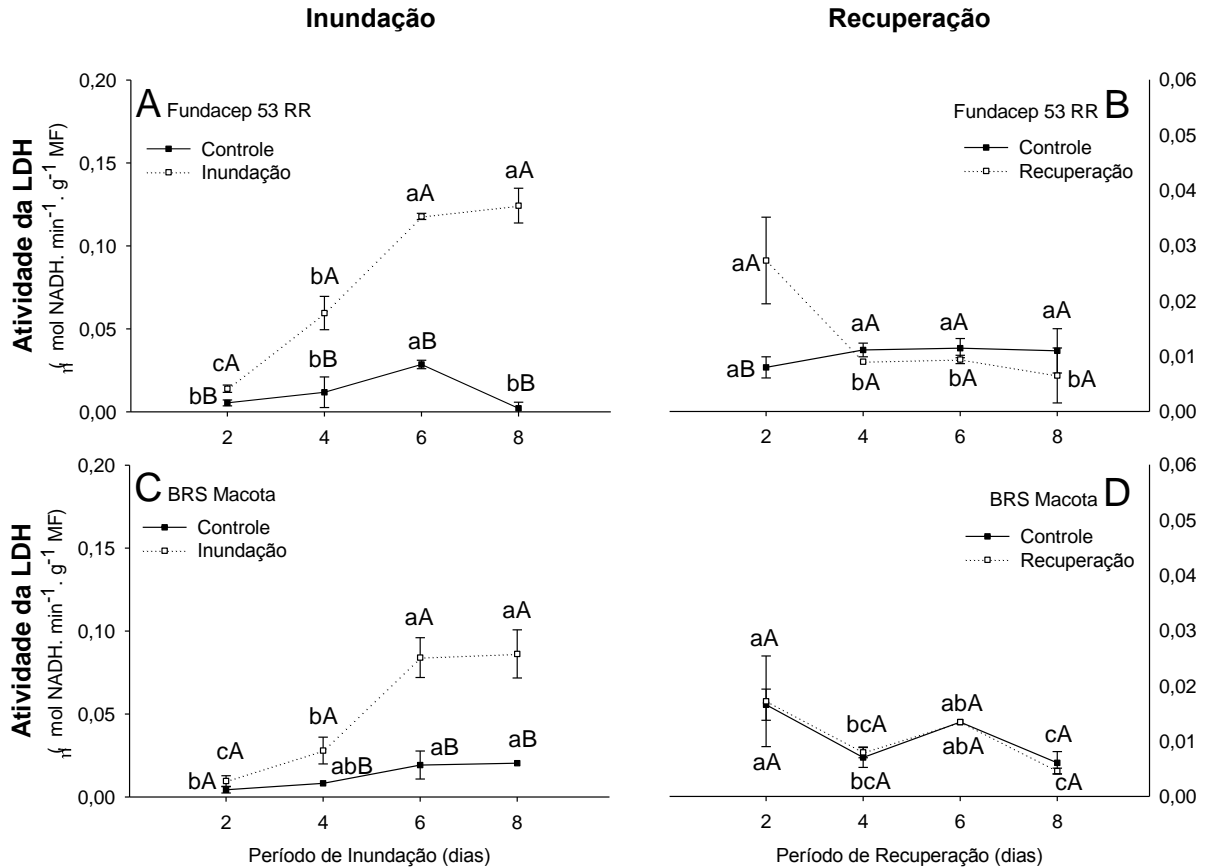


Figura 6. Atividade da lactato desidrogenase (LDH) em raízes de soja das cultivares Fundacep 53 RR (A e B) e BRS Macota (C e D) submetidas a diferentes períodos de inundação e recuperação do sistema radicular. Letras minúsculas comparam os períodos de inundação ou recuperação e letras maiúsculas comparam o regime hídrico (controle e inundação ou recuperação). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores representam média \pm desvio padrão.

A atividade da LDH aumentou com o início da inundação em relação ao controle e tendeu a se manter ao longo do período de 8 dias em nódulos de Fundacep 53 RR (Figura 7 A). Em BRS Macota o aumento da atividade da LDH em nódulos foi verificado aos 4 dias de inundação, sendo expressiva no oitavo dia (Figura 7 C). Com o retorno a normoxia, a atividade retornou aos níveis semelhantes ao controle no genótipo Fundacep 53 RR aos seis dias de recuperação (Figura 7 B), enquanto que em BRS Macota a atividade manteve-se ao longo do tempo restabelecendo aos níveis pré-hipóxicos apenas no oitavo dia de recuperação (Figura 7 D).

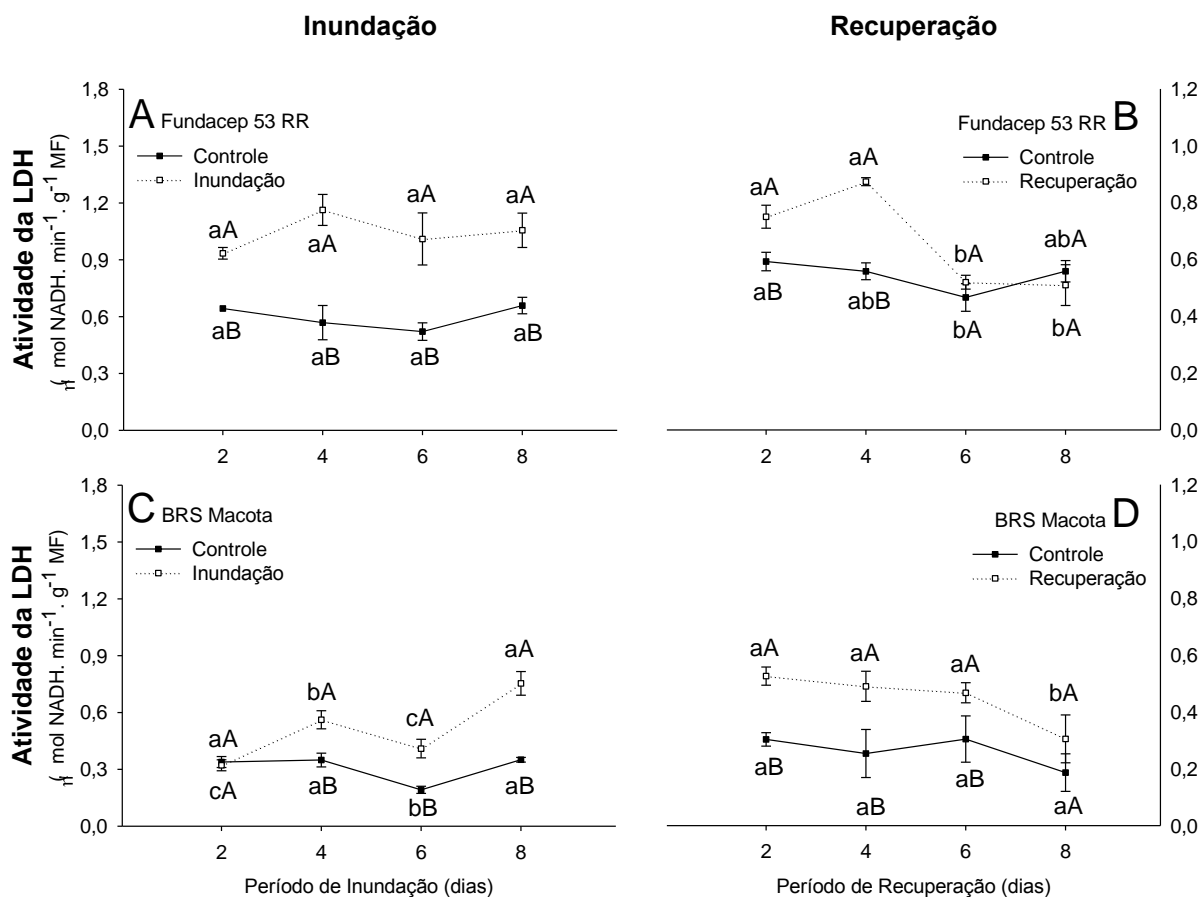


Figura 7. Atividade da lactato desidrogenase (LDH) em nódulos de soja das cultivares Fundacep 53 RR (A e B) e BRS Macota (C e D) submetidas a diferentes períodos de inundação e recuperação do sistema radicular. Letras minúsculas comparam os períodos de inundação ou recuperação e letras maiúsculas comparam o regime hídrico (controle e inundação ou recuperação). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores representam média \pm desvio padrão.

Conforme pode ser observado nas tabelas (1, 2, 3 e 4) em anexo, referentes a análise de variância, houve interação significativa entre os genótipos Fundacep 53 RR e BRS Macota para a atividade das enzimas ADH, PDC e LDH.

Nas figuras 8 e 9 são apresentadas as diferenças entre os genótipos em relação aos períodos de inundação e recuperação. Pode-se observar tanto para raízes quanto para nódulos diferença significativa de atividade enzimática entre os genótipos, sendo que Fundacep 53 RR respondeu mais efetivamente com aumento da atividade ao longo da inundação comparado à BRS Macota, para todas as enzimas analisadas.

Com retorno a normoxia, Fundacep 53 RR tende a reduzir a atividade próxima aos níveis de atividade de BRS Macota ao longo da recuperação (Figuras 8 e 9), a exceção da atividade da PDC e LDH em nódulos (Figura 9 D e F).

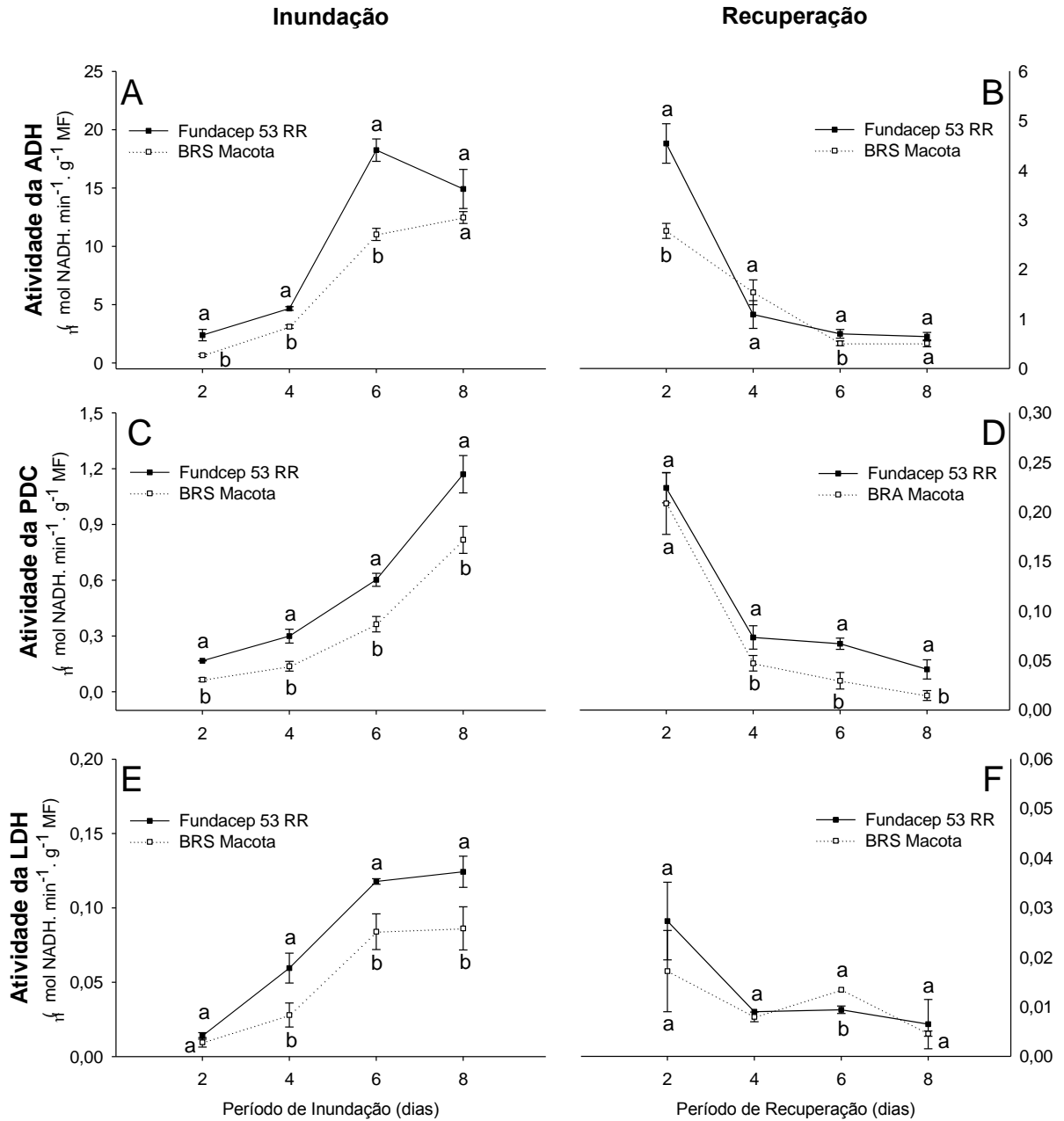


Figura 8. Atividade da álcool desidrogenase (ADH), piruvato descarboxilase (PDC) e lactato desidrogenase (LDH) em raízes de soja das cultivares Fundacep 53 RR e BRS Macota submetidas a diferentes períodos de inundação (A, C e E) e de recuperação (B, D e F) do sistema radicular. Letras minúsculas comparam o período de inundação ou recuperação entre os genótipos. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade. Os valores representam média \pm desvio padrão.

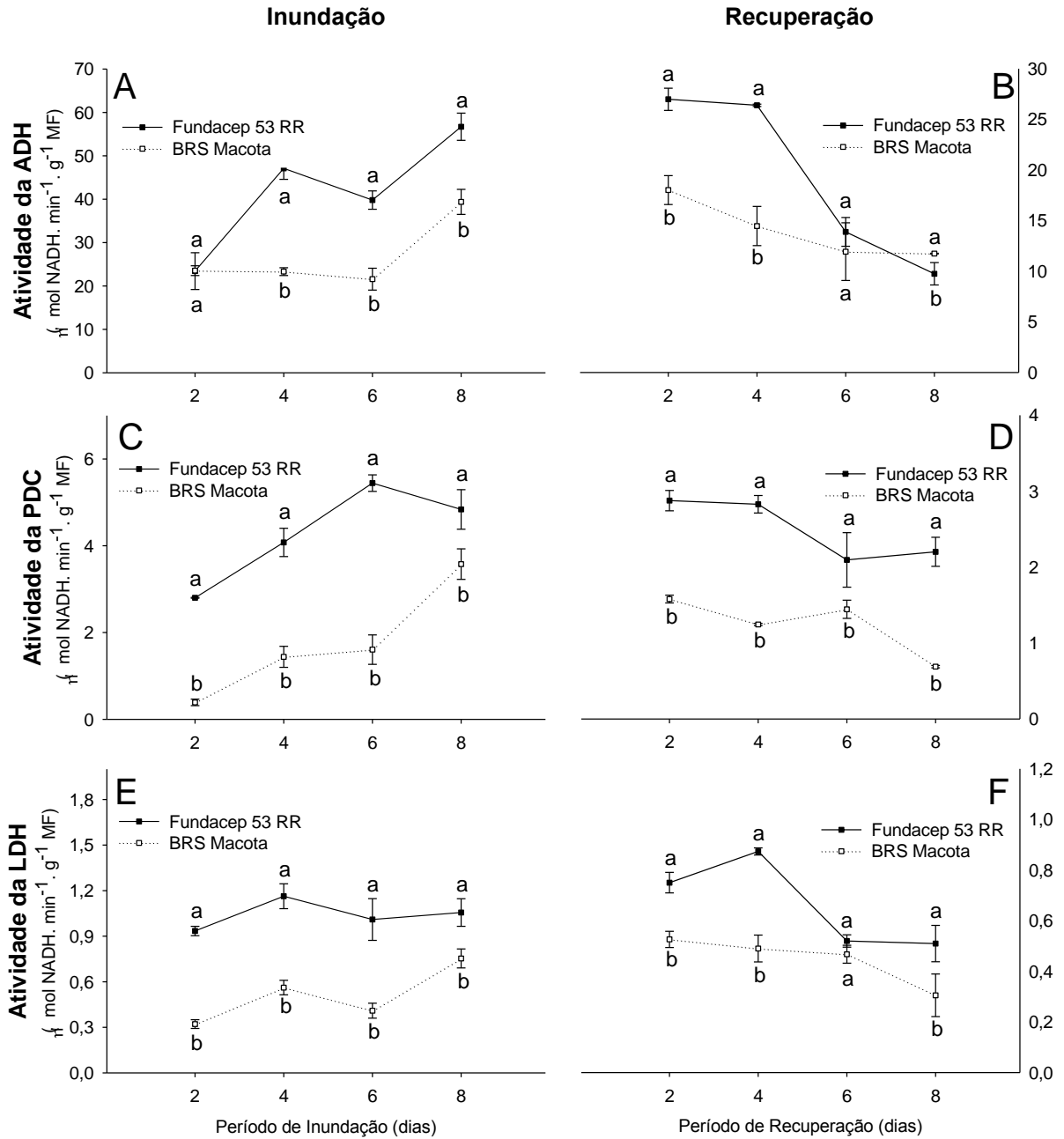


Figura 9. Atividade da álcool desidrogenase (ADH), piruvato descarboxilase (PDC) e lactato desidrogenase (LDH) em nódulos de soja das cultivares Fundacep 53 RR e BRS Macota submetidas a diferentes períodos de inundação (A, C e E) e de recuperação (B, D e F) do sistema radicular. Letras minúsculas comparam o período de inundação ou recuperação entre os genótipos. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade. Os valores representam média \pm desvio padrão.

4.2 Experimento II

Sob normoxia, os teores de oxigênio da solução nutritiva utilizada no sistema hidropônico foi de $6,37 \text{ mg L}^{-1}$, caindo de forma abrupta, chegando a $0,53 \text{ mg L}^{-1}$ em 6 h após o início do borbulhamento de gás N_2 na solução e atingindo $0,27 \text{ mg L}^{-1}$ em

24h, permanecendo próximo a esse nível até o final do experimento (72 h), caracterizando o ambiente hipóxico (Figura 10).

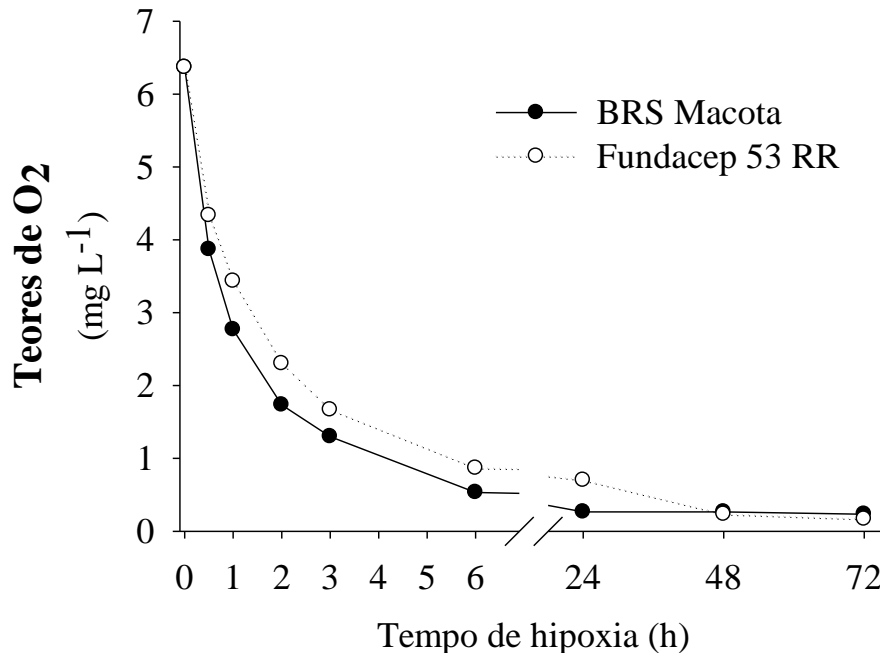


Figura 10. Teores de O₂ na solução nutritiva sob cultivo de plantas de soja Fundacep 53 RR e BRS Macota em normoxia e após indução da hipoxia por 72 h.

4.2.1 Atividade enzimática

A atividade das enzimas do metabolismo fermentativo em raízes e nódulos de soja das cultivares Fundacep 53 RR e BRS Macota foi fortemente influenciada pelas condições de hipoxia e pós-hipoxia (Figuras 11 e 12). A atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH) nas raízes aumentou significativamente em relação ao controle com 24 h de hipoxia, elevando-se expressivamente às 72 h para ambos os genótipos (Figura 11 A). Com o retorno à normoxia os níveis de ADH nas raízes diminuiram significativamente, sendo que Fundacep 53 RR foi mais efetiva no que se refere a redução da atividade enzimática no período de recuperação.

A atividade da enzima piruvato descarboxilase (PDC) respondeu de forma semelhante aos efeitos da deficiência de O₂ nas raízes de ambos os genótipos, com significativo aumento e queda da atividade com a hipoxia e retorno à normoxia, respectivamente. No entanto observou-se que, para a cultivar Fundacep 53RR, a atividade dessa enzima demorou mais para responder à hipoxia e retornou mais

rápido aos níveis próximos do controle (Figura 11 B). Concomitante às demais enzimas, a atividade da lactato desidrogenase (LDH) em raízes de ambos os genótipos respondeu à hipoxia (24 e 72 h) com aumento significativo e retornou aos níveis próximos ao controle com 72 h de recuperação (Figura 11 C).

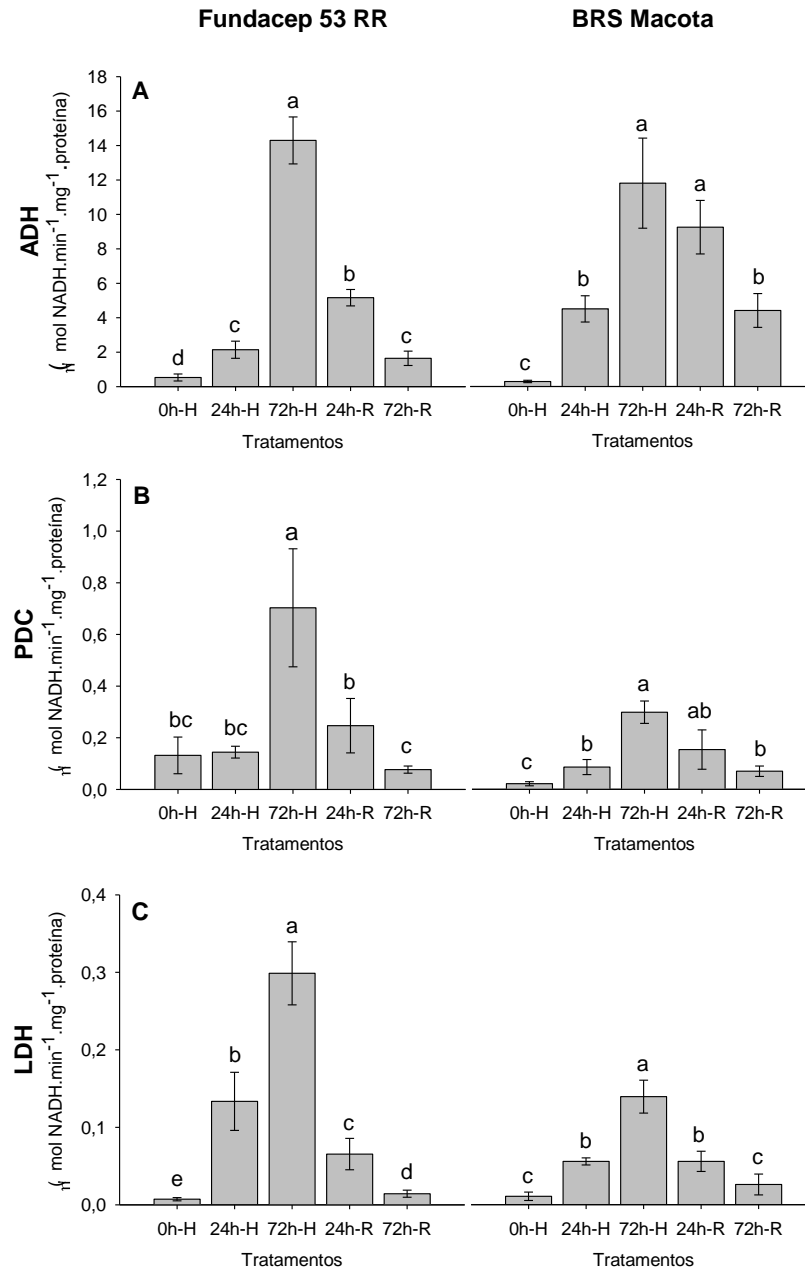


Figura 11. Atividade de enzimas álcool desidrogenase – ADH (A), piruvato descarboxilase – PDC (B) e lactato desidrogenase – LDH (C) em raízes dos genótipos de soja Fundacep 53 RR e BRS Macota sob condições de hipoxia e pós-hipoxia. Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Hipoxia (0h-H, 24h-H e 72h-H) e recuperação (24h-R e 72h-R). Os valores representam a média \pm desvio padrão.

A resposta das enzimas fermentativas em nódulos dos genótipos Fundacep 53 RR e BRS Macota foi semelhante ao das raízes sob hipoxia. No entanto, as raízes responderam de maneira mais efetiva com o retorno a normoxia (Figura 12). A atividade da ADH em nódulos para Fundacep 53 RR aumentou com o início da hipoxia, elevando-se ainda mais com o retorno à normoxia após 24h de recuperação. A atividade da enzima às 72 h de recuperação decresceu em relação ao tratamento 24h-R, porém, ainda não restabelecendo a atividade aos níveis do controle (Figura 12 A). Para BRS Macota ocorreu um aumento significativo da atividade da ADH com a hipoxia. Não houve decréscimo significativo da atividade com a recuperação e os níveis mantiveram-se ainda altos, mesmo 72h após o retorno à normoxia (Figura 12 A).

A atividade da PDC em nódulos para Fundacep 53 RR foi semelhante à ADH, com aumento significativo com a hipoxia às 24 e 72 h, no entanto, embora tenha ocorrido queda de atividade com a recuperação, os níveis ainda mantiveram-se altos. Para nódulos de BRS Macota, ocorreu aumento da atividade da PDC com a hipoxia e manteve-se superior ao controle, mesmo sob 72 h de recuperação (Figura 12 B).

A atividade da LDH em nódulos de Fundacep 53 RR foi semelhante à PDC, ocorrendo aumento da atividade com a hipoxia e não retornando aos níveis do controle mesmo com 72 h de recuperação. Para BRS Macota houve aumento da atividade da LDH nos nódulos sob hipoxia e queda na atividade às 72 h de retorno à condição de normoxia, não decrescendo aos níveis pré-hipóxicos (Figura 12 C).

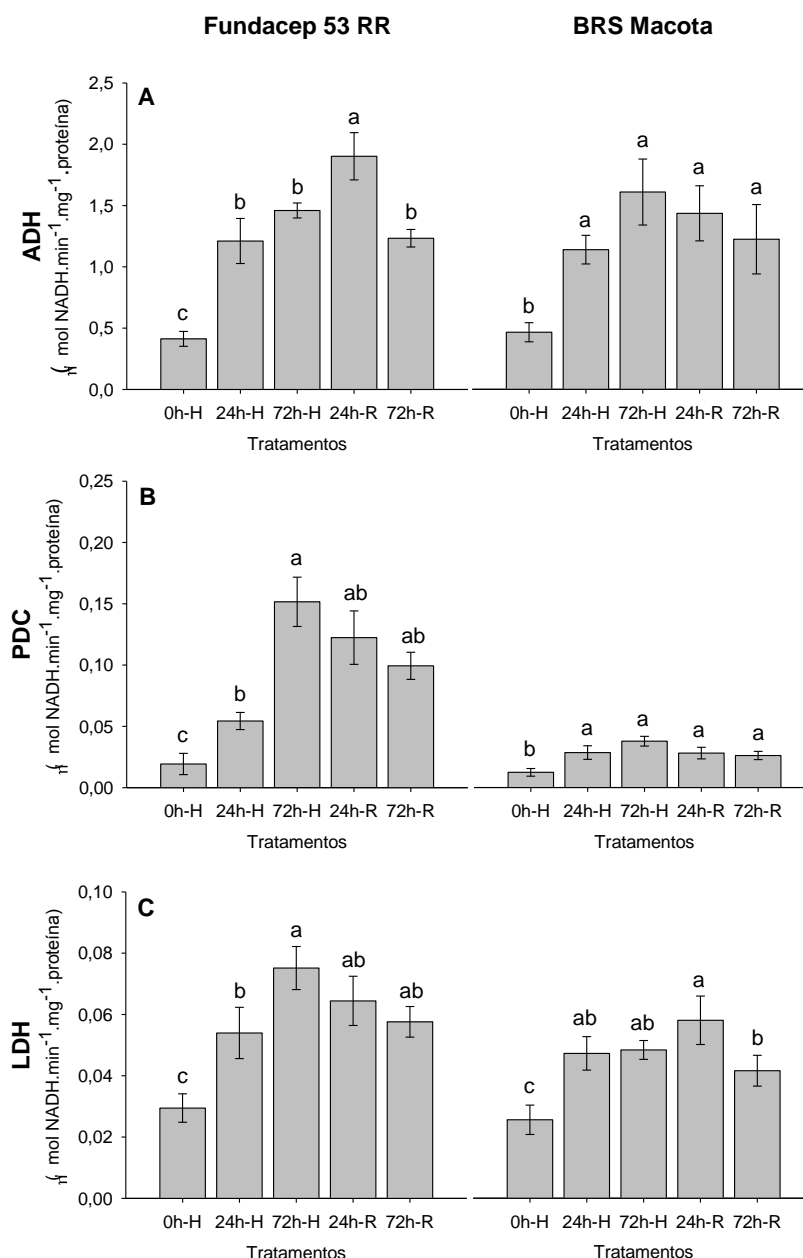


Figura 12. Atividade de enzimas álcool desidrogenase – ADH (A), piruvato descarboxilase – PDC (B) e lactato desidrogenase – LDH (C) em nódulos dos genótipos de soja Fundacep 53 RR e BRS Macota sob condições de hipoxia e pós-hipoxia. Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Hipoxia (0h-H, 24h-H e 72h-H) e recuperação (24h-R e 72h-R). Os valores representam a média \pm desvio padrão.

4.2.2 Teores de metabólitos anaeróbicos

Os teores de metabólitos anaeróbicos são apresentados na figura 13 para raízes e na figura 14 para nódulos. Os teores de etanol nas raízes aumentaram com a hipoxia, elevando-se ainda mais com 24 h de recuperação (Figura 13 A). No entanto, sob 72 h de retorno às condições de normoxia, os teores de etanol

retornaram aos níveis pré-hipóxicos para o genótipo Fundacep 53 RR e, apesar de reduzir em BRS Macota, permaneceram significativamente superiores ao controle.

As concentrações de lactato em raízes de ambos os genótipos aumentaram com a hipoxia (Figura 13 B). No entanto, em BRS Macota, o aumento foi mais expressivo em relação ao controle, quando comparado à Fundacep 53 RR sob 24 h de hipoxia, mantendo-se até 72h. Sob recuperação, os teores desse metabólito decresceram após 24h de tratamento nos dois genótipos, alcançando níveis pré-hipóxicos após 72h de normoxia.

Os teores de piruvato, para ambos os genótipos, mantiveram-se aos níveis do controle com 24 h de hipoxia, ocorrendo diminuição com 72 h, e, após o retorno à normoxia, apenas Fundacep 53RR restabeleceu os teores de piruvato aos níveis do controle (Figura 13 C).

Os teores de etanol em nódulos de Fundacep 53 RR foram superiores ao controle apenas no tratamento de 24 h de recuperação, restabelecendo aos níveis pré-hipóxicos com 72 h de normoxia (Figura 14 A). Em BRS Macota não foi observado aumento dos teores de etanol nos nódulos com a hipoxia, no entanto, com o retorno à normoxia, observou-se uma queda dos teores em relação ao controle.

Os teores de lactato em Fundacep 53 RR aumentaram apenas com 72 h de hipoxia, enquanto que em BRS Macota, aumentaram marcadamente com 24 h de hipoxia, permanecendo elevado com 72 h de tratamento (Figura 14 B). Em ambos os genótipos, as concentrações de lactato decresceram aos níveis pré-hipóxicos com 24 h de recuperação.

Os teores de piruvato nos nódulos, diferentemente das raízes, aumentaram para Fundacep 53 RR com a hipoxia (24 e 72 h) e restabeleceram-se com 72 h de recuperação. Em BRS Macota não ocorreu alterações na concentração desse metabólito (Figura 14 C).

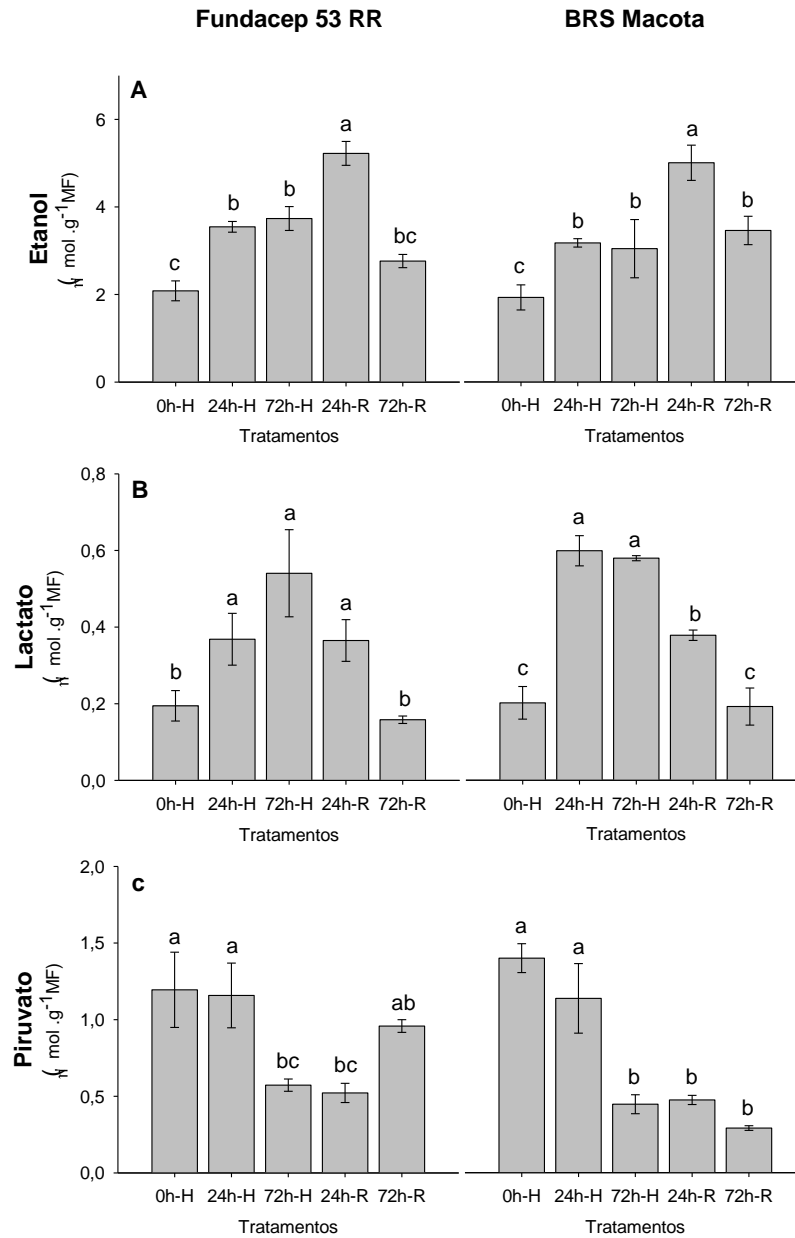


Figura 13. Teores dos metabólitos anaeróbicos, etanol (A), lactato (B) e piruvato (C), em raízes dos genótipos de soja Fundacep 53 RR e BRS Macota, sob condições de hipoxia e pós-hipoxia. Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Hipoxia (0h-H, 24h-H e 72h-H) e recuperação (24h-R e 72h-R). Os valores representam a média \pm desvio padrão.

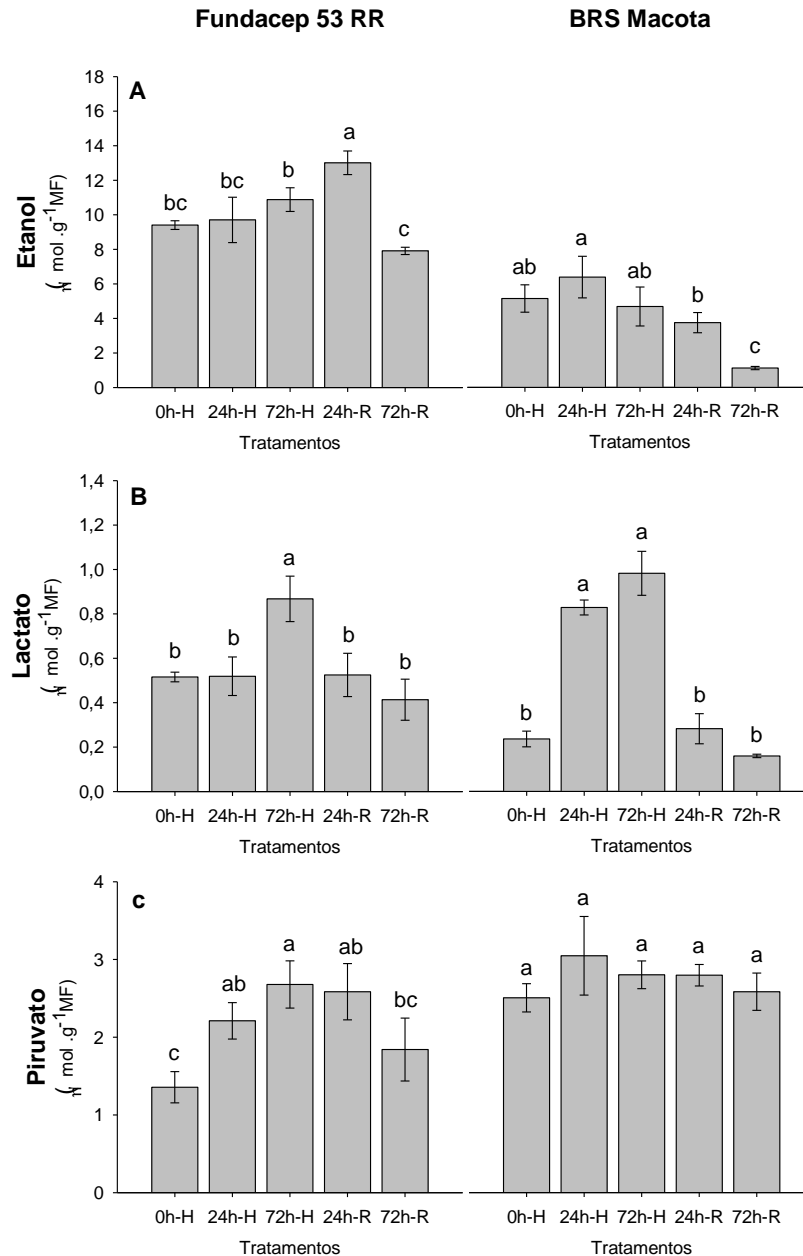


Figura 14. Teores dos metabólitos anaeróbicos etanol (A), lactato (B) e piruvato (C), em nódulos dos genótipos de soja Fundacep 53 RR e BRS Macota, sob condições de hipoxia e pós-hipoxia. Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Hipoxia (0h-H, 24h-H e 72h-H) e recuperação (24h-R e 72h-R). Os valores representam a média \pm desvio padrão.

4.2.3 Teores de carboidratos

Os teores de carboidratos estão apresentados nas figuras 15 e 16 para raízes e nódulos de soja, respectivamente. Os teores de açúcares solúveis totais (AST) em raízes de Fundacep 53 RR não alteraram significativamente nos tratamentos de hipoxia e de recuperação. Em BRS Macota, embora os teores

tenham diminuído com 24h de hipoxia e aumentado com o retorno à normoxia, as médias não diferiram do controle (Figura 15 A).

Os teores de sacarose em raízes de Fundacep RR aumentaram com 72 h de hipoxia e diminuíram com a recuperação aos níveis do controle com 24h. Em BRS Macota, diminuíram nas primeiras 24 h de hipoxia, restabelecendo aos níveis equivalentes ao controle para os demais tratamentos (Figura 15 B). Em raízes de Fundacep 53 RR não houve alteração do conteúdo de polissacarídeos solúveis em água (WSP) durante os períodos de hipoxia ou de recuperação avaliados. Entretanto, para BRS Macota houve decréscimo significativo com 24h de hipoxia, permanecendo constante mesmo após 24h de retorno às condições de normoxia, restabelecendo-se no período de 72 h (Figura 15 C). Os teores de amido em raízes aumentaram com 24 h de hipoxia e diminuíram com 72 h, aumentando novamente com o retorno à normoxia para Fundacep 53 RR. Para BRS Macota os teores de amido aumentaram significativamente apenas com 72 h de recuperação (Figura 15 D).

Os teores de AST em nódulos, para ambos os genótipos diminuíram com a hipoxia e retornaram aos níveis pré-hipóxicos durante o tratamento de recuperação, sendo equivalentes ao controle às 24h pós-hipoxia para BRS Macota e 72 h para Fundacep 53 RR (Figura 16 A). Os teores de sacarose tenderam a diminuir sob condições de hipoxia e retornam aos níveis normais com 72 h de recuperação para Fundacep 53 RR; já para BRS Macota, durante a hipoxia, os teores se mantiveram próximos e aumentaram com a recuperação a níveis superiores ao controle (Figura 16 B). Os tratamentos de hipoxia e pós-hipoxia não causaram alterações nos teores de WSP em nódulos de ambos os genótipos (Figura 16 C). Os teores de amido em nódulos do genótipo Fundacep 53 RR aumentaram nas primeiras 24 h de hipoxia e caíram novamente próximo aos níveis do controle, aumentando drasticamente com 72 h de recuperação. Para BRS Macota, os teores de amido aumentaram com a hipoxia, caíram com 24 h de recuperação e novamente aumentaram com 72 h de recuperação (Figura 16 D).

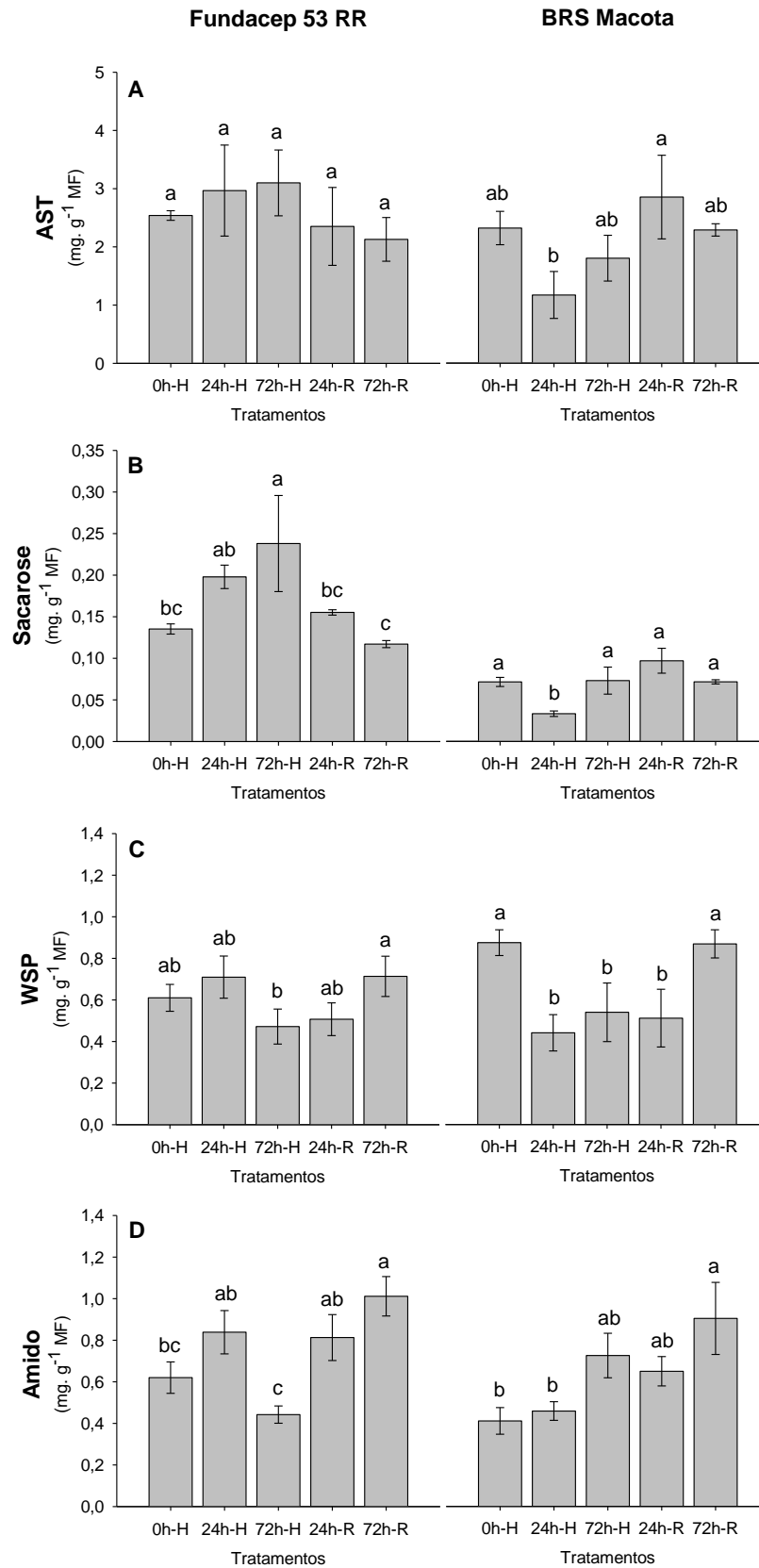


Figura 15. Teores de açúcares solúveis totais – AST (A), sacarose (B), carboidratos solúveis em água – WSP (C) e amido (D), em raízes dos genótipos de soja Fundacep 53 RR e BRS Macota, sob condições de hipoxia e pós-hipoxia. Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Hipoxia (0h-H, 24h-H e 72h-H) e recuperação (24h-R e 72h-R). Os valores representam a média \pm desvio padrão.

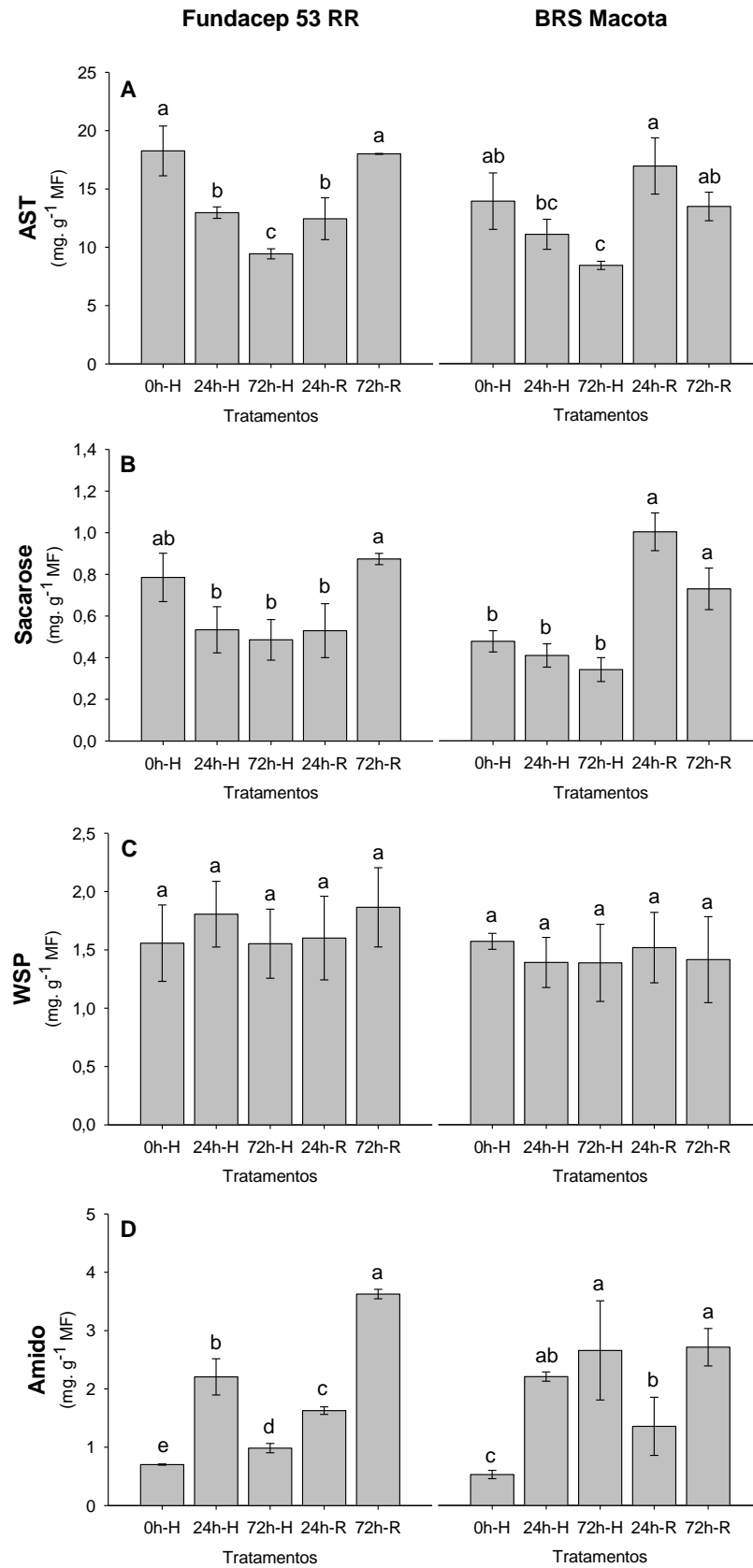


Figura 16. Teores de açúcares solúveis totais – AST (A), sacarose (B), carboidratos solúveis em água – WSP (C) e amido (D), em nódulos dos genótipos de soja Fundacep 53 RR e BRS Macota, sob condições de hipoxia e pós-hipoxia. Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Hipoxia (0h-H, 24h-H e 72h-H) e recuperação (24h-R e 72h-R). Os valores representam a média \pm desvio padrão.

5. DISCUSSÃO

Quando organismos aeróbicos são privados de O₂, a fosforilação oxidativa mitocondrial é inibida (ZABALZA et al., 2009), enquanto que as vias da glicólise e fermentação são ativadas, levando ao acúmulo de diversos produtos, tais como piruvato, lactato, etanol, alanina (Ala) entre outros (FAN et al., 1997; SOUZA; SODEK, 2002; ROCHA et al., 2010a). Embora os níveis de O₂ não tenham se exaurido completamente na solução nutritiva, mesmo após 24 h de hipoxia (Figura 1) ou 8 dias de hipoxia (Figura 10), a quantidade que pode ser aproveitada pelas raízes é praticamente desprezível, pois os teores de O₂ decresceram a valores mínimos e a sua taxa de difusão em água é 10⁴ vezes menor do que no ar (ARMSTRONG et al., 1994; 2009).

Os teores de O₂ foram exauridos mais rapidamente pelo fluxo de N₂ gasoso na solução (Experimento II), evidenciado na figura 10, em comparação aos teores de O₂ na solução do experimento I (Figura 1). Observa-se que os teores de O₂ para o experimento I decrescem rapidamente em 6h de inundação, enquanto que no experimento II esses teores se equivalem apenas aos 3 dias de inundação. Esse rápido declínio das concentrações de O₂ resultou em respostas diferenciadas quanto à atividade das enzimas nos dois experimentos. A atividade das enzimas ADH, PDC e LDH, aumentaram de forma mais efetiva aos efeitos da hipoxia no experimento I em relação ao experimento II.

Respostas ao déficit de oxigênio têm sido estudadas em *Arabidopsis thaliana*, bem como em várias outras espécies. O baixo nível de oxigênio causa rápidas mudanças na transcrição de genes, síntese e degradação de proteínas e no metabolismo celular (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008). O aumento rápido da atividade da enzima ADH (Figuras 2, 3, 11 A e 12 A) tanto em raízes quanto em nódulos dos genótipos de soja Fundacep 53 RR e BRS Macota sob condições de hipoxia está relacionado à rápida expressão do gene *adh*, gene chave envolvido na fermentação (CHRISTIANSON et al., 2010).

A atividade da ADH em raízes de algodão aumentou em até 48 h pós-hipoxia e somente após este período teve declínio (MILLAR et al., 1994), retornando

aos níveis pré-hipóxicos com 120 h pós-tratamento (MILLAR; DENNIS 1996), semelhante às respostas mostrada nas Figuras 2, 3, 11 A e 12 A, ocorrendo aumento da atividade da ADH em nódulos de Fundacep mesmo após 24 h de retorno à normoxia (Figura 12 A) ou o declínio lento da atividade da enzima em raízes pós-hipoxia, não atingindo os níveis pré-hipóxicos mesmo após 72 h de recuperação (Figura 11 A).

Os teores elevados de etanol nas raízes e nódulos (Figuras 13 A e 14 A) estão relacionados à alta atividade da ADH nesses órgãos sob condições de hipoxia. Ainda é possível observar que os níveis de etanol se mantiveram altos mesmo com o retorno à normoxia, também resultado do lento declínio da atividade da ADH. Os baixos teores de etanol em nódulos de BRS Macota (Figura 14 A) podem ser resultado da senescência avançada do tecido devido ao tempo de exposição ao déficit de O₂, pois os nódulos com 72 h de hipoxia encontravam-se em deterioração, não sendo o mesmo observado para Fundacep 53 RR.

Estudos em *Arabidopsis thaliana* demonstram que o aumento da expressão dos genes e atividade das enzimas ADH e PDC são essenciais para a tolerância à hipoxia (KURSTEINER et al., 2003, BIENIAWSKA et al., 2007). Pode ser observado nas figuras 2, 3, 4, 5, 11 e 12 comportamento semelhante de atividade para ADH e PDC, enzimas da rota responsável pela produção do etanol. O etanol é provavelmente o maior produto da fermentação em tecidos de plantas superiores e, a sua rota de formação, é responsável pela tolerância ao déficit de O₂, produzido sequencialmente pela ação da PDC através da oxidação e descarboxilação do piruvato em acetaldeído que é substrato para ADH produzir etanol (GOOD; CROSBY, 1989). Em termos de eficiência, a rota de formação do etanol é mais importante que a rota de formação de lactato, pois essa via promove uma maior geração de NAD⁺ e o consumo de prótons (KATO-NOGUCHI, 2000).

As concentrações de etanol normalmente encontradas em plantas são insuficientes para causar toxicidade. Por outro lado, o etanol não é facilmente metabolizado e sendo solúvel na bicamada lipídica das membranas celulares (DREW, 1997), pode quase que totalmente ser difundido para fora do meio circundante, resultando em perda de carbono (GOOD; CROSBY, 1989; PERATA; ALPI, 1993; ROCHA et al., 2010a).

A enzima LDH é induzida sob hipoxia e seu produto, lactato, é muitas vezes produzido antes do etanol, logo que a planta entra em hipoxia, ocorrendo a

acidificação do citosol (KATO-NOGUCHI, 2000). A queda do pH citosólico (DREW, 1997) sinaliza para a produção de etanol, uma vez que a enzima PDC é ativada quando o pH diminui e a ADH é ativada sob condições de hipoxia (GOOD; CROSBY, 1989). O aumento da atividade da LDH foi acompanhada pelo aumento do teor de lactato (Figuras 11, 12, 13 e 14) em ambos os genótipos e tecidos e ocorreu logo nas primeiras 24 h de hipoxia, caindo com o retorno à normoxia, aumento bem menos expressivo ou não detectado inicialmente para as enzimas ADH e PDC. O aumento da atividade da ADH e PDC ocorreu consideravelmente às 72 h de hipoxia, estendendo-se para 24 h pós-hipoxia, acompanhada também pelo seu respectivo metabólito, etanol. Portanto a mudança da fermentação láctica para a alcoólica representa um importante indicador da capacidade de uma planta sobreviver à hipoxia sem sofrer danos celulares extensivos (MUSTROPH et al., 2006, 2010).

BRS Macota mostrou-se mais sensível ao alagamento enquanto que Fundacep 53 RR apresentou maior tolerância aos efeitos hipóxicos e pós-hipóxicos, podendo ser confirmado pela atividade enzimática (Figuras 8, 9, 11 e 12). Fundacep respondeu de forma mais eficiente ao retorno à condição de normoxia, com declínio mais rápido da atividade das enzimas fermentativas a valores próximos aos níveis pré-hipóxicos (Figuras 11 e 12), evidenciado principalmente pela atividade da ADH. Plantas que investem na produção de etanol apresentam maior tolerância ao alagamento (GOOD; CROSBY, 1989). Comparado à Fundacep 53 RR, BRS Macota mesmo após retorno à normoxia continuou investindo na atividade da ADH (Figuras 11 e 12 A), o que também refletiu nos teores de etanol (Figura 13 e 14 A) numa tentativa de minimizar os efeitos hipóxicos. Fundacep 53 RR também apresentou maiores teores pré-hipóxicos de carboidratos (Figuras 15 e 16) o que pode também ter conferido maior tolerância em relação à BRS Macota.

O piruvato é substrato comum para a produção de etanol e lactato. O acúmulo de piruvato é resultado do declínio da taxa de oxidação e incremento na taxa de síntese, conforme foi observado em raízes de soja não nodulada sob hipoxia (SOUZA; SODEK, 2002) e em raízes hipóxicas de cevada (GOOD; MUENCH, 1993). No entanto, pode-se observar um comportamento diferenciado nos genótipos utilizados, uma vez que tratam-se de plantas noduladas e apresentam mecanismo metabólico diferenciado das plantas não-noduladas.

Os teores de piruvato aumentaram em nódulos (Figura 14 C) e diminuíram nas raízes (Figura 13 C). O aumento dos teores de piruvato nos nódulos pode estar relacionado ao aumento da taxa de oxidação dos carboidratos, principalmente sacarose (Figura 16 B) e AST (Figura 16 D). E os baixos teores de piruvato nas raízes podem estar relacionados ao aumento dos teores de sacarose (Figura 15 B), AST (Figura 15 D) e amido (Figura 15 A), pelo menos nas primeiras 24 h de hipoxia, provavelmente associados ao metabolismo diferenciado de ambos os tecidos e a necessidade de suprir a demanda celular por energia, como pode ser observado em trabalhos de Fan et al. (1988) e Reggiani et al. (2000).

Ainda é possível observar que a maior taxa de oxidação do piruvato em raízes resultou também em maior taxa de produção de lactato (Figura 13 B) e etanol (Figura 13 A). Associados a isso, o maior acúmulo de piruvato em nódulos resultou em menor taxa de produção de lactato (Figura 14 B) e etanol (Figura 14 A), em ambos os tecidos sob hipoxia em relação aos teores pré-hipóxicos.

Uma terceira via também é ativada sob condições de hipoxia, e utiliza o piruvato como substrato para a produção de aminoácidos como a alanina, catalisada pela enzima alanina aminotransferase (AlaAT) e GABA (ácido γ -aminobutírico) (SOUSA; SODEK, 2003; MIYASHITA et al., 2007; VAN DONGEN et al., 2009; ROCHA et al., 2010 a e b). O aumento da atividade da AlaAT e a produção de alanina sob condições de hipoxia é muito mais expressiva em raízes de soja do que em nódulos (ROCHA et al., 2010 b), o que explica em parte a redução dos teores de piruvato nas raízes (Figura 13 C) e não em nódulos (Figura 14 C).

Embora a indução da atividade da ADH, PDC e LDH podem contribuir para a sobrevivência e superar a escassez de energia através da fermentação de carboidratos para manter a produção de ATP na ausência de oxigênio (WANG et al., 2009), o benefício sob tais condições vai depender do tipo de tecido, estágio de desenvolvimento, espécie, genótipo, da gravidade e da duração do estresse (FUKAO; BAILEY-SERRES, 2004; WANG et al., 2009). De modo geral, espécies ou genótipos que apresentam maior concentração de carboidratos nas raízes e um mecanismo metabólico eficiente associado à sua mobilização via metabolismo fermentativo, apresentam maior tolerância para enfrentar a privação de oxigênio (SAIRAM et al., 2009).

Estudos demonstram que em espécies susceptíveis a hipoxia ocorre diminuição dos teores de carboidratos, como açúcares e sacarose devido ao maior

consumo de ATP pelas células para a manutenção do metabolismo, enquanto que espécies mais tolerantes ocorre aumento dos teores de carboidratos, especialmente açúcares e sacarose, também relacionados ao aumento da atividade das enzimas do metabolismo de carboidratos, como a sacarose sintase (Susy) (KENNEDY et al., 1992). A Susy é uma enzima chave responsável pela hidrólise reversível da sacarose em frutose e glicose, que são substrato para a via glicolítica, principal fonte de energia sob hipoxia (KUMUTHA et al., 2008), concomitante ao aumento da atividade da Susy, ocorre diminuição da atividade da invertase em espécies tolerantes à hipoxia, como o milho (SPRINGER et al., 1986).

Em raízes de feijão-guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp] sob condições de alagamento, houve diminuição da atividade e expressão da Susy e ADH em genótipos susceptíveis e aumento da atividade e expressão em genótipos tolerantes, acompanhados pelos teores de carboidratos (KUMUTHA et al., 2008). Efeitos similares também são reportados em raízes de feijão sob hipoxia (SAIRAM et al., 2009). Assim o aumento dos teores de açúcares e sacarose (Figura 6) em raízes de Fundacep 53 RR pode ter conferido maior tolerância aos efeitos da hipoxia e conseqüentemente suprido a planta com as reservas após o retorno à normoxia.

As diferenças entre raízes e nódulos ocorrem devido à diferença de metabolismo, impostas também pela morfo-fisiologia dos tecidos, pois mesmo em condições normais há uma limitação no fornecimento de oxigênio para a fixação de nitrogênio, em função de uma barreira variável à difusão de oxigênio presente nos tecidos externos do nódulo que circundam a região central infectada (HUNT et al., 1989; LAYZELL et al., 1990). Portanto, o nódulo é naturalmente hipóxico (embora levemente) e por este motivo extremamente sensível ao alagamento em função da baixa disponibilidade de oxigênio (LIMA; SODEK, 2003; AMARANTE; SODEK, 2006).

O processo de fixação de N_2 é bastante prejudicado pelo alagamento, quase que imediatamente (AMARANTE; SODEK, 2006), enquanto que as raízes entram em hipoxia apenas algumas horas depois do alagamento (SOUSA; SODEK, 2003). Apesar da limitação pelo O_2 mesmo em condições normais (HUNT et al., 1989), o nódulo possui um eficiente mecanismo de transporte de O_2 para suprir a respiração do bacterióide e assim fornecer energia para a fixação de N_2 . A falta de O_2 no nódulo é uma situação completamente diferente da de uma raiz inundada, principalmente devido ao mecanismo que envolve leghemoglobina, que permite ao nódulo funcionar

sob baixas concentrações de O_2 . Uma comparação de respostas para baixa concentração de O_2 livre, revela aspectos interessantes do nódulo e da fisiologia da raiz, contribuindo para a compreensão dos processos envolvidos (SOUZA; SODEK, 2002), o que pode ser constatado pelas respostas diferenciadas entre nódulos e raízes quanto às variáveis avaliadas nesse trabalho.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em soja, a deficiência de oxigênio no sistema radicular causa o aumento da atividade das enzimas fermentativas, ADH, PDC e LDH em raízes e nódulos, tanto em resposta a decréscimos rápidos de O_2 disponível, induzido artificialmente por enriquecimento de N_2 gasoso na rizosfera (experimento I), quanto em resposta a decréscimos mais lentos, devido ao consumo de O_2 pela respiração celular (experimento II), seguindo reposta dependente do tempo de estresse.

O estresse por hipoxia induz o acúmulo de metabólitos anaeróbicos, principalmente etanol e lactato, resultado da alta atividade enzimática e também altera o metabolismo de carboidratos para o provimento de energia a planta sob déficit de O_2 .

Com o retorno à normoxia há diminuição considerável da atividade das enzimas fermentativas bem como dos teores de metabólitos e alterações no metabolismo de carboidratos.

Os efeitos da rápida depleção de O_2 (experimento II) são muito mais pronunciados, evidenciados pelo aumento da atividade das enzimas fermentativas, esses efeitos também refletem em significativas alterações dos teores de metabólitos anaeróbicos e carboidratos.

O genótipo Fundacep 53 RR demonstra maior tolerância aos efeitos hipóxicos e pós-hipóxicos em relação à BRS Macota, em ambos os experimentos, pois além de apresentar maior eficiência em induzir a atividade das enzimas fermentativas e teor de metabólitos durante a hipoxia, restabelece mais rapidamente a atividade e os teores de metabólitos aos níveis pré-hipóxicos com o retorno a normoxia.

REFERÊNCIAS

AMARANTE, L.; SODEK, L. Waterlogging effect on xylem sap glutamine of nodulated soybean. **Biologia Plantarum**, v. 50, p.405-410, 2006.

ANDRADE, A. C. S., RAMOS, F. N., SOUZA, A. F., LOUREIRO, M. B., BASTOS, R. Flooding effects in seedlings of *Cytherexylum myrianthum* Cham. and *Genipa americana* L.: responses of two neotropical lowland tree species. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, p. 281-285, 1999.

ANDREEV, V.Y., GENEROZOVA, I.P., VARTAPETIAN, B.B. Energy status and mitochondrial ultrastructure of excised pea root at anoxia and post-anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.29, p. 171-176, 1991.

ARMSTRONG, W.; STRANGE, M.E.; CRINGLE, S.; BECKETT, P.M. Microelectrode and modeling study of oxygen distribution in roots. **Annals of Botany**, v. 74, p. 287-299, 1994.

ARMSTRONG, W.; WEBB, T.; DARWENT, M.; BECKETT, P.M. Measuring and interpreting respiratory critical oxygen pressures in roots. **Annals of Botany**, v. 103, p. 281-293, 2009.

AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENEAS FILHO, J.; DE ABREU, C. E. B.; GOMES FILHO, E. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p.87-94, 2006.

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L.A.C.J. Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. **Annual Review Plant Biology**, v. 59, p. 313-339, 2008.

BALESTRASSE, K. B.; GARDEY, L.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Response of antioxidant defense system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. **Plant Physiology**, v. 28, p. 497- 504, 2001.

BARRET-LENNARD, E.G., LEIGHTON, P.D., BUWALDA, F., GIBBS, J., ARMSTRONG, W., THOMSON, C.J., GREENWAY, H. Effects of growing wheat in hypoxic nutrient solutions and of subsequent transfer to aerated solutions. I. Growth and carbohydrate status of shoots and roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.15, p. 585-598, 1988.

BARTA, A.L. Supply and partitioning of assimilates to roots of *Medicago sativa* L. and *Lotus corniculatus* L. under anoxia. **Plant Cell and Environmental**, v. 10, p. 151-156, 1987

BENAMAR, A.; ROLLETSCHEK, H.; BORISJUK, L.; AVELANGE-MACHEREL, M.H.; CURIEN, G.; MOSTEFAL, H.A.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; MACHEREL, D. Nitrite–nitric oxide control of mitochondrial respiration at the frontier of anoxia. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1777, p. 1268-1275, 2008.

BIELESKI, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.17, p. 278- 293, 1966.

BIENIAWSKA , Z.; BARRATT , D.H.P.; GARLICK , A.P.; THOLE , V. , KRUGER, N.J.; MARTIN , C. Analysis of the sucrose synthase gene family in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 49, p: 810-828, 2007.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHRISTIANSON, J.A.; LLEWELLYN, D.J.; DENNIS, E.S.; WILSON, I.W. Global gene expression responses to waterlogging in roots and leaves of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Physiology**, v. 51, p. 21-37, 2010.

COLMER, T.D. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. **Plant Cell Environmental**, v. 26, p. 17-36, 2003.

CRAWFORD, R.M.M.; BRÄNDLE, R. Oxygen deprivation stress in a changing environment. **Journal Experimental Botany**, v 47, p. 145-159, 1996.

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 Experimental Botany**, v. 51, n. 342, p.89-97, 2000.

DENNIS, E.S.; MILLAR, A.; DOLFERUS, R.; OLIVE, M.; BRUXELLES, G.; PEACOCK, W.J. Molecular analysis of the response to anaerobics stress. In: Adaptation of food crops to temperature and water stress: Proceedings of an International Symposium. Taiwan: **Asian Vegetable Research and Development Center**, v. 93, p. 59-67, 1992.

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.

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

FAN, T.W.M.; HIGASHI, R.M.; FRENKIEL, T.A.; LANE, A.N. Anaerobic nitrate and ammonium in flood-tolerant rice coleoptiles. **Journal of Experimental Botany**, v.48, p.1655-1666, 1997.

FAN T.W.M., HIGASHI, R.M.; LANE, A.N. An in vivo ¹H and ³¹P NMR investigation of the effect of nitrate on hypoxic metabolism in maize roots. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 266, p. 592-606, 1988.

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.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia. Is survival a balancing act? **Trends Plant Science**, v. 9, p. 1403-1409, 2004.

GEIGENBERGER, P.; FERNIE, A.R.; GIBON, Y.; CHRIST, M.; STITT, M. Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. **Biological Chemistry**, v. 381, p. 723-740, 2000.

GEIGENBERGER P. Response of plant metabolism to too little oxygen. **Current Opinions in Plant Biology**, v. 6, p. 247-256, 2003.

GRAHAM, D.; SMYDZUC, J. Use of anthrone in the quantitative determination of hexose phosphates. **Analytical Biochemistry**, v. 11, p. 246-255, 1965.

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

GOOD, A.G.; MUENCH, D.G. Long-term anaerobic metabolism in root tissue. **Plant Physiology**, v. 101, p.1163-1168, 1993.

HANDEL, E.V. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, v. 22, p. 280-283, 1968.

HANSON, A.D.; JACOBSEN, J.V. Control of Lactate dehydrogenase, lactate glycolysis, and α -amilase by O₂ deficit in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, v. 74, p. 566-572, 1984.

HANSON, A.D.; JACOBSEN, J.V.; ZWAR, J.A. Regulated expression of three alcohol dehydrogenase genes in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, v. 75, p. 573-581, 1984.

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.

HORCHANI, F.; KHAYATI, H.; RAYMOND, P.; BROUQUISSE, R.; ASCHI-SMITI, S. Contrasted effects of prolonged root hypoxia on tomato root and fruit (*Solanum lycopersicum*) metabolism. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 195, p. 313-318, 2009.

HUANG, B; JOHNSON, J.W Root respiration and carbohydrates status of two wheat genotypes in response to hypoxia. **Annals of Botany**, v. 75, p. 427-432, 1995.

HUNT, S.; KING, B.J.; LAYZELL, D.B. Effects of gradual increases in O₂ concentration on nodule activity in soybean. **Plant Physiology**, v. 91, p. 315-321, 1989.

JACKSON, M. B.; COLMER, T. D. Response and adaptation by plants to flooding stress. **Annals of Botany**, v. 96, p. 501-505, 2005.

JACKSON, M.B., HERMAN, B., GOODENOUGH, A. An examination of the importance of ethanol in causing injury to flooded plants. **Plant Cell and Environmental**, v.5, p. 163-172, 1982.

KATO-NAGUCHI, H. Evaluation of the importance of lactate for the activation of ethanolic fermentation in the lettuce in anoxia. **Plant Physiology**, v. 109, p. 28-33, 2000.

KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E.; FOX, T.C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, v.100, p. 1-6, 1992.

KOLB, R.M.; JOLY, C.A. Flooding tolerance of *Tabebuia cassinoides*: Metabolic, morphological and growth responses. **Flora**, v. 204, p. 528-535, 2009.

KUK, Y. I.; SHIN, J. S.; BURGOS, N. R.; HWANG, T. E.; HAN, O.; CHO, B. H.; JUNG, S.; GUH, J. O. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. **Crop Science**, v.43, p.2109-2117, 2003.

KUMUTHA, D.; SAIRAM, R.K.; EZHILMATHI, K.; CHINNUSAMY, V.; MEENA, R.C. Effect of waterlogging on carbohydrate metabolism in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.):

Upregulation of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase. **Plant Science**, v. 175, p. 706-716, 2008.

KURSTEINER, O.; DUPUIS, I.; KUHLEMEIER, C. The *Pyruvate decarboxylase1* gene of *Arabidopsis* is required during anoxia but not other environmental stresses. **Plant Physiology**, v.132, p.968-978, 2003.

LAMPRECHT, W.; HEINZ, F. Pyruvate. In: BERGMAYER, H.U. (ed) **Methods of enzymatic analysis**, vol 6. VCH, Weinheim, pp 570–577, 1984

LAYZELL, D.B. HUNT, S.; PALMER, G.R. Mechanism of nitrogenase inhibition in soybean nodules: Pulse-modulated spectroscopy indicates that nitrogenase activity is limited by O₂. **Plant Physiology**, v. 92, n.4, p. 1101-1107, 1990.

LIMA, J.D.; SODEK, L. N-stress alters aspartate and asparagine levels of xylem sap in soybean. **Plant Science**, v. 165, p. 649-656, 2003.

MAGALHÃES, P. C.; COELHO, C. H. M.; GAMA, E. E. G.; BORÉM, A. Avaliação dos ciclos de seleção da variedade BRS 4154 – Saracura para tolerância ao encharcamento do solo. 2005. Embrapa Clima Temperado. **Circular Técnica**, 67p.

MAGALHÃES, P. C.; COELHO, C. H. M.; GAMA, E. E. G.; BORÉM, A. Avaliação das modificações morfológicas radiculares durante os ciclos de seleção do milho Saracura tolerante a hipóxia. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo**, p. 1217-1981, 2009.

McCREADY, R.M.; GUGGOLS, J., SILVEIRA, V.; OWENS, H.S. Determination the starch and amilose in vegetables. Applications to pea. **Analytical Chemistry**, v. 22, p. 1156-1158, 1950.

MILLAR, A.A.; DENNIS, E.S. Protein synthesis during oxygen deprivation in cotton. **Australian Journal Plant Physiology**, v.23, p.341-348, 1996.

MILLAR, A.A.; OLIVE, M.R.; DENNIS, E.S. The expression and anaerobic induction of alcohol-dehydrogenase in cotton. **Biochemical Genetics**, v.32, p. 279-300, 1994.

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.

MUSTROPH, A.; LEE, S.C.; OOSUMI, T.; ZANETTI, M.E.; YANG, H.; MA, K.; YAGHOUBI-MASIHI, A.; FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Cross-kingdom comparison of transcriptomic adjustments to low-oxygen stress highlights

conserved and plant-specific responses. **Plant Physiology**, v. 152, p. 1484-1500, 2010.

MUSTROPH, A.; BOAMFA, E.I.; LAARHOVEN, L.J.J.; HARREN, F.J.M.; ALBRECHT, G.; GRIMM, B. Organ-specific analysis of the anaerobic primary metabolism in rice and wheat seedlings. I: Dark ethanol production is dominated by the shoots. **Planta**, v. 225, p.103-114, 2006.

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.

OLIVEIRA, S.V.; REYS, M.A. Estruturação e consolidação da produção do biodiesel - base de soja - no Rio Grande do Sul. **Revista Extensão Rural**, v. 17, p. 93-116, 2009.

PEDERSEN, O.; RICH, S.M.; COLMER, T.D. Surviving floods: leaf gas films improve O₂ and CO₂ exchange, root aeration, and growth of completely submerged rice. **Plant Journal**, v. 58, p. 147-156, 2009.

PERATA, P., ALPI, A. Plant responses to anaerobiosis. **Plant Science**, v.93, p. 1-17, 1993.

REGGIANI, R.; NEBULONI, M.; MATTANA, M.; BRAMBILLA, I. Anaerobic Accumulation of Amino Acids in Rice Roots: Role of the Glutamine Synthetase/Glutamate Synthase cycle. **Amino Acids**, v.18; p.207-217, 2000.

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-NESE, A., SODEK, L., FERNIE, A.R., VAN DONGEN, J.T. Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle Are Linked by Alanine Aminotransferase during Hypoxia Induced by Waterlogging of *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, v. 152, p. 1501-1513, 2010a.

ROCHA, M., SODEK, L.; LICAUSI, F.; HAMEED, M.W.; DORNELAS, M.C.; VAN DONGEN, J.T. Analysis of alanine aminotransferase in various organs of soybean (*Glycine max*) and in dependence of different nitrogen fertilisers during hypoxic stress. **Amino Acids**, v. 39, p. 1043-1503, 2010b.

SACHS, M.M.; FREELING, M.; OKIMOTO, R. The anaerobic proteins of maize. **Cell**. v.20, p. 761-767, 1980.

SAIRAM , R.K.; KUMUTHA , D.; EZHILMATHI , K.; DESHMUKH , P.S.; SRIVASTAVA , G.C. Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. **Biologia Plantarum**, v. 52, p. 401-412, 2008.

SAIRAM, R. K.; KUMUTHA, D.; VISWANATHAN, C.; RAMESH, C.M. Waterlogging-induced increase in sugar mobilization, fermentation, and related gene expression in the roots of mung bean (*Vigna radiata*). **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 602-616, 2009.

SHINGAKI-WELLS, R.N.; HUANG, S.; TAYLOR, N.L.; CARROLL, A.J.; ZHOU, W.; HARVEY MILLAR, A. Differential molecular responses of rice and wheat coleoptiles to anoxia reveal novel metabolic adaptations in amino acid metabolism for tissue tolerance. **Plant Physiology**, v. 156, p. 1706-1724, 2011.

SCOTT, H.D.; ANGULO, J.; DANIELS, M.B.; WOOD, L.S. Flood duration effects on soybean growth and yield. **Agronomy Journal**, v.81, p. 631-636, 1989.

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.

SPRINGER, B.; WERR, B.; STARLINGER, P.; BENNETT, D.C.; FREELING, M. The shrunken gene on chromosome 9 of *Zea mays* L. in expressed in various plant tissues and encode an anaerobic protein. **Molecular Gen. Genetics**, v. 220, p. 461-468, 1986.

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. **Environmental and Experimental Botany**, v.50, p.1-8, 2003.

SOUSA, C.A.F DE.; SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.14, p.83-94, 2002.

SUBBAIAH, C. C.; SACHS, M. M. Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. **Annals of Botany**, v. 90, p. 119-127, 2003.

TADEGE, M.; DUPUIS, I.; KUHLEMEIER, C. Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. **Trends in Plant Sciences**, v. 4, p. 320-325, 1999.

THOMAS, A.L.; GUERREIRO,S.M.C.; SODEK, L. Aerenchyma formation and recovery from hypoxia of the flooded root system of nodulated soybean. **Annals of Botany**, v. 96, p. 1191-1198, 2005.

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, 2000.

VAN DONGEN, J.T.; FRÖHLICH, A.; RAMÍREZ-AGUILAR, S.J.; SCHAUER, N.; FERNIE, A.R.; ERBAN, A. Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentration in the roots of *Arabidopsis* plants. **Annals Botany**, v. 103, p. 269-280, 2009.

VAN DONGEN, J.T.; GUPTA, K.J.; RAMÍREZ-AGUILAR, S.J.; ARAÚJO, W.L.; NUNES-NESE, A.; FERNIE, A.R. Regulation of respiration in plants: A role for alternative metabolic pathways. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 1434-1443, 2011.

VAN DONGEN, J.T.; SCHURR, U.; PFISTER, M.; GEIGENBERGER, P. Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. **Plant Physiology**, v. 131, p. 1529-1543, 2003.

VITORINO, P. G., ALVES, J. D., MAGALHÃES, P. C., MAGALHÃES, M. M., LIMA, L. C. O., OLIVEIRA, L. E. M. Flooding tolerance and cell wall alterations in maize mesocotyl during hypoxia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 1027-1035, 2001.

VOESENEK, L.A.C.J.; COLMER, T.D.; PIERIK, R.; MILLENAAR, F.F.; PEETERS, A.J.M. How plants cope with complete submergence. **New Phytologist**, v. 170, p. 213-26, 2006.

WANG, K.; BIAN, S.; JIANG, Y. Anaerobic metabolism in roots of *Kentucky bluegrass* in response to short-term waterlogging alone and in combination with high temperatures. **Plant Soil**, v. 314, p. 221–229, 2009.

YIN, D.; CHEN, S.; CHEN, F.; GUAN, Z.; WEIMIN, F. Morpho-anatomical and physiological responses of two *Dendranthema* species to waterlogging. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, p. 122-130, 2010.

ZABALZA, A.; VAN DONGEN, J.T.; FROEHLICH, A.; OLIVER, S.N.; FAIX, B.; GUPTA, K.J.; SCHMÄZLIN, E.; IGAL, M.; ORCARAY, L.; ROYUELA, M.; GEIGENBERGER, P. Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. **Plant Physiology**, v. 149, p.1087-1098, 2009.

ANEXO

Tabela 1. Análise de variância para as variáveis atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH), piruvato descarboxilase (PDC) e lactato desidrogenase (LDH) em raízes de cultivares de soja submetida a períodos de hipoxia

Fonte de variação ^a	G.L.	Quadrados médios		
		ADH	PDC	LDH
R	1	22,757**	2,361**	0,033**
P	3	1,191**	0,469**	0,008**
G	1	0,507**	0,141**	0,002**
R x P	3	0,446**	0,455**	0,004**
G x R	1	0,030**	0,132**	0,002**
G x P	3	0,095**	0,008**	0,0002*
G x R x P	3	0,027**	0,008**	0,0003**
C.V. (%)		127,002	15,526	18,514

(**)/(*) Significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

(^a) R = regime hídrico; P = período; G = genótipo.

Tabela 2. Análise de variância para as variáveis atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH), piruvato descarboxilase (PDC) e lactato desidrogenase (LDH) em raízes de cultivares de soja submetida a períodos de pós-hipoxia

Fonte de variação ^a	G.L.	Quadrados médios		
		ADH	PDC	LDH
R	1	5,087**	8,423**	0,0002
P	3	0,136**	0,653**	0,360**
G	1	0,057**	0,004	0,008
R x P	3	0,993**	0,836**	0,117**
G x R	1	0,0003	0,711**	0,001
G x P	3	0,019**	0,483**	0,049
G x R x P	3	0,026**	0,816**	0,094*
C.V. (%)		22,492	17,443	7,590

(**)/(*) Significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

(^a) R = regime hídrico; P = período; G = genótipo.

Tabela 3. Análise de variância para as variáveis atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH), piruvato descarboxilase (PDC) e lactato desidrogenase (LDH) em nódulos de cultivares de soja submetidos a períodos de hipoxia

Fonte de variação ^a	G.L.	Quadrados médios		
		ADH	PDC	LDH
R	1	4,427**	1,585**	0,615**
P	3	0,046**	0,214**	0,064**
G	1	0,166**	1,600**	1,186**
R x P	3	0,109**	0,220**	0,034**
G x R	1	0,048**	0,206**	0,002
G x P	3	0,014**	0,204**	0,026**
G x R x P	3	0,016**	0,014	0,014**
C.V. (%)		3,662	44,428	15,015

(**)/(*) Significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

(^a) R = regime hídrico; P = período; G = genótipo.

Tabela 4. Análise de variância para as variáveis atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH), piruvato descarboxilase (PDC) e lactato desidrogenase (LDH) em nódulos de cultivares de soja submetidos a períodos de pós-hipoxia

Fonte de variação ^a	G.L.	Quadrados médios		
		ADH	PDC	LDH
R	1	2,163**	0,495**	0,278**
P	3	0,084**	0,091**	0,071**
G	1	0,060**	0,558**	0,743**
R x P	3	0,115**	0,003	0,032**
G x R	1	0,016	0,128**	0,012*
G x P	3	0,013*	0,045**	0,030**
G x R x P	3	0,028**	0,011**	0,008*
C.V. (%)		6,954	30,416	10,973

(**)/(*) Significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

(^a) R = regime hídrico; P = período; G = genótipo.