

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
FISIOLOGIA VEGETAL**



**Respostas Bioquímicas e Fisiológicas de Plantas Noduladas de  
Soja submetidas à Hipoxia**

**PABLO GERZSON BADINELLI**

**Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Pelotas, sob orientação do  
Prof. Luciano do Amarante, como parte  
das exigências do Programa de Pós-  
graduação em Fisiologia Vegetal, para  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
(M.S).**

**PELOTAS**

**Rio Grande do Sul - Brasil**

**2008**

**PABLO GERZSON BADINELLI**

**Respostas Bioquímicas e Fisiológicas de Plantas Noduladas de  
Soja submetidas à Hipoxia**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof. Luciano do Amarante, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Ciências (M.S).**

APROVADA: 05 de dezembro de 2009

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Nei Fernandes Lopes

---

Prof. Dr. Antonio Costa Oliveira

---

Prof. Dr. Luciano do Amarante  
(Orientador)

Dados de catalogação na fonte:  
( Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744 )

B114r Badinelli, Pablo Gerzson

Respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas noduladas de soja submetidas à Hipoxia / Pablo Gerzson Badinelli. - Pelotas, 2008.

100f. : graf.

Dissertação ( Mestrado ) –Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2008, Luciano do Amarante, Orientador.

1. ADH 2. Glycine max 3. AlaAT 4. Deficiência de oxigênio 5. Carboidratos 6. Aminoácidos 7. Ureídeos 8. Crescimento  
I Amarante, Luciano do (orientador) II .Título.

CDD 633.34

Aos meus pais Guilmen Edson Gonçalves Badinelli e Nelma Rosana Gerzson Badinelli, por seu exemplo de vida, empenho e dedicação para comigo, durante a minha formação moral e intelectual.

A minha companheira e meu amor Lilian Madruga de Tunes, pelo seu apoio, compreensão e por estar sempre presente nos momentos mais difíceis.

Aos meus avós Darci Carlos Ferreira Badinelli, Eunice Gonçalves Badinelli, Edgar de Moura Gerzson e Lia Daufollo Gerzson, pelo seu exemplo de sabedoria e humildade.

Aos poucos e verdadeiros amigos, simplesmente por sua amizade.

Dedico

*É melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta sem conhecer o sabor da vitória nem da derrota.*

*Theodore Roosevelt*

## **Agradecimentos**

A Deus, por ser minha fonte de inspiração e sabedoria para transpor meus obstáculos.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPel) por proporcionar-me a obtenção do título de mestre em Ciências.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa - Terras Baixas, em especial ao pesquisador Francisco de Jesus Verneti Júnior, por sua colaboração durante a fase de experimentação.

Ao professor, orientador e amigo Luciano do Amarante, por me incluir na essência de sua profissão, por acreditar no meu potencial, por sua amizade e principalmente pela sua persistência e humildade.

Aos professores Antonio Carlos de Souza Albuquerque Barros, Antonio Costa Oliveira, Beatriz Helena Gomes Rocha, Denise dos Santos Colares, Nei Fernandes Lopes, Massako Takahashi Dourado e Ronaldo do Nascimento, pelo apoio e conhecimento transmitido.

Aos amigos Géri Eduardo Meneghello, Suzi Braga, Rérinton Joabél, em especial aos amigos Lúcio Kerber Canabarro, Simone Pohl e Vera Borges.

A todos os demais amigos e demais pessoas que acreditaram e me apoiaram durante minha formação acadêmica e profissional.

## Resumo

BADINELLI, Pablo Gerzson, M.S., Universidade Federal de Pelotas, novembro de 2008. **Respostas Bioquímicas e Fisiológicas de Plantas Noduladas de Soja à Hipoxia**. Orientador: Prof. Dr. Luciano do Amarante.

A deficiência de oxigênio causada por chuvas e irrigações, pode-se tornar freqüente em regiões de solos hidromórficos, onde a drenagem é deficiente, limitando o cultivo de espécies economicamente importantes e em conseqüência o desenvolvimento sócio-econômico destas regiões. A soja [*Glycine max* (L). Merrill] é uma espécie originária de áreas alagadiças do norte da China e apresenta variabilidade genética para tolerar o excesso de umidade no solo. Quando as plantas são submetidas à hipoxia o metabolismo fermentativo é ativado com a finalidade de manter a produção de energia e agentes redutores, embora com menor eficiência, até a planta retornar ao estado de normoxia. Este trabalho teve como objetivo esclarecer algumas variações metabólicas e adaptações morfofisiológicas em dois cultivares de soja nodulada contrastantes em relação às condições de alagamento, durante o estado de hipoxia e pós-hipoxia dos sistemas radiculares. Os genótipos BRS-153 (suscetível) e BRS-154 (tolerante) foram cultivados em casa de vegetação, em vasos contendo vermiculita lavada como substrato, inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SEMIA 587 e nutridas com solução nutritiva desprovida de N. O tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 repetições, tendo como unidade experimental duas plantas por vaso. Aos dados quantitativos aplicou-se análise de variância e, nos casos significativos, aplicou-se análise de regressão. Quando não houve ajuste de curva, comparou-se as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O tratamento hipóxico foi aplicado no estágio de desenvolvimento R2, mantendo-se as plantas inundadas por até 12 dias. As plantas foram coletadas aos 3, 6, 9 e 12

dias de inundação e após 1, 2, 3 e 9 dias após drenagem dos vasos com plantas sob nove dias de inundação. Avaliaram-se os parâmetros de crescimento: diâmetro do caule, massa seca de raiz, caule, folhas e vagens, volume de raiz, número de vagens e parâmetros bioquímicos: atividades das enzimas alanina aminotransferase (AlaAT; EC 2.6.1.2) e álcool desidrogenase (ADH; EC 1.1.1.1) e teor de metabólitos: açúcares solúveis totais, sacarose, polissacarídeos solúveis em água, amido, aminoácidos totais e proteínas totais em nódulos e raízes e ureídeos em seiva de xilema. Conclui-se que houve diferença de resposta entre os dois cultivares quanto a maioria dos parâmetros avaliados em relação aos períodos de hipoxia e pós-hipoxia. As atividades das enzimas ADH e AlaAT elevaram-se durante o alagamento, tanto para raízes como para nódulos e retornaram a níveis pré-hipóxicos durante o período de recuperação. Nos nódulos as atividades das duas enzimas foram mais expressivas do que em raízes.

Palavras-chave: deficiência de oxigênio, ADH, AlaAT, carboidratos, *Glycine max*, aminoácidos, ureídeos, crescimento



## Abstract

BADINELLI, Pablo Gerzson, M.S., Universidade Federal de Pelotas, novembro de 2008. **Biochemical and Physiological Responses of Nodulated Soybean to Hypoxia**. Orientador: Prof. Dr. Luciano do Amarante.

Oxygen deficiency caused by rains and irrigations can be frequent in hydromorphic soils. In these areas, deficient drainage can limit growth of economically important species and in consequence can result in areas with restrict socioeconomic development. Soybean [*Glycine max* (L). Merrill] is originated from the northern chinese waterlogged areas and consequently of its genetic variability of this specie for soil humidity excess tolerance. When plants are subjected to hypoxic conditions, the fermentative metabolism is activated with the purpose of maintaining the energy production and reducing agents, although of smaller efficiency, until the plant return to the normoxia state. In this work, some metabolic variations and morphophysiological adaptations were studied in two nodulated soybean cultivars, contrasting for tolerance to flooding conditions, during the hypoxia and post-hypoxia state of the root system. The genotypes BRS-153 (susceptible) and BRS-154 (tolerant) were grown under green house conditions, in pots containing washed vermiculite, inoculated with the SEMIA 587 strain of *Bradyrhizobium elkanii* and N-free nutrient solution. The experimental design was completely randomized with four replicates, considering two plants in a pot as a repetition. Quantitative data were subjected to an analysis of variance, and when the means were significant, regression analysis was applied. In the cases that no adjustment was possible, the means were compared by the Tukey's test ( $P \leq 0,05$ ). The hypoxic treatment was applied at stage R2, during 12 days. Plants were collected at 3, 6, 9 and 12 days after flooding and 1, 2, 3 and 9 days after the drainage of the pots which plants were flooded during nine days. Morphological parameters such diameter of the stem, dried mass of roots, leaves and green pods, root volume, green pods number and

biochemical analysis as alanine aminotransferase (AlaAT; EC 2.6.1.2) and alcohol deshydrogenase (ADH; EC 1.1.1.1) activities and total content of soluble sugars, sucrose, water-soluble polyssacharides, starch, free amino acids and proteins in nodules and roots and ureides in the xylem sap were analysed. Hypoxia and post-hypoxia conditions caused different effects among the two cultivars in relation to the most of the parameters studied. Activities of the ADH and AlaAT were stimulated by flooding in roots and in nodules and returned to pre-hypoxic treatments during the recovery period. In the nodules the activities of the two enzymes were more expressive than in the roots.

Key words: deficiency of oxygen, ADH, AlaAT, carbohydrates, *Glycine max*, amino acids, ureides, growth

## Lista de Figuras

### Capítulo I:

- Figura 1. Diâmetro do caule de cultivares de soja nodulada, e BRS-153(A e B) e BRS- 154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de inundação e drenagem do sistema radicular após nove dias de inundação. \* $P \leq 0,05$ ;  $n=4$ .....31
- Figura 2. Volume do sistema radicular de cultivares de soja nodulados, BRS-153 (A) e BRS-154 (B), submetidos a diferentes períodos de inundação e recuperação do sistema radicular após nove dias de inundação. \* $P \leq 0,05$ ;  $n=4$ .....32
- Figura 3. Massa seca de raízes de dois cultivares de soja nodulados, submetidos a diferentes períodos de inundação do sistema radicular (A) e dos cultivares BRS-153 (B) e BRS-154 (C), submetidos a diferentes períodos de recuperação do sistema radicular, após nove dias de inundação. \* $P \leq 0,05$ ;  $n=$ .....33
- Figura 4. Massa seca de folhas de cultivares de soja nodulados, BRS-153 e BRS-154, submetidos a diferentes períodos de inundação (A) e de recuperação do sistema radicular após nove dias de inundação (B). Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), para período e regime hídrico respectivamente,  $n=4$ .....34

Figura 5. Razão entre a massa seca da parte aérea e do sistema radicular de dois cultivares de soja nodulados submetidos a diferentes períodos de inundação do sistema radicular (A) e dos cultivares BRS-153 (B) e BRS-154 (C) em diferentes períodos de recuperação do sistema radicular após nove dias de inundação. \* $P \leq 0,05$ ;  $n=4$ .....35

Figura 6. Massa seca de vagens de cultivares de soja nodulados, BRS-153 (A e B) e BRS- 154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de inundação e drenagem do sistema radicular após nove dias de inundação. (A e C) Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) para período e regime hídrico respectivamente. (B e D) \* $P \leq 0,05$ ;  $n=4$ . .....36

Figura 7. Número de vagens de cultivares de soja nodulados, BRS-153 (A e B) e BRS- 154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de inundação e drenagem do sistema radicular após nove dias de inundação. \* $P \leq 0,05$ ;  $n=4$ .....38

## Capítulo II:

Figura 1. Teores de ureídeos totais em seiva de xilema de genótipos de soja nodulada, BRS-153 (A e B) e BRS-154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de  $O_2$ . \* $P \leq 0,05$ ,  $n=4$ .....50

Figura 2. Teores de aminoácidos totais em raízes de genótipos de soja nodulada, BRS-153 (A) e BRS-154 (B), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular, após nove dias de déficit de

O<sub>2</sub>. (A e B) \*P≤0,05. (C) Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente; n=4.....51

Figura 3. Teores de aminoácidos totais em nódulos de genótipos de soja, BRS-153 (A e B) e BRS-154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de O<sub>2</sub>. Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente, n=4.....53

Figura 4. Teores de proteínas totais em raízes de genótipos de soja nodulada, BRS-153 e BRS-154, submetidos a diferentes períodos de hipoxia do sistema radicular. \*P≤0,05, n=4.....54

Figura 5. Teores de proteínas totais em nódulos de genótipos de soja nodulada, BRS-153 e BRS-154, submetidos a diferentes períodos de hipoxia (A) e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de O<sub>2</sub> (B). Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a P≤0,05, para período e regime hídrico respectivamente. \*P≤0,05, n=4.....55

Figura 6. Atividade da enzima alanina aminotransferase em raízes de genótipos de soja nodulada BRS-153 (A) e BRS-154 (B) sob hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de O<sub>2</sub> (C). (A e B) \*P≤0,05. (C) Valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (\*P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente; n=4.....57

Figura 7. Atividade da enzima alanina aminotransferase em nódulos de genótipos de soja nodulada BRS-153 (A) e BRS-154 (B), sob hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de O <sub>2</sub> (C). Valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (*P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente, n=4. .....	58
---	----

### Capítulo III:

Figura 1. Fluxograma da extração Álcool desidrogenase e Alanina aminotransferase.....	67
Figura 2. Fluxograma da extração de metabólitos, sendo TCA (ácido tricloro acético), MCW (metanol : clorofórmio : água), WSP (polissacarídeos solúveis totais) e PCA (ácido perclórico).....	68
Figura 3. Atividade da enzima álcool desidrogenase em raízes de genótipos de soja nodulada, BRS-153 (A e B) e BRS-154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular, após nove dias de déficit de O <sub>2</sub> . (A e C) *P≤0,05. (B e D) Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente; n=4.....	71
Figura 4. Atividade da enzima álcool desidrogenase em nódulos de genótipos de soja, BRS-153 (A e B) e BRS-154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de O <sub>2</sub> . (A e C) *P≤0,05. (B e D); Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente; n=4.....	73

Figura 5. Teores de sacarose em raízes de genótipos de soja nodulada, BRS-153 (A e B) e BRS-154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de O<sub>2</sub>. (A e C) \*P≤0,05 (B e D); Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente; n=4.....75

Figura 6. Teores de sacarose em nódulos de genótipos de soja, BRS-153 (A e B) e BRS-154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de O<sub>2</sub> (B e D). Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente; n=4.....76

Figura 7. Teores de açúcares solúveis totais em raízes de genótipos de soja nodulada, BRS-153 (A e B) e BRS-154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de O<sub>2</sub>. (A e C) \*P≤0,05 (B e D); Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente; n=4.....78

Figura 8. Teores de açúcares solúveis totais em nódulos de genótipos de soja, BRS-153 (B) e BRS-154 (C), submetidos a diferentes períodos de hipoxia (A) e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de O<sub>2</sub> (B e C). Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente, n=4.....79

Figura 9. Teores de polissacarídeos solúveis em água de raízes de genótipos de soja nodulada, BRS-153 (A e B) e BRS-154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de O<sub>2</sub>. (A e C) \*P≤0,05 (B e D); Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente; n=4.....81

Figura 10. Teores de polissacarídeos solúveis em água em nódulos de genótipos de soja nodulada, BRS-153(A e B) BRS-154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de O<sub>2</sub>. Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente, n=4.....82

Figura 11. Teores de amido em nódulos de genótipos de soja nodulada, BRS-153 (A) e BRS-154 (C), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de O<sub>2</sub>. Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente, n=4.....83



## Índice

Resumo.....	vi
Abstract.....	viii
Lista de figuras.....	x
Abrevedaturas.....	xvii
1. Introdução geral.....	19
2. Crescimento de cultivares de soja nodulada sob influência de diferentes períodos de inundação e drenagem do sistema de cultivo.....	25
2.1 Introdução.....	26
2.2 Material e métodos.....	28
2.3 Resultados e discussão.....	30
2.4 Conclusões.....	40
3. Atividade da alanina aminotransferase e teor de compostos nitrogenados em raízes e nódulos de genótipos de soja submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia.....	41
3.1 Introdução.....	42
3.2 Material e métodos.....	44
3.3 Resultados e discussão.....	48
3.4 Conclusão.....	59
4. Atividade da enzima álcool desidrogenase e alocação de carboidratos no sistema radicular de soja nodulada durante período de hipoxia e retorno a normoxia.....	60
4.1 Introdução.....	61
4.2 Material e métodos.....	63
4.3 Resultados e discussão.....	69
4.4 Conclusões.....	84
5. Referências bibliográficas.....	86

## Abreviaturas

Ala – L-alanina

AlaAT – alanina aminotransferase

ADH – álcool desidrogenase

AST – açúcares solúveis totais

ATP – adenosina trifosfato

BSA – soroalbumina bovina / fração V

DAD – dias após a drenagem

DAE – dias após a emergência

DAI – dias após a inundação

DO – densidade óptica

DTT – Ditioneitol

EROs – espécies reativas ao oxigênio

FAD – flavina adenosina dinucleotídeo

LDH – lactato desidrogenase

NAD<sup>+</sup> – β-nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada

NADH – β-nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida

PCA – ácido perclórico

PDC – piruvato descarboxilase

PVPP – polivinilpolipirrolidona

TCA – ácido tri-cloro acético

WSP – polissacarídeos solúveis totais

α-KG – 2-oxoglutarato

## INTRODUÇÃO GERAL

Estima-se que 6% da superfície terrestre são ocupados por áreas alagadas ou sujeitas ao alagamento temporário (MALTBY, 1991), onde a difusão de gases da atmosfera até o solo é fortemente afetada (ARMSTRONG et al., 1994).

No Brasil, estima-se que haja cerca de 28 milhões de hectares de solos sujeitos ao encharcamento (solos aluviais e hidromórficos) (MAGALHÃES et al., 2005). Grande parte dessas áreas encontram-se na região dos Cerrados e outra parcela (6,8 milhões de ha) na região sul do Brasil, sendo que cerca de 5,4 milhões de hectares estão no RS e poderiam ser incorporadas ao sistema de rotação de culturas (soja-arroz-pecuária). A diversificação e ou incorporação de novas culturas às áreas de várzea (solos hidromórficos), geralmente destinadas à produção de arroz irrigado, é uma forma de aumentar a eficiência do sistema produtivo. Esta prática vem sendo implementada nos EUA, na região baixa do Delta do Mississipi, com a incorporação das culturas do milho e da soja em rotação com o arroz irrigado (SCOTT e NORMAN, 2000).

O cultivo de arroz irrigado constitui a principal forma de exploração dos solos de várzea na região sul do Brasil e vários trabalhos têm sido conduzidos com a finalidade de buscar alternativas para cultivos nas várzeas arroseiras, proporcionando maior retorno econômico dessas áreas (BARNI et al., 1985; GASTAL et al., 1998). O grande problema é a difícil adaptação de culturas em solos alagados, uma vez que a maior parte das culturas produtoras de grãos são mesófitas. Buscam-se, como alternativas, espécies que permitam a utilização da mesma estrutura empregada no arroz, que apresentem tolerância às condições impostas pela inundação do solo e possuam elevado potencial de rendimento.

A soja é uma espécie originária de áreas alagadiças do norte da China (EVANS, 1996), que apresenta variabilidade genética para tolerar o excesso de umidade no solo (VAN TOAI et al., 1994; THOMAS et al., 2000; PIRES et al., 2002).

Nas condições brasileiras, a cultura da soja, principal produtora de óleo vegetal, além do consumo alimentício é matéria prima para a produção de biodiesel, apresenta-se como alternativa extremamente interessante e potencialmente viável para ocupar esse segmento. Ainda, a rotação de culturas em solos de várzea é uma prática recomendada para aumentar o rendimento de grãos de arroz, quer pelo efeito direto de quebrar o ciclo de insetos e pragas, moléstias e de plantas daninhas que prejudicam o desenvolvimento do arroz, ou pelo efeito indireto na melhoria das condições químicas e físicas do solo (IRGA, 2001).

O avanço do cultivo da soja em áreas de várzea tem como conseqüência o aumento da demanda do desenvolvimento de cultivares adaptados a esses ambientes, impulsionado pela baixa rentabilidade do arroz nos últimos anos em relação à soja, em vista dos menores custos de produção dessa cultura e o valor das terras do planalto do Estado do Rio Grande do Sul, onde é cultivada, serem muito mais elevadas que as terras de produção de arroz.

O efeito do estresse por saturação hídrica do solo sobre as plantas é complexo e dependente do estágio de desenvolvimento da planta (VAN'T WOUT e HAGAN, 1974; MOMEN et al., 1979; TAIZ e ZEIGER, 1991; SALISBURY e ROSS, 1992) e do período de exposição a esse estresse (BARNI e COSTA, 1975; GOMES et al., 1992). A saturação hídrica do solo, aplicada às leguminosas, prejudica o desenvolvimento das raízes e da parte aérea e também a fixação de nitrogênio pelo sistema radical, em virtude de reduzir o oxigênio para os nódulos, resultando numa redução do número de nódulos por área de raízes (BARNI e COSTA, 1975; DE WIT, 1978). A tolerância ao encharcamento para a cultura da soja foi demonstrada por COSTA (1973), submetendo as plantas à saturação hídrica do solo por um período de quatro meses, as quais permaneceram vivas, completaram o ciclo e produziram grãos. Ainda, a falta de O<sub>2</sub> no sistema radicular da planta de soja, além de inibir a fixação simbiótica, também inibe a absorção de nitrogênio e outros minerais, inibindo o crescimento das raízes e a nodulação (SALLAM e SCOTT, 1987). Então, o transporte de N ou outros minerais para a parte aérea pode ser inadequado, resultando em plantas raquíticas e cloróticas (NATHANSON et al., 1984). A

diminuição das taxas de assimilação líquida e expansão foliar provocam a diminuição da taxa de crescimento da cultura da soja e, conseqüentemente, proporcionam menor rendimento de grãos (LINKEMER et al., 1998).

O encharcamento modifica a atmosfera do solo, pois promove deficiência de  $O_2$ , acúmulo de  $CO_2$ , metano, etileno, gás sulfídrico ( $H_2S$ ), hidrogênio e redução da respiração aeróbica. O crescimento das raízes paralisa em poucos minutos, com o limite de tolerância das raízes de soja em relação ao  $CO_2$ , que é 20% na atmosfera do solo (COSTA, 1996). Esse ambiente provoca alterações no metabolismo das raízes, passando de aeróbico para anaeróbico devido à falta de acceptor final de elétrons, levando a paralisação do ciclo de Krebs (KENNEDY et al., 1992). Apesar do estresse, existem espécies que conseguem sobreviver ao alagamento, devido a mecanismos de adaptações morfológicas, metabólicas e anatômicas (VARTAPETIAN e JACKSON, 1997).

As leguminosas são geralmente sensíveis às inundações e o alagamento do solo, limitando seu crescimento, pois os nódulos precisam de  $O_2$  para manter a respiração aeróbica necessária para suprir a grande quantidade de ATP indispensável à atividade da nitrogenase. Apesar de terem adaptações como a proteína condutora de  $O_2$  para otimizar o suprimento de  $O_2$ , a maioria das leguminosas terrestres não é suficientemente capaz de aumentar o fornecimento de  $O_2$  para dentro de seus nódulos enquanto inundadas (LOUREIRO et al., 1995). Entretanto, a fixação simbiótica de  $N_2$  na soja pode se aclimatar à inundação e a recuperação da fixação coincide com a formação de aerênquima e raízes adventícias (BACANAMWO e PURCELL, 1999a, THOMAS et al., 2005).

O suprimento de carboidratos e a regulação do metabolismo de carboidratos e de energia são importantes na superação do estresse hipóxico (ANDREEV et al., 2001; SCHUSSLER et al., 2000). Porém, em aparente contradição ao aumento no consumo de carboidratos sob hipoxia, muitas plantas acumulam açúcares (ALBRECHT e BIEMELT, 1998), aminoácidos e reservas, como amido (BARTA, 1987), quando submetidas à deficiência de  $O_2$ .

Com a inundação, o segmento submerso do caule da planta de soja apresenta hipertrofia e formação de um tecido esponjoso na base do caule, com rompimento da epiderme (PIRES et al., 2002). Nesse segmento, ocorre o desenvolvimento de raízes adventícias que apresentam aerênquima lisígeno. Nas

raízes laterais há o desenvolvimento de aerênquima no córtex, também ocorre o rompimento da epiderme (BACANAMWO e PURCELL, 1999a; PIRES et al., 2002). Nos nódulos submetidos à baixa pressão parcial de O<sub>2</sub> ou inundação, por períodos prolongados, ocorre a hipertrofia de lenticelas com formação de aerênquima (PANKHURST e SPRENT, 1975; DAKORA e ATKINS, 1989; PARSON e DAY, 1990; THOMAS et al., 2005).

De uma maneira geral, as plantas para se desenvolverem necessitam de um ponto de equilíbrio entre a quantidade de água disponível no solo e o espaço ocupado pelo ar no solo. O oxigênio é vital no fornecimento de energia para as vias celulares, e sua presença ou ausência determina a atividade metabólica e produção de energia. Ele serve como um aceptor de elétrons na fosforilação oxidativa que regenera o ATP, principal fonte de energia para o metabolismo celular, por meio da regeneração do NAD<sup>+</sup>, viabilizando o poder de sustentação das vias bioquímicas, como por exemplo a glicólise (DENNIS et al., 2000). Sem O<sub>2</sub> a respiração mitocondrial cessa por falta de um aceptor de elétron. Isso resulta na queda de 36 para 2 mols de ATP por mol de glicose metabolizada.

As plantas respondem à deficiência de oxigênio alterando seu metabolismo energético, de modo que a energia necessária à sua sobrevivência passa a ser obtida, predominantemente, por meio do processo fermentativo, tanto em plantas tolerantes como não tolerantes. Em tecidos hipóxicos/anóxicos, o conteúdo de piruvato aumenta assim como o de enzimas glicolíticas. Sob hipoxia/anoxia as enzimas fermentativas piruvato descarboxilase (PDC), álcool desidrogenase (ADH) e lactato desidrogenase (LDH) são induzidas em consequência da necessidade em aumentar a glicólise para compensar a baixa produção de ATP devido à inativação da fosforilação oxidativa (SAGLIO et al., 1999; SATO et al., 2002). Os produtos da fermentação, acetaldeído, etanol e lactato acumulam, permitindo a regeneração de NAD<sup>+</sup> a partir de NADH. A regeneração de NAD<sup>+</sup> pelas enzimas fermentativas ADH e LDH é vital para a tolerância à hipoxia/anoxia porque, na ausência de NAD<sup>+</sup>, a glicólise cessa (ISMOND et al., 2003; KURSTEINER et al., 2003). O acúmulo limitado de lactato e maior controle do pH citoplasmático constituem também parte da estratégia que confere tolerância à hipoxia e anoxia. Além desses produtos pode ocorrer o acúmulo de alanina (PUIATTI e SODEK, 1999; SOUZA e SODEK, 2003; THOMAS et al., 2005), a qual pode ter grande importância no retorno à normoxia

pela conversão em piruvato por meio da reação de transaminação catalisada pela atividade da enzima alanina aminotransferase (SOUZA e SODEK, 2003; MIYASHITA et al. 2007).

Em plantas sob condições normais de oxigenação, essas vias estão ausentes ou com atividade bastante reduzida, mas são rapidamente induzidas em baixa concentração de O<sub>2</sub>, 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 O<sub>2</sub> (DENNIS et al., 2000).

A injúria e morte das raízes é atribuída ao acúmulo de metabólitos tóxicos produzidos durante a fermentação (principalmente o etanol), a falta de substratos para a respiração e a diminuição no metabolismo energético (DREW, 2000). Observou-se em abóbora após 10-15 h de anoxia que a baixa carga de energia, levou as células à morte porque ocorreu degradação da ultra-estrutura da mitocôndria (VARTAPETIAN et al., 2003). Esse fenômeno não pode ser revertido mesmo sendo restabelecida a aeração. A ultra-estrutura mitocondrial pode ser preservada por intermédio da hidrólise do amido de reserva e ativação de enzimas da fermentação que limitam esses efeitos (BAXTER-BURRELL et al., 2002).

O período de recuperação é de extrema importância, pois mesmo após a drenagem do ambiente hipóxico, a re-oxigenação do meio pode causar uma segunda condição estresse, causado pela formação de espécies reativas de oxigênio e pode ser um fator limitante quanto a sobrevivência das plantas. Este estresse é gerado nos primeiros minutos da restauração da oxigenação do meio provocando injúrias pós-anóxicas, como a peroxidação de lipídeos em espécies intolerantes, o que tem sido amplamente documentado (BIEMELT et al., 1998; BLOKHINA et al., 1999; BLOKHINA et al., 2003).

A exploração de áreas alagadas com espécies de importância econômica depende da identificação não somente de plantas que sobrevivam à inundação do solo, mas que também possam apresentar rendimentos capazes de trazer retorno econômico nessas condições ambientais. Para tanto, devem ser identificados os genótipos mais tolerantes em experimentos em casa de vegetação e a campo que reproduzam condições e períodos diferenciados de inundação. Posteriormente, as razões que levam à melhor adaptação, no aspecto anatômico, morfológico, metabólico e fisiológico devem ser conhecidas, possibilitando a transferência dessas

características para cultivares que não as possuem, por meio de técnicas de melhoramento (PIRES et al., 2002).

Nas décadas de 70 e 80, vários cultivares de soja testadas tiveram excelentes rendimentos de grãos em solos hidromórficos, destacando-se: Planalto, Bragg, Ipagro-20 e BR7 (BARNI, 1980; SACCOL, 1986), porém, nos últimos anos, esses cultivares não são mais recomendadas para o cultivo no Estado do Rio Grande do Sul.

Os cultivares atualmente recomendados são pouco conhecidos no que tange a adaptação ao encharcamento do solo, estabelecendo dificuldades para semeá-los nessas condições. O presente trabalho teve como objetivos avaliar respostas bioquímicas e fisiológicas dos cultivares BRS 153 e BRS 154 frente a diferentes períodos de hipoxia e de recuperação pós-hipoxia.



## **CAPÍTULO I**

### **CRESCIMENTO DE CULTIVARES DE SOJA NODULADA SOB INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PERÍODOS DE INUNDAÇÃO E DRENAGEM DO SISTEMA DE CULTIVO**

## INTRODUÇÃO

A soja possui grande importância na agricultura mundial, produz proteína de alta qualidade (BALESTRASSE et al., 2001) utilizada na formulação de rações para animais produtores de carne e seu óleo é um dos mais baratos, podendo ser utilizado tanto para o consumo humano, quanto para produção de biodiesel ou para a indústria química (DALL`AGNOL, 2008). Ao ser cultivada com *Bradyrhizobium*, forma associações simbióticas contribuindo para o aumento da entrada de nitrogênio combinado no solo, o que resulta numa economia superior a 3 bilhões de dólares por safra em fertilizantes nitrogenados no país (DOBEREINER, 1997).

No Rio Grande do Sul os solos de várzea ocupam uma área de aproximadamente 5,5 milhões de hectares (IBGE, 2007) e, dos 3,2 milhões destinados ao cultivo do arroz irrigado, anualmente utilizam-se aproximadamente 1 milhão de hectares com a cultura. Neste contexto, a cultura da soja surge como uma alternativa de cultivo às áreas de pousio e/ou drenagem deficiente, uma vez que utiliza praticamente a mesma infra-estrutura da lavoura de arroz (IRGA, 2001). Desta forma, contribuirá para o manejo adequado destas áreas, visto que a rotação de culturas é uma prática recomendada para aumentar o rendimento de grãos de arroz, quer pelo efeito direto de quebrar o ciclo de pragas, moléstias e plantas daninhas, ou pelo efeito indireto na melhoria das condições químicas e físicas do solo (IRGA, 2001). Entretanto, para que se obtenham esses benefícios, é necessário estudar espécies e cultivares que se adaptem às condições de excesso de água no solo e que proporcionem retorno econômico ao produtor.

Durante períodos prolongados de chuva ou de intensidade pluvial elevada, é possível que mesmo em locais bem drenados ocorra o alagamento temporário, tornando esses ambientes hipóxicos. Sob deficiência de O<sub>2</sub>, o metabolismo aeróbico é substituído pelo anaeróbico levando à paralisação do Ciclo de Krebs (COLLINS e

KENNEDY et al., 1992) e da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (BLOKHINA, 2000), tornando a glicólise e o metabolismo fermentativo o principal meio de obtenção de ATP pelas células vegetais (DENNIS et al, 2000).

A deficiência de O<sub>2</sub> causa a paralisação do crescimento dos nódulos (SALLAM e SCOTT, 1987), das raízes em poucos minutos, limitando sua tolerância em relação ao CO<sub>2</sub> (COSTA, 1996) e causando, também, a diminuição das taxas de assimilação líquida e expansão foliar, provocando a diminuição da taxa de crescimento da cultura da soja e, conseqüentemente, proporcionando menor rendimento de grãos (LINKEMER et al., 1998).

A tolerância ao estresse por alagamento em soja e outras espécies pode envolver adaptações morfológicas, anatômicas e metabólicas (THOMAS et al., 2005; VARTAPETIAN e JACKSON, 1997, SOUSA e SODEK, 2002; SOUSA e SODEK, 2003; BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008). No entanto, após o retorno das condições normais de O<sub>2</sub>, a recuperação do estresse hipóxico é dependente da espécie, do estágio da planta, da duração, da intensidade do estresse e do tempo de recuperação (SCOTT et al., 1989; OOSTERHUIS et al., 1990; FUKAO e BAILEY-SERRES, 2004). É importante considerar que a injúria pós-hipóxica pode ser mais prejudicial à planta do que a própria hipoxia, em decorrência da geração de radicais livres e produtos oxidativos tóxicos, como acetaldeído (VAN TOAI e BOLLES, 1991; BIEMELT et al. 1998), o que certamente influencia na retomada do crescimento da planta e produtividade.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar parâmetros de crescimento em dois genótipos de soja contrastantes quanto à tolerância ao alagamento durante diferentes períodos de inundação e drenagem do sistema de cultivo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Terras Baixas, situada no município do Capão do Leão, RS, entre dezembro de 2006 e março de 2007. Sementes de soja [(*Glycine max* (L.) Merrill)] dos cultivares BRS-154 (tolerante) e BRS-153 (suscetível) foram semeadas em vasos de polietileno furados, de três litros (5 sementes), contendo vermiculita como substrato. Duas inoculações das plântulas com *Bradyrhizobium elkanii*, estirpe SEMIA 587, fornecida pela FEPAGRO e reproduzida no DMP/IB/UFPel. Foram efetuadas aos 14 e 21 dias após a emergência, respectivamente nos estádios VC e R2 da classificação de FEHR et al. (1971), constituindo na pipetagem de 2,5mL de meio líquido de NORIS e DATE (1976) ao redor da plântula. No estágio V0 foi efetuado o desbaste deixando duas plantas por vaso. A partir da queda dos cotilédones e até o final do experimento, as plantas foram nutridas com solução de Hoagland e Arnon (1938) sem nitrogênio mineral, na proporção de 250 mL vaso<sup>-1</sup>, duas vezes por semana e irrigado com água sempre que necessário.

No estágio de desenvolvimento R2 - flor no nó imediatamente abaixo do nó mais alto com uma folha completamente desenrolada (FEHR et al.,1971) - procedeu-se a inundação do sistema radicular, submetendo as raízes à deficiência de O<sub>2</sub>. O tratamento foi realizado ao impedir-se a drenagem natural dos vasos por meio do encaixe do vaso contendo as plantas em outro, de mesmo modelo e não perfurado, aplicando-se a 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 O<sub>2</sub> foi

monitorado com o uso de um oxímetro (Handylab OX1), na solução nutritiva e na solução drenada dos vasos.

Os vasos dos experimentos de inundação e de recuperação foram inundados simultaneamente e as coletas para análise de crescimento foram realizadas aos 3, 6, 9 e 12 dias após a inundação (DAI). Aqueles destinados à avaliação de recuperação foram drenados no 9º DAI e as plantas foram coletadas no 1º, 2º, 3º e 9º dia após a drenagem (DAD). Para as variáveis diâmetro do caule e altura de planta foram realizadas medidas referentes ao dia de implantação do experimento (dia zero).

As medidas de altura de planta foram obtidas por meio de uma régua metálica milimetrada, entre o colo da planta até a inserção da folha mais jovem, enquanto o diâmetro do caule foi mensurado com paquímetro digital marca Panambra, modelo Pantec: 0-150mm/6", em milímetros, ao nível da lâmina da solução de inundação. Após a coleta das plantas, as raízes foram lavadas em água corrente para a remoção das partículas de vermiculita aderidas e enroladas em papel toalha para a retirada do excesso de umidade. Após, o volume do sistema radical foi determinado em proveta graduada pelo deslocamento da coluna de água devido a submersão das raízes.

A massa seca de raízes, caules, folhas e vagens foi determinada em balança analítica após desidratação dos tecidos em estufa de ventilação forçada a 65°C até que apresentassem massa constante. Entretanto, o número de vagens por planta foi obtido por contagem.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 x 2 (regime hídrico x dias de inundação ou de drenagem x genótipos) com quatro repetições. As médias obtidas foram submetidas à análise de variância e de regressão. Quando não houve adequação de curva de regressão, aplicou-se teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (GOMES, 1990). A análise estatística foi realizada com auxílio do pacote estatístico SAS (SAS, 2002).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de oxigênio, monitorado ao longo do experimento de inundação, variou entre 84 e 96% na solução nutritiva utilizada para inundação das plantas e entre 7 e 13%, 24h após tratamento, variando nesse intervalo ao longo de todo o experimento, demonstrando a condição de hipoxia do sistema utilizado.

No decorrer do experimento, a variável diâmetro do caule foi influenciada pela interação entre os fatores regime hídrico, período de tratamento e genótipos. As condições de hipoxia o diâmetro de ambos os cultivares logo aos três dias de inundação (Fig. 1A e 1C), sendo este efeito mais expressivo no cultivar BRS – 154 que continuou aumentando até o nono dia de inundação, tendendo à estabilidade no período posterior (Fig. 1C). O cultivar BRS – 153, por outro lado, respondeu de forma diferenciada, aumentando o caule em diâmetro até o sexto dia de inundação, tendendo à estabilidade nos demais períodos de tratamento (Fig. 1A). Em relação à resposta dos genótipos durante o período de recuperação após nove dias de inundação, houve um decréscimo contínuo no diâmetro da BRS - 153, com tendência a igualar aos valores do controle (Fig. 1B). Em contrapartida, a redução no diâmetro do caule do cultivar BRS - 154 até o terceiro dia de recuperação, ficando estável nos demais períodos, mas sempre maior que o controle (Fig. 1 D). Pires et al. (2002) ao estudarem adaptações morfofisiológicas de soja em solo inundado, concluíram que o diâmetro do caule sob a lâmina de água foi a característica mais importante na diferenciação de cultivares com vistas à tolerância à inundação, em decorrência da formação de rachaduras na região submersa, hipertrofia e formação de região esponjosa na base do caule, confirmando os resultados obtidos neste experimento.

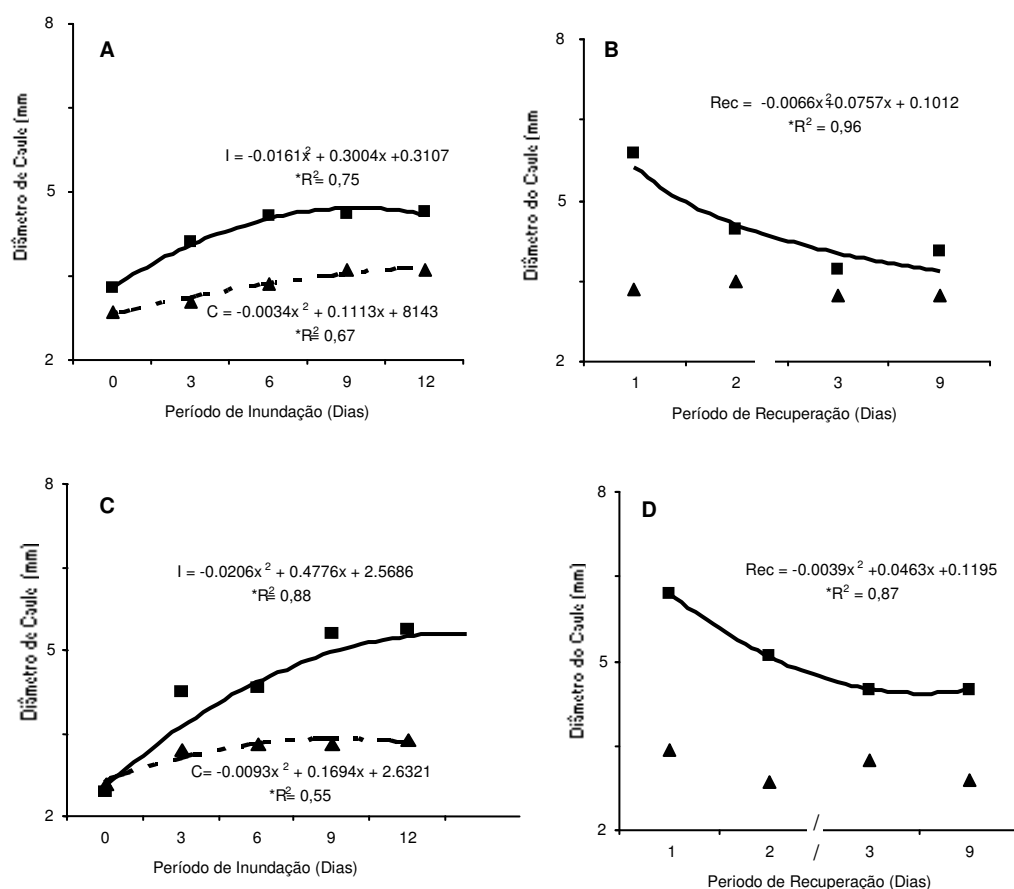


Figura 1- Diâmetro do caule de cultivares de soja nodulados, BRS-153 (A e B) e BRS- 154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de inundação e drenagem do sistema radicular após nove dias de inundação, sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação). \*P≤0,05; n=4.

O volume do sistema radical foi influenciado pela interação entre o regime hídrico e período de tratamento, não ocorrendo diferença de resposta entre genótipos. Os três primeiros dias de alagamento induziram o aumento do volume das raízes, possivelmente devido a modificações morfológicas como o desenvolvimento de raízes adventícias e formação de aerênquima. Assim, é possível que tais alterações tenham possibilitado a reversão parcial do metabolismo anaeróbico para aeróbico desencadeando a retomada da fixação do nitrogênio, através da utilização do oxigênio armazenado nas câmaras aerênquimáticas, provido da difusão do O<sub>2</sub> da água, buscando a sobrevivência da planta por mais tempo sob condições desfavoráveis ou até o retorno às condições de normoxia, conforme Thomas et al., (2005). A partir daí, ocorreu um decréscimo do volume das

raízes quando comparado com as plantas controle (Fig. 2A). Esses dados parecem concordar com os obtidos por Fox et al., (1994) que atribuíram a paralisação de crescimento por conta da diminuição na produção de ATP, conduzindo ao declínio da integridade e deterioração dos tecidos radiculares.

O volume do sistema radical aumentou com o passar dos dias, após a drenagem dos vasos, tendendo igualar-se ao das plantas controle no nono dia (Fig. 2B).

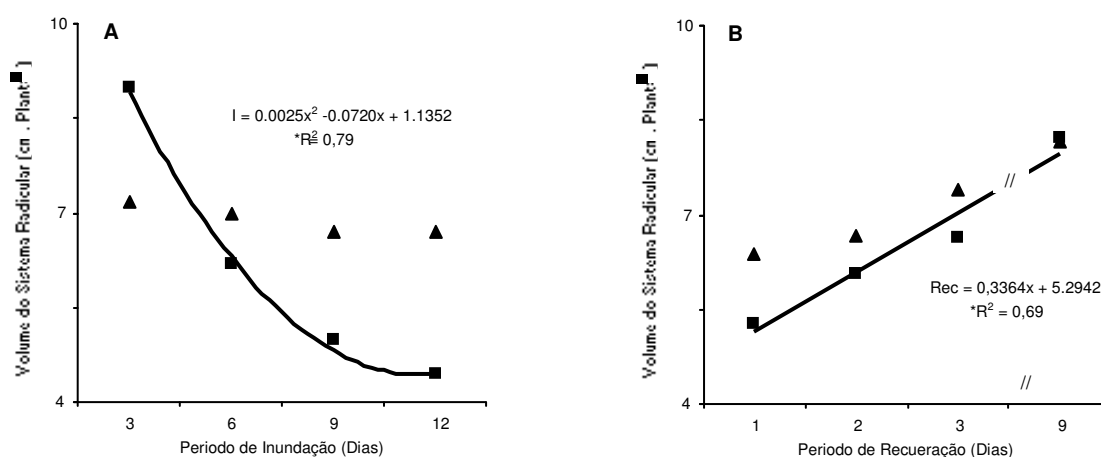


Figura 2 - Volume do sistema radicular de cultivares de soja nodulados, BRS-153 (A) e BRS-154 (B), submetidos a diferentes períodos de inundação e recuperação do sistema radicular após nove dias de inundação, sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação). \*P≤0,05; n=4.

O regime hídrico influenciou a massa seca de raízes durante o período de tratamento, não ocorrendo resposta diferenciada entre cultivares. Em relação ao controle, houve grande decréscimo nos valores de massa seca de raízes a partir do nono dia de inundação (Fig. 3A). Durante a recuperação, ambos os cultivares apresentaram elevação de massa seca (Fig. 3B e 3C), embora BRS-154 tenha demonstrado melhor resposta, atingindo níveis semelhantes ao do controle (Fig. 3B).



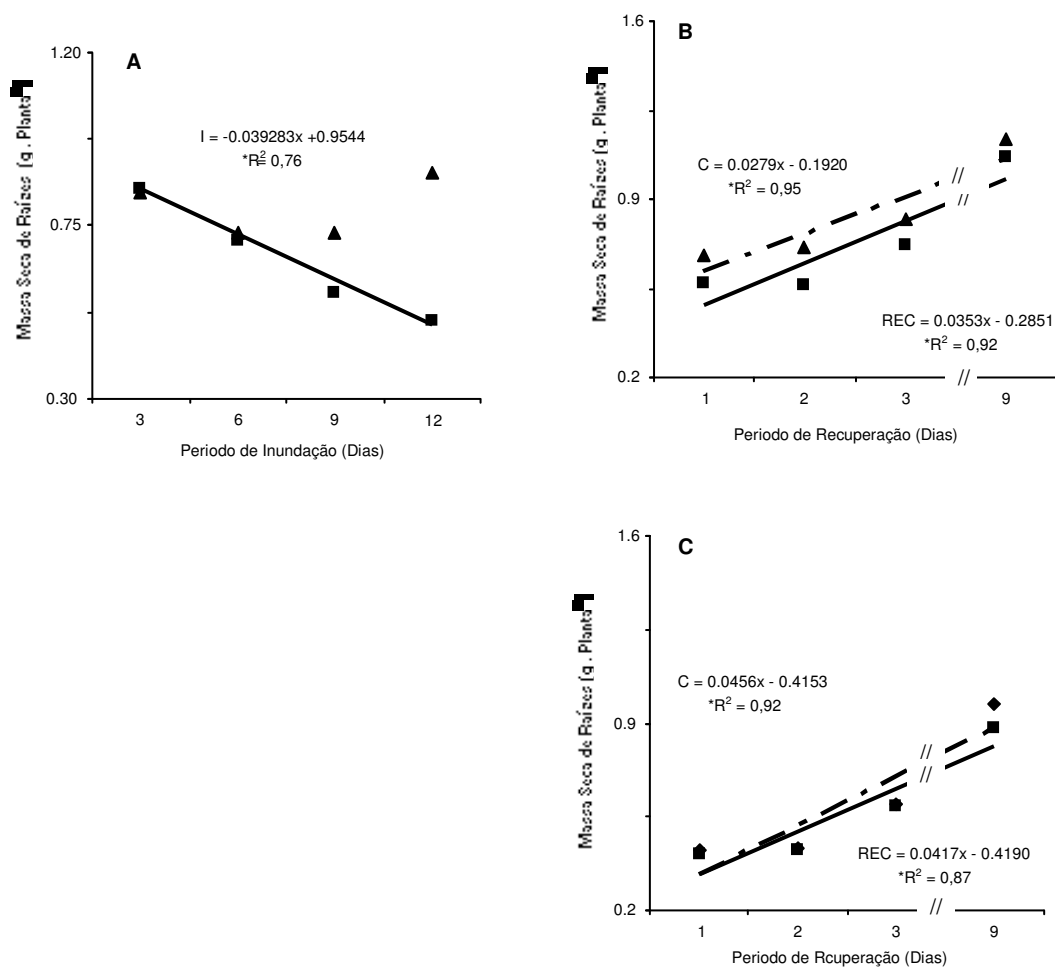


Figura 3 - Massa seca de raízes de dois cultivares de soja nodulados, submetidos a diferentes períodos de inundação do sistema radicular (A) e dos cultivares BRS-153 (B) e BRS-154 (C), submetidos a diferentes períodos de recuperação do sistema radicular, após nove dias de inundação, sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação). \* $P \leq 0,05$ ;  $n=4$ .

Em relação à variável massa seca de folhas (Wf), não houve ajuste de curva de regressão, tampouco diferença entre os cultivares de soja para os tratamentos de inundação e recuperação. A comparação de médias entre os dias de inundação demonstrou que houve redução significativa somente aos 12 DAI. Por outro lado, aos nove e 12 DAI, os valores observados foram inferiores aos do controle, evidenciando um efeito prejudicial da hipoxia sobre Wf (Fig. 4A). Os resultados obtidos concordam com os trabalhos de Sá et al., (2004), que avaliaram o efeito da velocidade de rebaixamento do nível freático no desenvolvimento e na produtividade

de plantas de ervilha e Costa (2004) que comparou o comportamento do capim-angola (*Brachiaria mutica*) e canarana verdadeira (*Echinochloa polystachya*) sob alagamento e Dias-Filho (2006), que avaliou as respostas morfológicas de *Brachiaria spp.* ao alagamento do solo. Após drenagem dos vasos, houve incremento da massa seca das folhas com o avanço do período de recuperação, equivalendo ao controle nos primeiros dias de supressão do estresse hipóxico (Fig. 4B), mostrando ganho de massa seca de folhas assim como Fries, (2003) observaram em plântulas de milho.

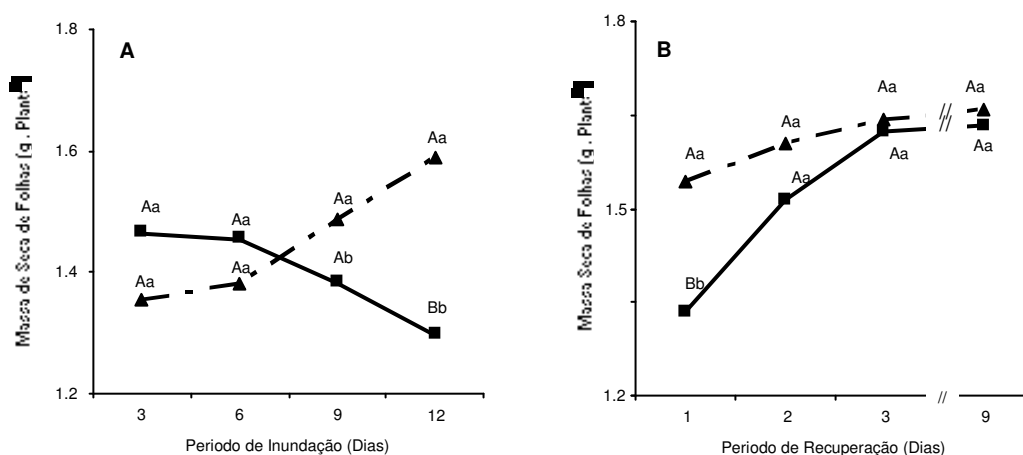


Figura 4 – Massa seca de folhas de cultivares de soja nodulados, BRS-153 e BRS-154, submetidos a diferentes períodos de inundação (A) e de recuperação do sistema radicular após nove dias de inundação (B).

▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação).

\*Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), para período e regime hídrico respectivamente,  $n=4$ .

O déficit de oxigênio também influenciou a razão entre a massa seca da parte aérea e a massa seca do sistema de raízes (PA/SR) no período de inundação, não ocorrendo diferença de resposta entre os cultivares. O aumento da razão PA/SR ocorreu após o terceiro dia de inundação, intensificando-se com o avanço do período de tratamento hipóxico (Fig. 5A), o que demonstra maior efeito inibitório do crescimento do sistema radicular em relação à parte aérea. Após a drenagem dos vasos, houve decréscimo da razão PA/SR ao longo dos dias. O cultivar BRS – 154 teve razão PA/SR equivalente ao controle no terceiro dia de retorno à normoxia, ao passo que BRS – 153 foi equivalente às plantas controle somente no nono dia de

recuperação (Fig. 5B e 5C). Segundo Jackson e Drew (1984) a redução da taxa de crescimento radicular é a primeira resposta ao estresse por excesso de água no solo. O metabolismo das raízes é rapidamente restringido quando a concentração de oxigênio no solo diminui a níveis críticos, o que não ocorre na parte aérea das plantas. Na parte aérea, a assimilação e o metabolismo respondem lentamente à inundação do solo (MUSGRAVE; VANHOY, 1989).

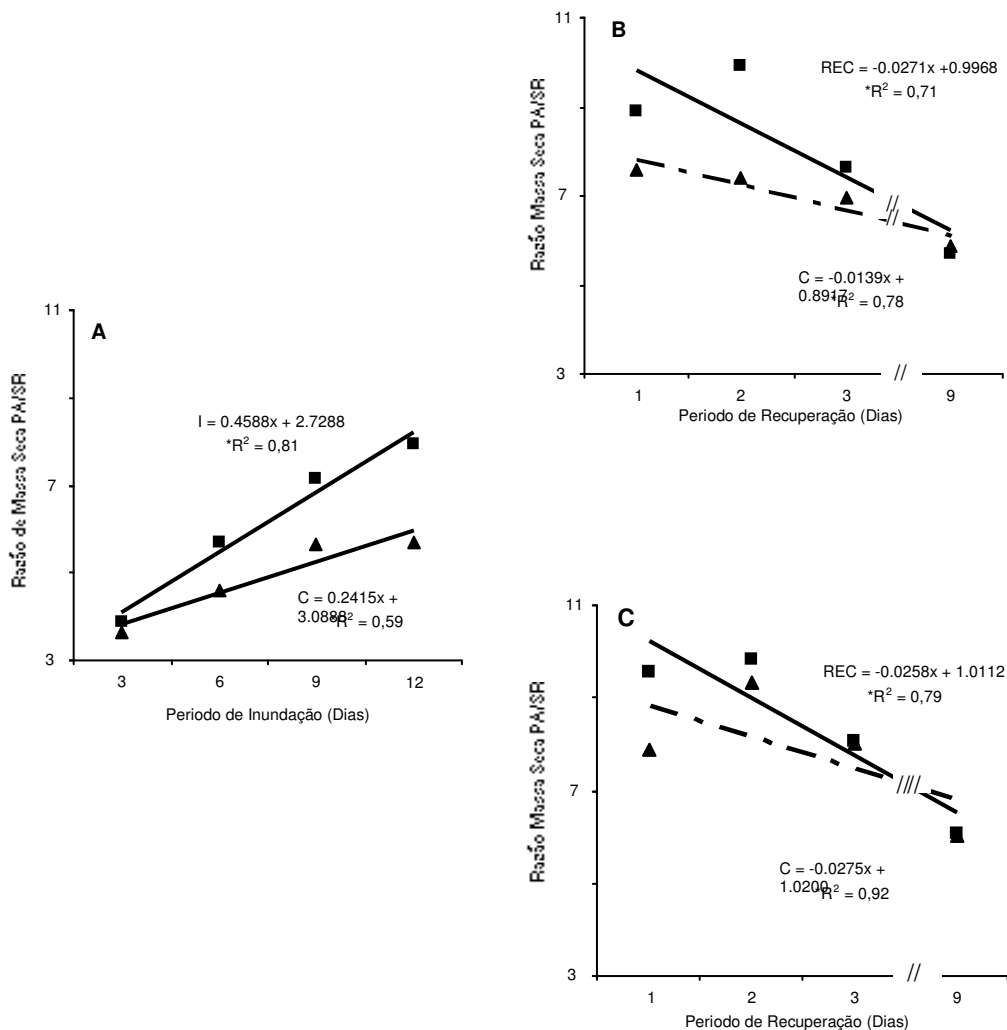


Figura 5 - Razão entre a massa seca da parte aérea (PA) e do sistema de raízes de dois cultivares de soja nodulados submetidos a diferentes períodos de inundação (A) e dos cultivares BRS-153 (B) e BRS-154 (C) em diferentes períodos de recuperação do sistema de raízes após nove dias de inundação, sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação).

\* $P \leq 0,05$ ;  $n=4$ .

O caráter massa seca de vagens (Wv) foi influenciado pela interação entre o fator inundação ou drenagem, período de tratamento e cultivar. Não houve ajuste de curva de regressão para o período de inundação, de modo que foi realizado teste de médias para comparar, entre si, os dias de alagamento e os regimes hídricos. Aos três e seis DAI ocorreu acréscimo em Wv das plantas inundadas em relação ao controle para os dois genótipos. Entretanto, aos nove DAI, a Wv de BR-153 foi inferior ao controle, o que se repetiu aos 12 DAI, ao passo que, para BR-154, essa resposta só foi observada no período mais alto de inundação (Fig. 6A e 6C). Com a drenagem das plantas foi pequena diminuição do acúmulo de Wv em BRS-153, sendo este efeito mais acentuado em BRS-154 nos tempos iniciais de drenagem, revertendo-se até o nono dia de recuperação da inundação (Fig. 6B e 6D).

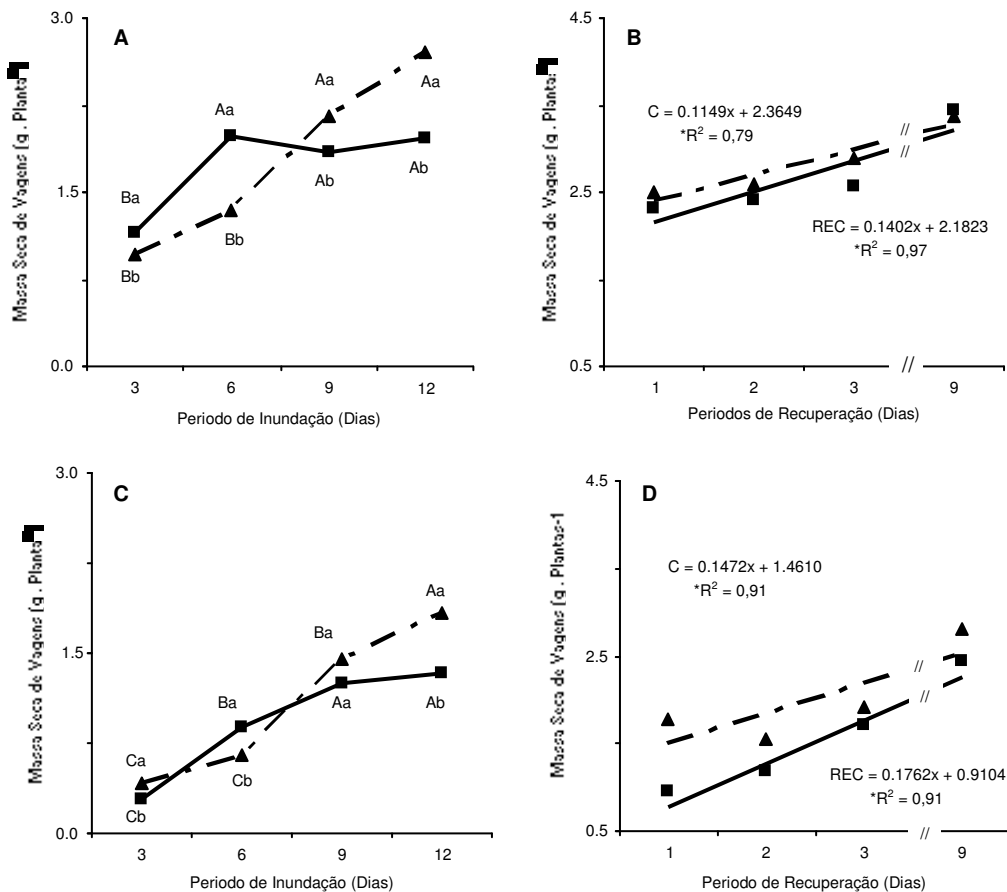


Figura 6 – Massa seca de vagens de cultivares de soja nodulados, BRS-153 (A e B) e BRS- 154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de inundação e drenagem do sistema radicular após nove dias de inundação, sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação).

\* Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) para período e regime hídrico respectivamente. (B e D) \* $P \leq 0,05$ ; n=4.

A variável número de vagens por planta foi influenciada, em ambos os experimentos, pela interação entre o fator inundação ou drenagem, período de tratamento e genótipo. Aos três DAI, BR-153 aumentou o número de vagens em relação ao controle, com posterior decréscimo, principalmente aos nove e 12 DAI. Enquanto isso, BR-154 teve redução no número aos três DAI com subsequente incremento que permitiu alcançar valores próximos ao controle até os nove DAI, apresentando, aos 12 DAI, severa diminuição na quantidade de vagens por planta (Fig. 7A e 7C). No primeiro dia de recuperação pós-hipoxia, os dois cultivares atingiram os valores do controle. Entretanto, o aumento nos dias após a drenagem dos vasos causou redução do número de vagens, efeito intensificado no cultivar BRS – 154 (Fig. 7B e 7D). Os resultados obtidos estão de acordo com Barni e Costa (1975) que ao estudarem efeitos de períodos de inundação do solo sobre o rendimento grãos de soja, perceberam que o componente de rendimento que mais decresceu foi o número de vagens por planta e neste mesmo trabalho evidenciaram que o período mais sensível ao alagamento foi o florescimento.

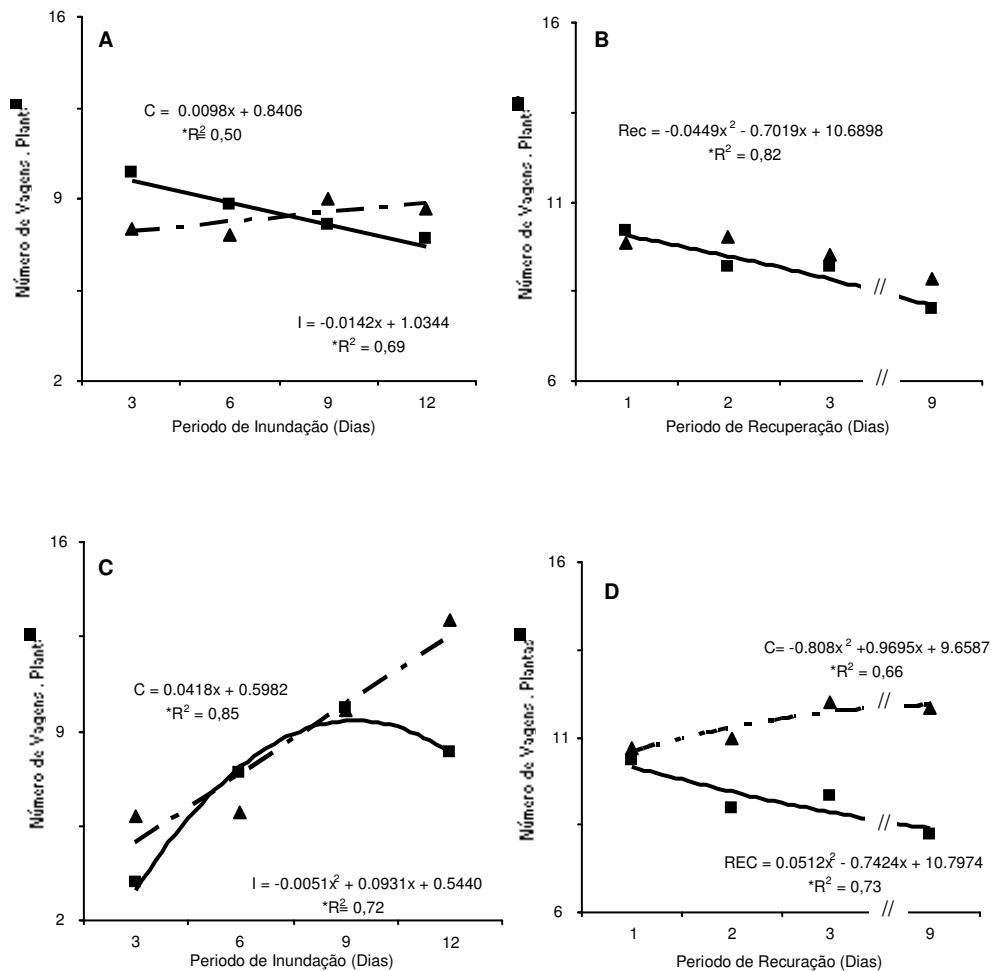


Figura 7 – Número de vagens de cultivares de soja nodulados, BRS-153 (A e B) e BRS- 154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de inundação e drenagem do sistema radicular após nove dias de inundação, sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação). \* $P \leq 0,05$ ;  $n=4$ .

Os resultados obtidos no presente trabalho revelam que dependendo do período de exposição ao estresse hipóxico e recuperação pós-hipóxia, existe diferenciação no comportamento das plantas, sendo influenciado pelo genótipo de cada espécie. Em função disso, as características de crescimento como diâmetro do caule, volume do sistema de raízes, massas secas de raiz, massa seca de folhas, massa seca de vagens, número de vagens e razão da parte aérea e sistema radical foram eficientes para diferenciar a adaptação dos cultivares submetidos a estas condições desfavoráveis.

No que concerne a influência do tratamento hipóxico sobre as diferentes características de crescimento, as relacionadas ao sistema radical sofreram maior inibição em relação às pertinentes à parte aérea, não ocorrendo diferença expressiva nas respostas dos genótipos analisados frente ao tratamento hipóxico ou período de recuperação pós-hipoxia para a maioria dessas características.

O alagamento por sete dias no estágio R2 em dois genótipos de soja reduz significativamente o acúmulo de massa seca durante o período de tratamento e a retomada do crescimento das plantas após supressão da hipoxia. O efeito inibitório desse curto período de tratamento reflete na produção de grãos, que oscila entre 40 e 52% para os genótipos testados (OOSTERHUIS et al., 1990).

O período de nove dias de inundação foi suficiente para causar redução do crescimento dos genótipos BRS-153 e BRS-154. No entanto, o efeito inibitório sobre as características avaliadas foi revertido após três dias de drenagem para a maioria das variáveis. O número de vagens por planta consistiu na característica mais influenciada negativamente, durante o período de drenagem. No entanto, não é possível afirmar se tal influência pode refletir em diferenças de rendimento, sobretudo em BRS-154, onde o efeito inibitório foi mais intenso. Diferentemente deste trabalho, Scott et al., (1990) afirma que ocorreu a recuperação do crescimento de oito genótipos de soja, após sete dias de inundação, iniciada no estágio R2, sendo retomada após um período superior a 14 dias, resulta em grande decréscimo da produção de grãos, inclusive quando comparado à inundação por igual período, nos estádios V1 e V4.

## 4 CONCLUSÕES

Os resultados permitiram concluir que a recuperação do estresse hipóxico depende do estágio de desenvolvimento em que as plantas são submetidas ao alagamento e esta resposta é dependente do cultivar, indicando que alguns cultivares são mais tolerantes ao alagamento do que outras quando o tratamento é aplicado sob determinado estágio.

As características de crescimento avaliadas são influenciadas pelo tratamento de inundação e de recuperação quando conduzidos no estágio R2 nos cultivares BRS-153 e BRS-154.

O cultivar BRS-154 é mais eficiente na produção de estruturas adaptativas no caule, quando comparada com o cultivar BRS-153

Ambos os genótipos tem períodos críticos para início de resposta inibitória por inundação ou de recuperação após drenagem, seis e três dias, respectivamente.



## **CAPÍTULO II**

### **ATIVIDADE DA ALANINA AMINOTRANSFERASE E TEOR DE COMPOSTOS NITROGENADOS EM RAÍZES E NÓDULOS DE GENÓTIPOS DE SOJA SUBMETIDOS A DIFERENTES PERIODOS DE HIPOXIA E PÓS-HIPOXIA**

## 1 INTRODUÇÃO

A 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; PIRES et al., 2002).

A deficiência de O<sub>2</sub> no sistema radicular causa uma série de efeitos em processos bioquímicos e fisiológicos, como inibição da fixação de N<sub>2</sub> (AMARANTE e SODEK, 2006), diminuição do transporte de fotoassimilados às raízes e redução da taxa fotossintética (HSU et al., 1999) e inibição da absorção de N e outros minerais (SALLAM e SCOTT, 1987).

As diferentes espécies vegetais podem dispor de mecanismos adaptativos para suportar ou mesmo superar o estresse hipóxico causado pelo alagamento, devido aos mecanismos de adaptações morfofisiológicas como formação de aerênquima (VARTAPETIAN e JACKSON, 1997; THOMAS et al., 2005), e adaptações metabólicas como interconversões de aminoácidos (REGGIANI et al., 1988; SOUSA e SODEK, 2003), síntese de polipeptídeos anaeróbicos (SACHS, 1980) e regulação do metabolismo de carboidratos (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008).

O metabolismo de aminoácidos é severamente alterado durante anoxia (RICARD et al., 1994) e a habilidade das raízes para tolerar o ambiente anaeróbio, quando o oxigênio não pode ser transportado da atmosfera, está associada com a capacidade de modificar seu metabolismo. Durante a hipoxia, as composições de aminoácidos nos tecidos de raízes e em seiva do xilema de plantas de soja mudaram substancialmente, onde a alanina foi produzida relativamente em grandes quantias, tornando-se um dos mais abundantes aminoácidos em raízes (SOUSA e SODEK, 2003).

A principal via de síntese da alanina sob hipoxia não é inteiramente entendida. Vários estudos demonstram aumentos expressivos na atividade da alanina aminotransferase (AlaAT; E.C 2.6.1.2) sob deficiência de oxigênio (GOOD e CROSBY 1989; SOUSA e SODEK, 2003; MIYASHITA et al., 2007). A AlaAT catalisa a reação reversível da interconversão do piruvato e glutamato à alanina e 2-oxoglutarato, participando então tanto do metabolismo do carbono quanto do metabolismo do nitrogênio (VEDAVATHI et al., 2004) sendo atribuído à esta enzima grande importância na adaptação metabólica da planta para tolerância à deficiência de oxigênio (RICOULT et al., 2005).

O período inicial da recuperação após o estresse por falta de oxigênio pode ser crucial na sobrevivência das plantas. Apesar da maioria das injúrias acontecer durante o período de estresse, danos também ocorrem no retorno das plantas às condições normais de oxigênio (VAN TOAI e BOLLES, 1991).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as variações dos teores de compostos nitrogenados e a atividade da enzima alanina aminotransferase (AlaAT) em raízes e nódulos de genótipos de soja submetidos a diferentes períodos de hipoxia e retorno à normoxia.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Terras Baixas, situada no município do Capão do Leão, RS, entre dezembro de 2006 e março de 2007. Sementes de soja [(*Glycine max* (L.) Merrill)] dos cultivares BRS-154 (tolerante) e BRS-153 (suscetível) foram semeadas em vasos de polietileno furados, de três litros (5 sementes), contendo vermiculita como substrato. Duas inoculações das plântulas com *Bradyrhizobium elkanii*, estirpe SEMIA 587, fornecida pela FEPAGRO e reproduzida no DMP/IB/UFPel. Foram efetuadas aos 14 e 21 dias após a emergência, respectivamente nos estádios VC e R2 da classificação de FEHR et al. (1971), constituindo na pipetagem de 2,5mL de meio líquido de NORIS e DATE (1976) ao redor da plântula. No estágio V0 foi efetuado o desbaste deixando duas plantas por vaso. A partir da queda dos cotilédones e até o final do experimento, as plantas foram nutridas com solução de Hoagland e Arnon (1938) sem nitrogênio mineral, na proporção de 250 mL vaso<sup>-1</sup>, duas vezes por semana e irrigado com água sempre que necessário.

O tratamento de inundação do sistema de raízes, foi efetuado no estágio de desenvolvimento R<sub>2</sub> (FEHR et al.,1971) procedeu-se à aplicação, impedindo-se a drenagem natural dos vasos por meio do encaixe de um segundo vaso não perfurado sob o vaso contendo as plantas e aplicando-se solução nutritiva diluída três vezes, de forma a se manter uma lâmina de 20mm sobre a superfície do substrato. As plantas permaneceram inundadas por 12 dias, porém, aquelas destinadas à avaliação do período pós-hipoxia foram drenadas no nono dia após inundação (DAI), pela retirada dos vasos não perfurados. O teor de O<sub>2</sub> foi monitorado na solução nutritiva e na solução drenada dos vasos, usando um oxímetro (Handylab OX1).

No experimento de inundação foram coletados material para análise aos três, seis, nove e doze dias de tratamento. No experimento de recuperação, as coletas do material foram feitas após um, três e nove dias de tratamento.

A seiva do xilema foi coletada para a dosagem de ureídeos, após cortar o caule da planta em forma de bisel, logo abaixo do nó cotiledonar conforme descrito por McCLURE e ISRAEL (1979). Os exsudatos foram coletados por até uma hora, com o uso de microcapilares de vidro, e transferidos para tubos *ependorf* em banho de gelo até o armazenamento final sob temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ . Os tecidos foram coletados do terço inferior do sistema radicular, lavados em água corrente e em água destilada gelada, retirando-se o excesso de umidade com papel toalha.

As amostras de raízes (2g) e de nódulos (0,5g) foram armazenadas sob temperatura de aproximadamente  $-86^{\circ}\text{C}$ , para posterior dosagem da atividade de AlaAT e determinação da concentração de proteínas totais e aminoácidos totais.

A extração da AlaAT de amostras dos tecidos de raízes e nódulos foi realizada a  $4^{\circ}\text{C}$ , sendo maceradas em almofariz previamente resfriado. A maceração de raízes foi realizada na presença de aproximadamente 100mL de  $\text{N}_2$  líquido, utilizando PVPP a 5% p/pMF, 10mL de tampão extração (Tris-HCL 50mM, pH7,5 contendo DTT 1mM). Após serem maceradas, foram filtradas em 8 camadas de gaze umedecidas com tampão de extração e centrifugadas a 10.000g, entre 2 e  $4^{\circ}\text{C}$  por 20min. Do sobrenadante centrifugado retirou-se uma alíquota de 2,5mL para dessalinização por cromatografia de exclusão em coluna de Shephadex G-25 médio (PD 10; Amersham Pharmacia Biotech). O extrato eluído foi utilizado para os ensaios enzimáticos.

A atividade da enzima AlaAT (EC 2.6.1.2) foi determinada no sentido da formação do piruvato, por meio do acoplamento de duas reações (alanina  $\rightarrow$  piruvato  $\rightarrow$  lactato), utilizando cubetas descartáveis de 4mL de polimetilmetacrilato. O meio de reação em volume final de 3mL continha: Ala 10mM;  $\alpha$ -KG 5mM;  $\beta$ -NADH 0,2mM; Tris - HCL - pH7,5 - 50mM e 5 unidades da proteína LDH. As cubetas contendo tampão de dosagem, Ala,  $\alpha$ -KG e  $\beta$ -NADH, foram previamente incubadas no sistema de aquecimento Peltier a  $30^{\circ}\text{C}$ . A reação era iniciada pela adição do extrato enzimático e da LDH no meio de reação. As leituras de queda de absorbância a 340nm foram registradas em intervalos de 10seg em espectrofotômetro PG - Instruments.

A extração dos metabólitos de raízes e de nódulos foi realizada conforme BIELESKI e TUNER (1966). Os tecidos das raízes (com N<sub>2</sub> líquido) e nodulares foram macerados em almofariz e homogeneizados com solução extratora "MCW" (metanol: clorofórmio: água; proporção 12:5:3), empregando 10mL g<sup>-1</sup>, e transferidos para frascos âmbar, permanecendo em repouso por 24h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2.000rpm por 30min. A fração do sobrenadante foi recuperada em proveta e por 4mL, acrescentando 1,0mL de clorofórmio e 1,5mL de água pura (Milli-Q), sendo agitadas em seguida e deixadas em repouso por 24h para a separação das fases. A fase aquosa (superior) foi coletada e evaporada em banho-maria a 38,8 °C por 15h para eliminação do resíduo de clorofórmio e concentração das amostras. A fase do clorofórmica (inferior) foi descartada. As amostras concentradas tiveram seu volume mensurado e armazenadas em tubos *eppendorf* sob temperatura de -18 °C. O precipitado foi resuspenso em 10mL de NaOH 0,1 N e homogeneizado em vórtex. Após 24h em repouso, estes extratos foram centrifugados a 2.000rpm por 30min e coletado o sobrenadante contendo a porção protéica (BUENO, 1989), sendo armazenado a -20 °C para posterior dosagem de proteínas.

A determinação de proteínas totais foi realizada conforme metodologia descrita por BRADFORD, (1976). Em nódulos as proteínas totais foram dosadas pelo método padrão, utilizando amostras e padrão BSA (soroalbumina bovina, fração V) em quantidades variando entre 0 e 100µg em volume de 0,1mL, acrescidos de 5,0mL de reagente de cor (Coomasie Brilliant G 250, 100mg em 50mL de etanol 95% e 100mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% p/v ). Para raízes foi utilizado o micrométodo, com o padrão de BSA em quantidades variando de 0 a 20 µg de proteína /0,1mL, por 1mL de reagente de cor. Após a adição do reagente de cor sobre as amostras e padrões, os tubos foram agitados para posterior leitura das densidades ópticas (D.O.) a 595nm.

A dosagem de aminoácidos solúveis totais (AA) foi realizada pelo método de YEMM e COCKING (1955), usando 1mL de cada amostra de raízes e nódulos e/ou dos padrões de leucina (0-200nmol mL<sup>-1</sup>), devidamente diluídas, de um branco (água) em tubos de ensaio, acrescentando-se 0,5mL de tampão citrato 0,2M pH5,0, 0,2mL de reativo de ninhidrina 5% em metil-celulose, 1mL KCN-2% em metil-celulose e após agitação, cobrindo-se os tubos com bolas de vidro, sendo

incubados em banho-maria a 100 °C por 20min e posteriormente transferidos para o escuro até atingir temperatura ambiente. Após resfriamento foi acrescentado 1,3mL de etanol 60% por tubo, sendo novamente agitados para posterior leitura de D.O. a 570nm.

A dosagem de ureídeos do exsudatos de xilema foi realizada pelo método VOGELS e van der DRIFT, (1970). O volume 250µL de amostras de seiva ou dos padrões de alantoína (0-150nmol mL<sup>-1</sup>), devidamente diluídos, um branco (água) foram transferidos para tubos de ensaio, acrescentando-se 0,5mL de água destilada 0,25mL de NaOH 0,5N. Em seguida os tubos foram tampados com bolas de vidro e levados ao banho-maria a 100 °C por 8min e resfriados em água corrente, posteriormente foi acrescentado 0,25mL de HCl 0,65N. Os tubos foram então aquecidos a 100 °C por 4 min e novamente resfriados para a adição de 0,25mL de tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4M pH7,0) mais 0,25mL de fenilhidrazina 0,33%. Após repouso por 5 min, os tubos foram submetidos a banho de gelo para adição de 1,25mL de HCl concentrado a 0 °C, 0,25mL K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 1,65% e agitados em vórtex. Após 15min, as amostras foram lidas em D.O de 535nm.

O delineamento adotado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 4 (genótipos; regime hídrico, períodos de inundação) ou 2 x 2 x 3 (genótipos; regime hídrico, períodos de drenagem após inundação) com quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída de um vaso com duas plantas. Após análise de variância dos dados referentes ao experimento de inundação, nos casos significativos, foram ajustadas equações de regressão e quando não houve ajuste, as médias foram comparadas pelo teste de médias de Tukey, a 5% de probabilidade (GOMES, 1990). A análise estatística foi realizada com auxílio do pacote estatístico SAS (SAS, 2002). Este último procedimento foi adotado para os dados referentes ao experimento de drenagem.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de oxigênio foi monitorado ao longo do experimento de inundação, sendo obtidos valores entre 84 e 96% na solução nutritiva utilizada para inundar as plantas, e entre 7 e 13% na solução drenada dos vasos 24h após alagamento, permanecendo em níveis próximos durante todo o experimento, caracterizando a condição de hipoxia no sistema em estudo.

A inundação do sistema radicular causou decréscimo do transporte de ureídeos na seiva de xilema, mostrando efeitos distintos entre os genótipos durante o período de alagamento e drenagem dos vasos (Fig. 1A e 1C). Aos três dias de tratamento, houve pequena queda no transporte de ureídeos no cv. BRS 153 e acentuada no cv. BRS 154. O efeito mostrou-se intensificado aos seis dias de tratamento, aumentando a partir do nono dia de inundação até o último dia de avaliação. Em soja nodulada, o transporte de N no xilema é caracterizado pelos ureídeos, ácido alantóico e alantoína, que representam até cerca de 80% do N translocado (McCLURE e ISRAEL, 1979), considerados produtos específicos da fixação de N<sub>2</sub> (McCLURE et al., 1980), sendo usados como indicadores da eficiência da fixação de N<sub>2</sub>, sendo que altas concentrações em leguminosas estão usualmente associadas à nodulação efetiva e elevadas taxas de fixação de N<sub>2</sub> (BERKUM et al., 1985; HERRIDGE et al., 1990). Os ureídeos dosados na seiva do xilema decresceram significativamente em soja nodulada sob alagamento por um período de cinco dias (PUIATTI e SODEK, 1999), confirmando os resultados deste experimento. Períodos inferiores a uma hora de alagamento do sistema de raízes foram suficientes para reduzir em mais de 90 % o teor de ureídeos totais na seiva, mantendo estes teores durante as 96h de avaliação (AMARANTE e SODEK, 1999).



O grande decréscimo do transporte de ureídeos ao longo do experimento deve estar relacionado à inibição da fixação de  $N_2$  devido à deficiência de  $O_2$  nos nódulos, uma vez que a difusão do  $O_2$  na água é cerca de 1.000 vezes menor do que no ar (ARMSTRONG et al., 1994) e a barreira de difusão de  $O_2$  presente no nódulo (GUASH et al., 2001) potencializa esse efeito. Por outro lado, o pequeno aumento nos ureídeos totais na seiva observado no nono dia de tratamento foi propiciado possivelmente por meio da formação de aerênquimas, facilitando as trocas gasosas e com isso a fixação de  $N_2$  (THOMAS et al., 2005), porém diferente do observado nesse trabalho, onde a formação de aerênquima tornou possível a reversão do processo de fixação de  $N_2$  entre sete e dez dias após inundação das plantas.

A drenagem dos vasos possibilitou a retomada da fixação de  $N_2$  em ambos os genótipos, em níveis equivalentes ao controle, em período superior a 24h de tratamento, demonstrando que nove dias de inundação são capazes inibir severamente a atividade fixadora dos nódulos, não sendo entretanto, um processo irreversível. A forma de recuperação da fixação de  $N_2$  foi diferenciada entre genótipos, uma vez que no cv. BRS-154 as concentrações de ureídeos totais permaneceram superiores ao controle durante todo o período de drenagem avaliado e em BRS 153 os teores foram equivalentes ao controle no nono dia de avaliação (Fig. 1C e 1D).

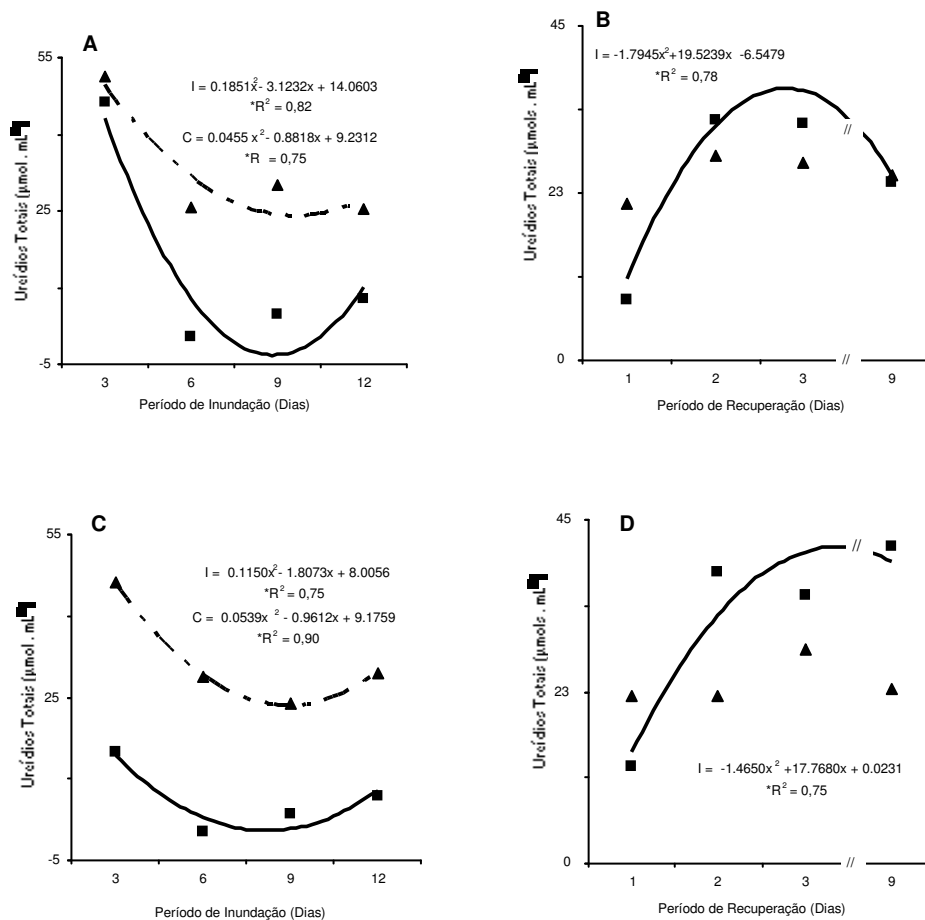


Figura 1 – Teores de ureídeos totais em seiva de xilema de genótipos de soja nodulada, BRS-153 (A e B) e BRS-154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de O<sub>2</sub>, sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação). \*P≤0,05; n=4.

O teor de aminoácidos totais em raízes aumentou com o tratamento hipóxico, sendo um efeito comum em ambos os genótipos, porém diferenciado ao longo do período de inundação. No cv. BRS-153 aumentos expressivos foram detectados no sexto dia de inundação, ao passo que em BRS-154 esse efeito foi prolongado até nove DAI (Fig. 2A e 2B). Em raízes de plantas de arroz o aumento dos níveis de aminoácidos totais ocorre das primeiras oito horas de exposição ao estresse por anoxia até as 48h, caracterizando-se um mecanismo adaptativo, onde a alanina é o aminoácido majoritário em raízes nestas condições (REGGIANI et al., 2000).

O acúmulo de aminoácidos totais em tecidos de plantas submetidas a estresse por deficiência do oxigênio é descrito em vários trabalhos (STREETER e THOMPSON, 1971; BERTANI e BRAMBILLA, 1982 e REGGIANI et al., 1985).

A maioria dos estudos conduzidos com plantas nas quais as raízes são submetidas à deficiência de O<sub>2</sub> tem revelado aumentos nos teores e interconversão entre os aminoácidos (FAN et al., 1997; REGGIANI et al., 2000). Entre estes a Alanina (Ala) é fortemente acumulada em respostas à anaerobiose, alcançando 31-32% da fração de aminoácidos solúveis em arroz, sendo o terceiro principal produto da fermentação (REGGIANI et al., 1985) e o principal aminoácido transportado e acumulado em raízes de soja sob deficiência de oxigênio (PUIATTI e SODEK, 1999; SOUZA e SODEK, 2003; THOMAS et al., 2005).

A interconversão entre aminoácidos auxilia na regulação do pH celular em órgãos de plantas sob deficiência de O<sub>2</sub>, sendo esta característica considerada determinante na sobrevivência das espécies à anoxia (STREETER e THOMPSON, 1972a,b; FAN et al., 1988; REGGIANI et al., 1988; CRAWGORD et al., 1994; FAN et al., 1997 e REGGIANI, 1999).

No período de recuperação não houve diferença nos teores de aminoácidos totais em raízes entre cultivares, nem ao longo do tempo de recuperação pós-hipoxia nas plantas submetidas à inundação (Fig. 2C).

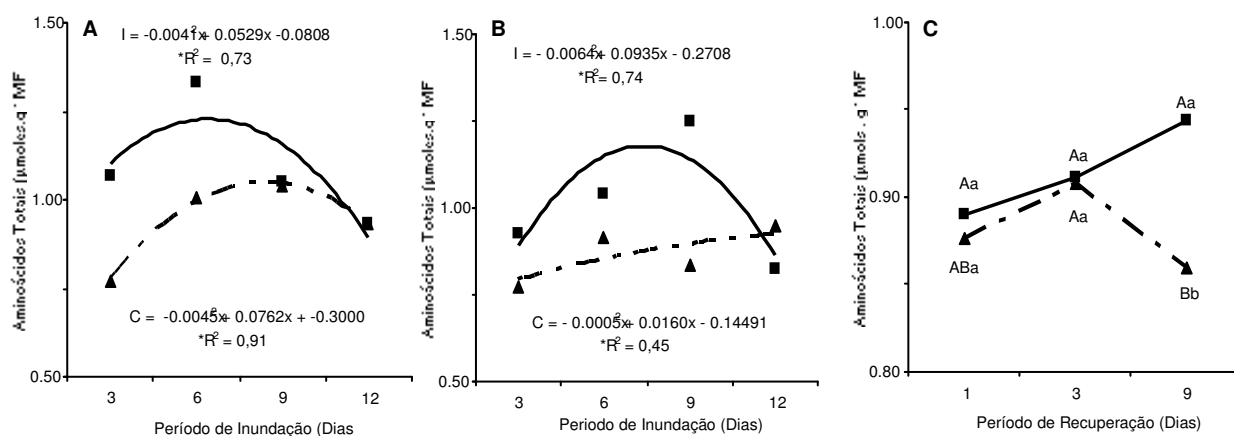


Figura 2 – Teores de aminoácidos totais em raízes de genótipos de soja nodulada, BRS-153 (A) e BRS-154 (B), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radical (C), após nove dias de déficit de O<sub>2</sub>, sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação). \*P≤0,05; n=4.

\* $P \leq 0,05$ . (C) Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), para período e regime hídrico respectivamente;  $n=4$ .

A condição de hipoxia causou decréscimo da concentração de aminoácidos nos nódulos, sugerindo ser esta resposta resultante da diminuição de seu metabolismo (Fig. 3A e 3C). O nódulo é muito mais sensível à disponibilidade de oxigênio do que as raízes, devido à presença de uma barreira variável à difusão de oxigênio, que deixa o teor interno de oxigênio praticamente no limite para o funcionamento eficiente da fixação de  $N_2$  (SODEK, 2001).

Os nódulos da soja podem suportar a inundação até 21 dias (PANKHURST e SPRENT, 1975; DAKORA e ATKINS, 1989) devido também ao desenvolvimento de aerênquima e a recuperação parcial do metabolismo do nitrogênio em nódulos do sistema radical da soja, após um prolongado período de inundação (THOMAS et al., 2002)

O efeito de diferentes concentrações de  $O_2$  sobre a atividade da nitrogenase em nódulos de tremoço é atribuído à concentração interna de  $O_2$  no nódulo, sendo o fator limitante à fixação de  $N_2$  e podendo manter sua atividade nos nódulos sob condições hipóxicas, caso não seja muito prolongada (GUASH et al., 2001).

No período de retorno à normoxia a quantidade de aminoácidos totais em nódulos não foram superiores ao seu controle, sugerindo rápida exportação do N recém fixado, pois, grande parte dos aminoácidos sintetizados nos nódulos da soja são destinados à produção de ureídeos, que correspondem à cerca de 80 % do N exportado via xilema (McCLURE e ISRAEL, 1979, McClURE et al., 1980) (Fig. 3B e 3D).

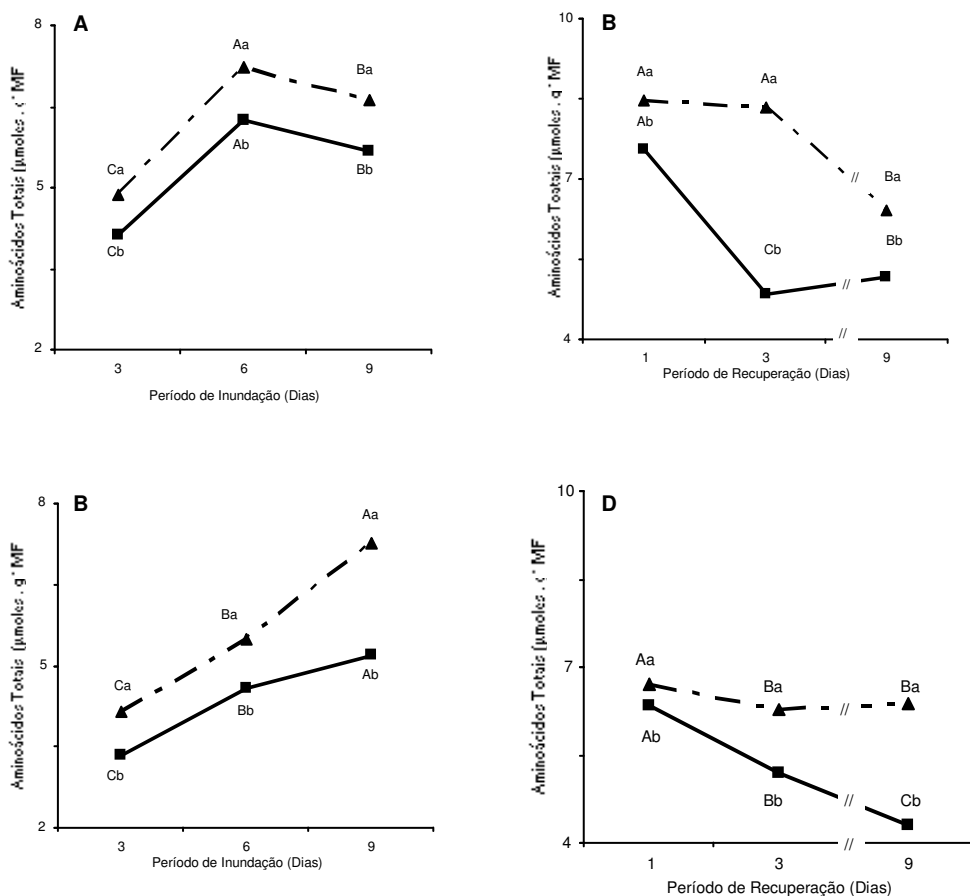


Figura 3 – Teores de aminoácidos totais em nódulos de genótipos de soja, BRS-153 (A e B) e BRS-154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de O<sub>2</sub>, sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação). \*P≤0,05; n=4.

\* Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente, n=4.

A variação do teor de proteínas totais em raízes durante o período de tratamento hipóxico foi equivalente entre os cultivares avaliados. Nos primeiros três dias de hipoxia foi verificado um acréscimo da síntese de proteínas totais em raízes, seguido de decréscimo aos seis e retornando a concentrações superiores ao seu controle nos demais períodos de tratamento (Fig. 4A). No entanto, em duas cultivares contrastantes de milho, a cultivar Saracura (tolerante) apresenta teores de proteína total mais elevada nas raízes que seu controle por até 48h, sugerindo que

algum mecanismo é acionado, favorecendo a síntese ou protegendo as proteínas da degradação (LOPES et al., 2005).

Por outro lado, o teor de proteínas no sistema radical da soja nutrida com nitrato aumenta significativamente após 4 dias de tratamento, tanto em normoxia como durante a hipoxia. Porém, em condições de hipoxia o aumento é bem mais expressivo e na recuperação, a concentração de proteínas cai para um valor próximo aos das plantas sob normoxia (BRANDÃO, 2005).

O estresse anaeróbico induz mudanças tanto no teor quanto no padrão de proteínas (SACHS et al., 1980). Dessa maneira, geralmente espécies tolerantes ao déficit de oxigênio conseguem manter o nível protéico, mediante a síntese de polipeptídeos anaeróbicos, compensando, com isso, a repressão de proteínas aeróbicas (ZHANG et al., 1994; SACHS et al., 1996).

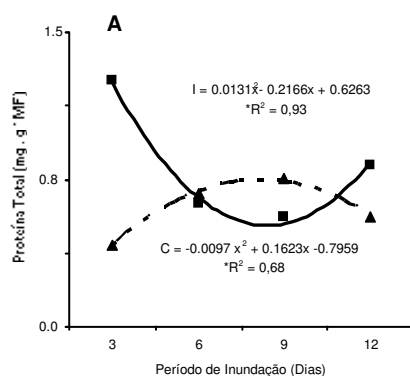


Figura 4 – Teores de proteínas totais em raízes de genótipos de soja nodulada, BRS-153 e BRS-154, submetidos a diferentes períodos de hipoxia do sistema radical, sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação).

\*P≤0,05; n=4.

Em nódulos a resposta das plantas em relação ao acúmulo de proteínas foi similar ao ocorrido em raízes, não ocorrendo diferenças entre genótipos (Fig. 5A). Após a drenagem dos vasos, no primeiro dia, houve um decréscimo da concentração de proteínas totais, atingindo no sexto dia concentrações equivalentes ao seu controle (Fig. 5B).

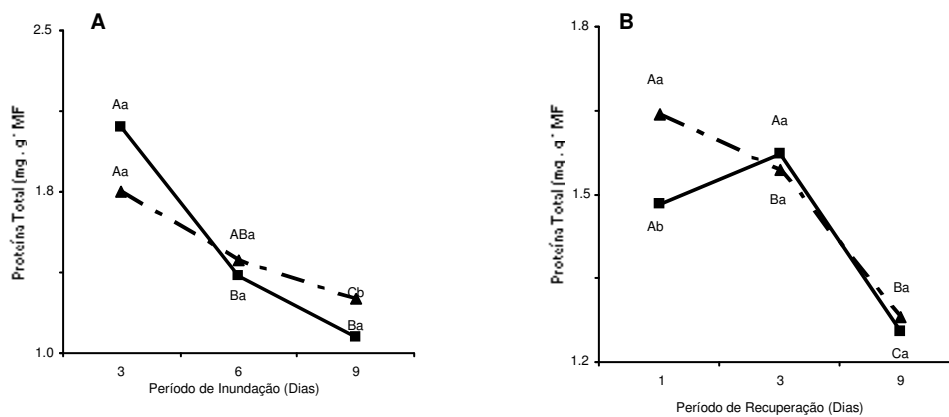


Figura 5 – Teores de proteínas totais em nódulos de genótipos de soja nodulada, BRS-153 e BRS-154, submetidos a diferentes períodos de hipoxia (A) e pós-hipoxia do sistema radical após nove dias de déficit de O<sub>2</sub> (B), sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação).

\*Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a P≤0,05, para período e regime hídrico respectivamente.

\*P≤0,05, n=4.

A atividade da alanina aminotransferase (AlaAT) em raízes foi estimulada pelo tratamento hipóxico, variando ao longo do período e entre os cultivares avaliados. Nos primeiros dias de hipoxia houve incremento na atividade da AlaAT em raízes. O cultivar BRS-153 teve incremento da atividade no terceiro dia de inundação, seguido de grande elevação no sexto DAI em relação às plantas sob normoxia. No entanto, aos nove DAI a atividade decresceu a níveis equivalentes ao seu controle. Em cevada (GOOD e CROSBY, 1989a) e soja não-nodulada (SOUSA e SODEK, 2003), também ocorre a máxima atividade da AlaAT aos seis dias de tratamento. Da mesma forma a atividade da AlaAT em raízes de milho, trigo e centeio aumenta sob condição de anaerobiose (GOOD e CROSBY, 1989b). O cultivar BRS-154 também incrementou a partir dos 3 dias DAI, porém, com menor atividade de AlaAT que em BRS-153, atingindo elevação máxima no sexto dia de alagamento, e pequeno decréscimo nos tempos posteriores, mas sempre superior ao seu controle até os 12º dia de inundação (Fig. 6B). A indução de AlaAT em resposta a condições de baixo teor de oxigênio é constatada também em plantas milho (MUENCH et al., 1998) e *Araibdopsis thaliana* (MIYASHITA et al., 2007).

Durante o período de pós-hipoxia não houve diferença da atividade da AlaAT entre os cultivares, mas ocorreu interação entre o tratamento de recuperação e período, demonstrando no primeiro dia de drenagem, atividade superior ao controle das plantas previamente submetidas à hipoxia (Fig. 6C).

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

Em cevada a enzima AlaAT é a principal responsável pela produção de alanina sob condições de hipoxia (MUENCH e GOOD, 1994). As raízes de plantas de soja nutridas com nitrato, a atividade da AlaAT induzida durante a inundação não está relacionada com o aumento da síntese de alanina, sendo foi atribuída a função de reciclar a alanina acumulada no período de drenagem, sugere que o papel principal da enzima ocorre durante o período de recuperação (SOUSA e SODEK, 2003), o mesmo ocorre em *Arabidopsis* (MIYASHITA et al., 2007).

Após o primeiro dia de recuperação ao estresse por hipoxia, ocorreu um decréscimo, chegando ao nono dia com atividade inferior ao controle (Figura 4C). Em plantas de soja não-noduladas ao retornarem à normoxia depois de 120h de hipoxia reduz a atividade da AlaAT em 24h, alcançando valores de atividade a níveis pré-hipóxicos em 96h (SOUSA e SODEK, 2003).



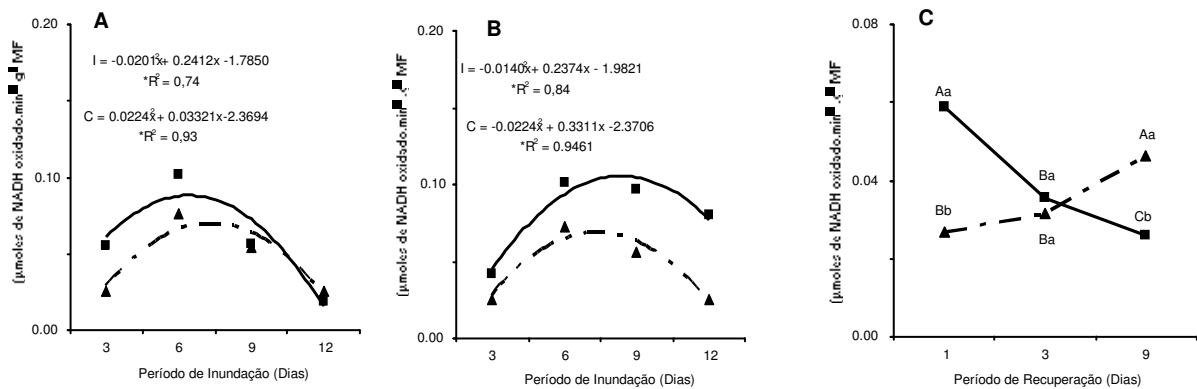


Figura 6 – Atividade da enzima alanina aminotransferase em raízes de genótipos de soja nodulada BRS-153 (A) e BRS-154 (B) sob hipoxia e pós-hipoxia do sistema radical após nove dias de déficit de O<sub>2</sub> (C), sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação).

\*P≤0,05. (C) Valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (\*P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente; n=4.

A atividade da AlaAT em nódulos aumentou fortemente com o período de hipoxia, sendo essa resposta diferenciada entre os genótipos. Dentre os períodos avaliados, houve incremento na atividade em períodos superiores a três dias de tratamento, sendo que a atividade da AlaAT no sexto dia de hipoxia foi mantida até o nono dia de inundação para o genótipo BRS 153. No genótipo BRS 154 ocorreu um acréscimo de atividade após seis dias de alagamento (Fig. 7A e 7B), diferente da resposta observada em raízes durante o período de hipoxia. No entanto, no decorrer do período pós-hipoxia a variação da atividade em nódulos foi similar ao das raízes (Fig. 7C), não diferindo entre genótipos. A atividade da AlaAT em nódulos foi muito superior ao encontrado nas raízes, em torno de 120 vezes mais elevadas no período de inundação e 150 vezes superior no período de recuperação.

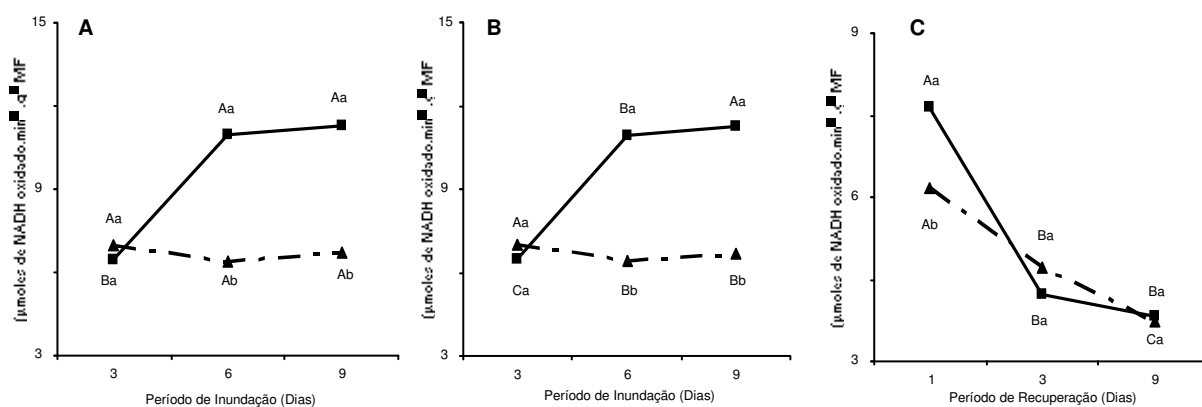


Figura 7 – Atividade da enzima alanina aminotransferase em nódulos de genótipos de soja nodulada BRS-153 (A) e BRS-154 (B), sob hipoxia e pós-hipoxia do sistema radical após nove dias de déficit de O<sub>2</sub> (C), sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação).

\*Valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (\*P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente, n=4.

## 4 CONCLUSÕES

A fixação simbiótica de  $N_2$  é severamente inibida em plantas de soja dos cultivares BRS-153 e BRS-154 sob alagamento, não sendo possível sua reversão em níveis do controle via formação de aerênquima durante o período de nove dias de tratamento, porém é plenamente restabelecida após 24h de drenagem.

A condição de hipoxia estimula fortemente o acúmulo de aminoácidos em raízes e diminuição em nódulos.

A deficiência de oxigênio causa o aumento do teor de proteínas em raízes e nódulos nos primeiros dias de alagamento nos genótipos BRS-153 e BRS-154, de forma equivalente.

A atividade da enzima alanina aminotransferase é estimulada pelo tratamento hipóxico em raízes e nódulos de soja dependendo do N fixado simbioticamente, sendo bem mais intensa em nódulos e dependente de genótipos.

### **CAPÍTULO III**

#### **ATIVIDADE DA ENZIMA ÁLCOOL DESIDROGENASE E ALOCAÇÃO DE CARBOIDRATOS NAS RAÍZES DE SOJA NODULADA DURANTE PERÍODO DE HIPOXIA E RETORNO À NORMOXIA**

## 1 INTRODUÇÃO

Na natureza as plantas são constantemente expostas a condições ambientais desfavoráveis ao seu desenvolvimento. A deficiência de oxigênio ocasionada por inundações temporárias devido a chuvas e irrigações pode-se tornar freqüente em regiões de solos hidromórficos, também conhecidos como solos de várzea, onde a drenagem é deficiente. Sua principal característica é o relevo predominantemente plano e com freqüência associado a um perfil de camada superficial pouco profunda e seguida de uma praticamente impermeável (PINTO et al., 1999). A condição de hipoxia nesses ambientes impõe severas restrições ao cultivo de espécies de importância econômica, uma vez que a maioria daquelas que produzem grãos são mesófitas (PIRES et al., 2002). Neste contexto, enquadra-se a cultura da soja, que, embora introduzida e melhorada para áreas bem drenadas no Brasil, é uma espécie originária de áreas alagadiças do norte da China (EVANS, 1996), porém com variabilidade genética para tolerar o excesso de umidade no solo (VAN TOAI et al., 1994; THOMAS et al., 2000; PIRES et al., 2002).

O déficit de O<sub>2</sub> causado pelo excesso hídrico causa a repressão da síntese de polipeptídios aeróbicos e a indução da síntese de polipeptídios anaeróbicos (SACHS et al., 1980), sendo a maioria desses polipeptídios identificada como enzimas envolvidas na fermentação e metabolismo de açúcares-fosfatados, cuja síntese é regulada em nível de transcrição e de pós-transcrição (DREW, 1997). O oxigênio serve como aceptor de elétrons na fosforilação oxidativa que regenera o ATP, principal fonte de energia para o metabolismo aeróbico celular e na sua ausência, o metabolismo fermentativo é ativado com o propósito de manter a produção de energia e agentes redutores através da regeneração do NAD<sup>+</sup> (DENNIS

et al, 2000), que junto à alocação de açúcares tem função crucial na sobrevivência de plantas sob anoxia (BOUNY e SAGLIO, 1996; DREW, 1997).

Durante o alagamento, a enzima lactato desidrogenase (LDH;EC) é ativada produzindo lactato. Em estudos com ressonância magnética foi mostrado que o pH citosólico acidifica-se durante o alagamento em raízes de milho (FOX et al, 1995). O acúmulo do piruvato que iria ser metabolizada no ciclo de Krebs, induz a ativação da lactato desidrogenase (LDH) produzindo lactato e o seu acúmulo vai reduzir o pH do citossol de 7,2 a 6,8 e com o citossol mais ácido, a LDH é inibida e a enzima piruvato descarboxilase (PDC) ativada produzindo acetaldeído que por sua vez é extremamente reativo a membranas, sendo convertido pela álcool desidrogenase (ADH) em etanol, principal produto da fermentação (DREW, 1997; HOLE et al.,1992; SERRES, 2008 e TADEGE et al., 1999). Plantas que são mais tolerantes ao alagamento têm a via de fermentação alcoólica mais ativa (DREW, 1997).

A enzima álcool desidrogenase (ADH; EC 1.1.1.1) é uma das principais enzimas fermentativas, que converte o acetaldeído em etanol, considerado menos tóxico à planta por não causar danos à bicamada lipídica das membranas celulares e por ser permeável, sendo translocado para fora da célula até a rizosfera. A adaptação às condições de falta de oxigênio não requer somente um rápido aumento nos níveis de enzimas da rota fermentativa, uma vez que a tolerância está relacionada à capacidade de sustentar a fermentação sob períodos prolongados de escassez de O<sub>2</sub> (BOUNY e SAGLIO, 1996; CHANG et al., 2000).

Embora a maioria dos estudos são focados sobre os efeitos bioquímicos e fisiológicos da hipoxia em relação à recuperação pós-hipoxia, o entendimento de como os tecidos vegetais recuperam-se da deficiência de O<sub>2</sub> é igualmente importante para o entendimento da tolerância ao alagamento (FAN et al., 1988).

O objetivo deste trabalho foi analisar a alocação de carboidratos, junto à atividade da enzima álcool desidrogenase no sistema de raízes de genótipos de soja nodulada em condições de déficit de O<sub>2</sub> e retorno às condições normais de disponibilidade de O<sub>2</sub>.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Terras Baixas, situada no município do Capão do Leão, RS, entre dezembro de 2006 e março de 2007. Sementes de soja [(*Glycine max* (L.) Merrill)] dos cultivares BRS-154 (tolerante) e BRS-153 (suscetível) foram semeadas em vasos de polietileno furados, de três litros (5 sementes), contendo vermiculita como substrato. Duas inoculações das plântulas com *Bradyrhizobium elkanii*, estirpe SEMIA 587, fornecida pela FEPAGRO e reproduzida no DMP/IB/UFPel. Foram efetuadas aos 14 e 21 dias após a emergência, respectivamente nos estádios VC e R2 da classificação de FEHR et al. (1971), constituindo na pipetagem de 2,5mL de meio líquido de NORIS e DATE (1976) ao redor da plântula. No estádio V0 foi efetuado o desbaste deixando duas plantas por vaso. A partir da queda dos cotilédones e até o final do experimento, as plantas foram nutridas com solução de Hoagland e Arnon (1938) sem nitrogênio mineral, na proporção de 250 mL vaso<sup>-1</sup>, duas vezes por semana e irrigado com água sempre que necessário. A partir da queda dos cotilédones e até o final do experimento, as plantas foram nutridas com solução de Hoagland e Arnon (1938) sem nitrogênio mineral, na proporção de 250 mL vaso<sup>-1</sup>, duas vezes por semana.

No estádio de desenvolvimento R2 - flor no nó imediatamente abaixo do nó mais alto com uma folha completamente desenrolada (FEHR et al.,1971) – foi efetuada a inundação do sistema radical, submetendo as raízes à deficiência de O<sub>2</sub>. Para tal a drenagem natural dos vasos por meio do encaixe do vaso contendo as plantas em um outro, de mesmo modelo e não perfurado e irrigando com uma solução nutritiva Hoagland diluída a 1/3 da concentração original, de forma a se manter uma lâmina de 20mm sobre a superfície do substrato. O teor de O<sub>2</sub> foi

monitorado na solução nutritiva e na solução drenada dos vasos por meio de um oxímetro (Handylab OX1).

Os vasos dos experimentos de inundação e de recuperação foram inundados simultaneamente e as coletas de raízes e nódulos para determinações analíticas foram realizadas aos 3, 6, 9 e 12 dias após a inundação (DAI). Aqueles destinados à avaliação de recuperação foram drenados no 9º DAI e o material vegetal foi coletado no 1º, 2º, 3º e 9º dia após a drenagem (DAD).

As amostras foram coletadas do terço inferior do sistema radical, duas amostras de 2g de raízes e duas amostras de nódulos, uma de 1g e outra de 0,5g e foram lavadas com água destilada gelada para diminuir a atividade do metabolismo do tecido. Após retirar o excesso de água com papel toalha, foram armazenadas sob temperatura de aproximadamente -86 °C, para posterior determinação da atividade de ADH e das concentrações de sacarose, açúcares solúveis totais, polissacarídeos solúveis em água e amido.

A extração da ADH foi realizada conforme descrito por Good e Crosby (1989), com algumas modificações, e a dosagem com base na metodologia de Kato-Noguchi e Watada (1997). A extração de ADH a partir de tecidos de raízes e nódulos realizada a temperatura de 4 °C, iniciada com a maceração das amostras em almofariz e pistilo previamente resfriados. Foi adicionado cerca de 100mL de nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido apenas nas amostras de raízes para facilitar a maceração, seguido de PVPP (5% MF) e 5mL de tampão extração tris-HCl 50mM – pH 7,5, contendo DTT 1mM para nódulos (0,5 g) e 10mL, do mesmo tampão para raízes (2g). Após homogeneização, as amostras foram filtradas em 8 camadas de gaze umedecidas com tampão de extração e centrifugadas a 10.000g, sob temperatura oscilando entre 2 e 4 °C por 20min. Do sobrenadante centrifugado foi retirado uma alíquota de 2,5mL para dessalinização por cromatografia de exclusão em coluna de sephadex G-25 M (PD-10), conforme instruções do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech) (Fig. 1).

Os tecidos destinados à extração de metabólitos foram inicialmente imersos em N<sub>2</sub> líquido, macerados em almofariz com auxílio de pistilo e em seguida transferidos para vidros âmbar, onde foi adicionado 20mL de MCW (metanol:clorofórmio:água; proporção de 12:5:3) em cada frasco (BIELESKI e TUNER, 1966) e homogeneizados, permanecendo em repouso por 24h. Decorrido



esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 2000rpm por 30min. A fração do sobrenadante foi recuperada em proveta e para cada 4mL, acrescentou-se 1,0mL de clorofórmio e 1,5mL de água Milli-Q, seguido de agitação e posterior repouso por mais 24h para a separação das fases. A fase aquosa (superior) foi coletada e evaporada em banho-maria a 38,8°C por 15h para eliminação do resíduo de clorofórmio e concentração das amostras. A fase clorofórmica (inferior) foi descartada. As amostras concentradas foram armazenadas em tubos de *Eppendorf* sob temperatura de - 18°C até a dosagem de sacarose e açúcares solúveis em água. Os precipitados foram resuspenso em 10mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) e após, homogeneizados em vórtex e deixados em repouso por 24h. Após esse período, foram centrifugados a 2000rpm por 30min. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a - 20°C para posterior dosagem de polissacarídeos solúveis em água. Os precipitados obtidos desta centrifugação foram destinados à extração do amido. Cada pélete foi ressuspenso em 10mL de ácido perclórico (PCA) 30%(v/v) e deixado sob agitação contínua por 30min em agitador orbital, para digestão do amido, com posterior centrifugação a 2000rpm por 30min (Fig. 2).

A dosagem da atividade da enzima ADH (EC 1.1.1.1) foi realizada no sentido da formação do etanol (acetaldeído  $\rightarrow$  ADH $\rightarrow$  Etanol), no qual o meio de reação com volume final de 3000 $\mu$ L, foi composto pelo extrato enzimático previamente dessalinizado em coluna sephadex G-25 M,  $\beta$ -NADH (0,2mM), tampão de dosagem (Tris-HCl 50mM pH 7,5) e acetaldeído (5mM). Os ensaios foram conduzidos em cubetas descartáveis de 4mL de metil-metacrilato. As cubetas contendo o meio de reação sem acetaldeído foram previamente incubadas no sistema de aquecimento Peltier, sob 30°C. A reação era iniciada pela adição de extrato dessalinizado e de acetaldeído ao meio de reação, a qual foi registrada pela queda de absorbância a 340nm, correspondendo à oxidação de NADH. As leituras foram registradas em intervalos de 30s, por um período de 10min, conforme previamente estabelecido em ensaios para a determinação do intervalo de tempo e volume de extrato necessários à linearidade da reação (BADINELLI et al., 2006).

Os teores de sacarose foram determinados de acordo com o método proposto por Handel (1986). Alíquotas de 100 $\mu$ L de amostras, padrões (20-150 $\mu$ g de sacarose) e branco foram pipetadas em tubos de ensaio e em seguida adicionado 100 $\mu$ L de KOH 30%, em solução aquosa por tubo. Os tubos foram tapados com

bolas de vidro e incubados em banho-maria sob temperatura de 100 °C/10min. Após atingirem temperatura ambiente, foi adicionado 3mL do reagente de antrona (antrona 0,15% em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70%) por tubo, sendo agitados e novamente incubados em banho-maria a 40 °C/15min. Após alcançar temperatura ambiente foram registradas as densidades ópticas a 620nm, das amostras contra o branco.

As dosagens dos teores de açúcares solúveis totais (AST), de polissacarídeos solúveis totais (WSP) e de amido foram realizadas com base na metodologia descrita por Grahmam e Smydzuk (1965). Alíquotas de 1mL de cada amostra, devidamente diluídas, e de um branco e padrões (15-200µg de glicose/mL), foram pipetadas em tubos de ensaio previamente aclimatados em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado 3mL de solução de antrona resfriada (0,15% em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70%) por tubo. Os tubos foram imediatamente tapados com bolas de vidro e, após 15min de incubação, agitados e levados a banho-maria a temperatura de 90 °C/20min. Posteriormente foram transferidos para ambiente sem luz até atingirem temperatura ambiente, quando foram agitados e então, realizadas as leituras da densidade óptica (D.O.) a 620nm, contra um branco. Os teores de amido foram determinados multiplicando os valores obtidos pelo fator de correção 0,9 (McCREADY et al., 1960).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 4 para experimento com inundação (genótipos x tratamento hipóxico x tempo) e 2 x 2 x 3 para experimento com recuperação (genótipos x tratamento pós-hipoxia x tempo), com quatro repetições. A unidade experimental composta por duas plantas por vaso, após análise de variância foi ajustado equações de regressão para os dados provenientes do experimento de inundação. Quando não houve ajuste, as médias foram comparadas pelo teste de médias de Tukey, a 5% de probabilidade. Este procedimento foi adotado para análise das médias obtidas no experimento de recuperação.

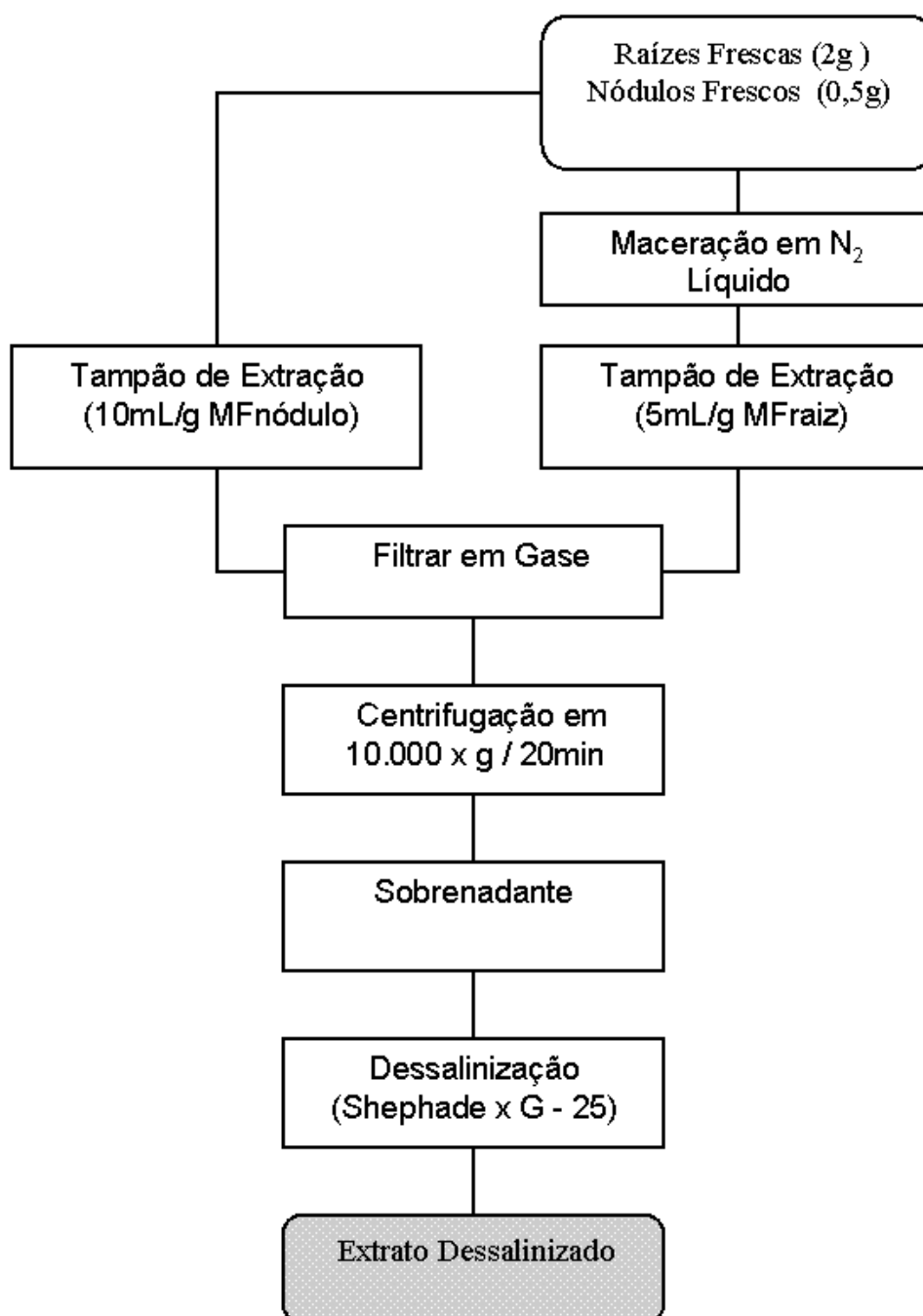


Figura 1 - Fluxograma da extração Álcool desidrogenase e Alanina aminotransferase.

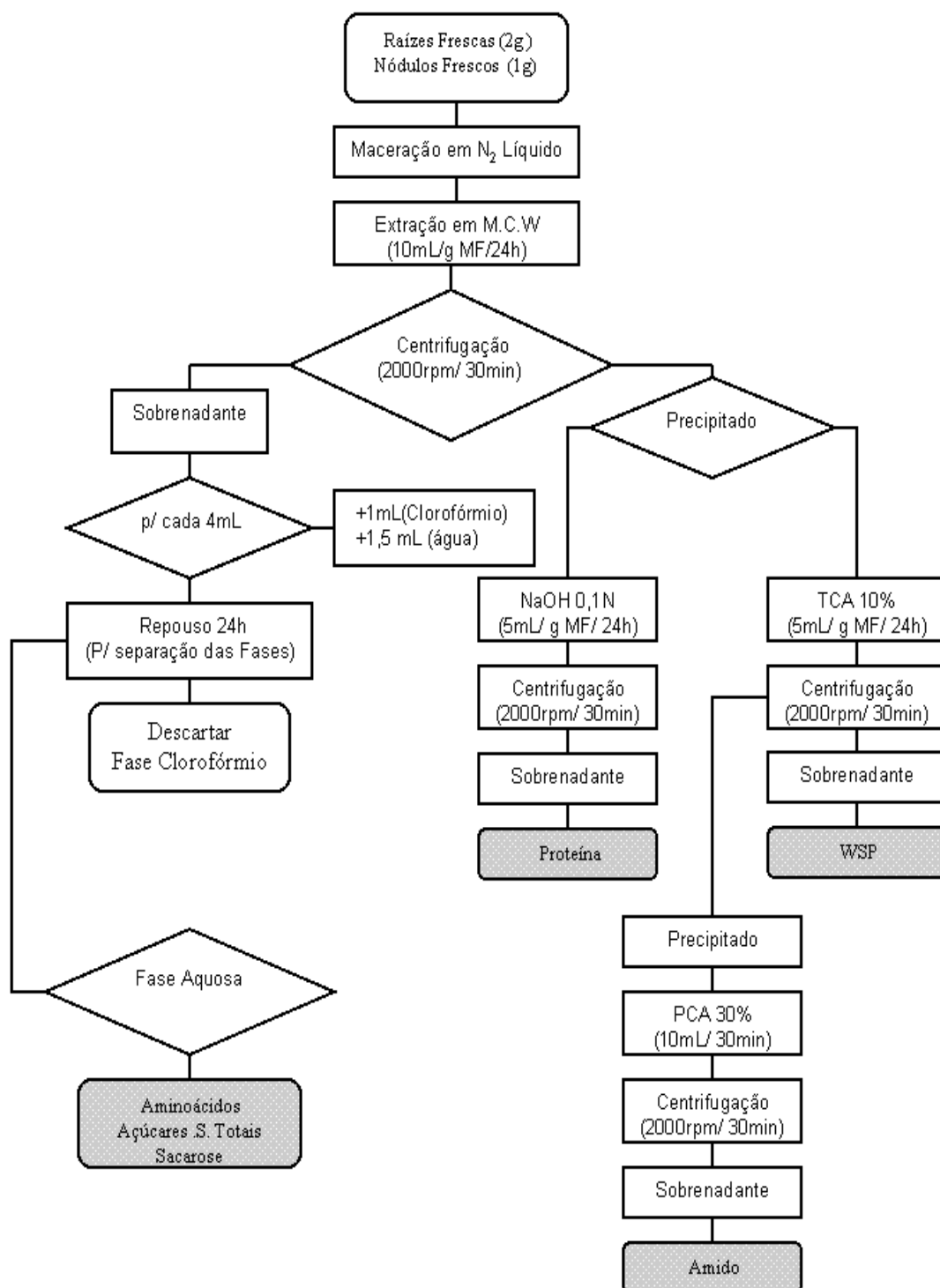


Figura 2 – Fluxograma da extração de metabólitos, sendo TCA (ácido tricloro acético), MCW (metanol : clorofórmio : água), WSP (polissacarídeos solúveis totais) e PCA (ácido perclórico).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de oxigênio na solução nutritiva aplicada para inundar as plantas oscilaram entre 84 e 96% de O<sub>2</sub>, decrescendo para valores entre 7 e 13% na solução drenada dos vasos, registrados 24h após início do tratamento de inundação, permanecendo nesse intervalo no decorrer do experimento de inundação, caracterizando a baixa disponibilidade de oxigênio no sistema em estudo.

Durante o período de inundação, a atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH) aumentou nas raízes do cultivar BRS-153 no terceiro dia de exposição ao déficit hídrico, atingindo o máximo aos nove DAI, e valores próximos ao do controle aos 12 DAI (Fig. 3A). Esta queda abrupta da atividade possivelmente esteja relacionada ao estágio avançado de degradação do tecido das raízes, observado durante as coletas. Razão pela qual não foi possível avaliar a atividade da ADH nos nódulos, pois estavam em estado avançado de senescência ou desprendidos do sistema radical. O genótipo BRS-154 teve atividade da ADH similar ao genótipo BRS-153 nos primeiros períodos de inundação, porém a atividade da ADH atingiu maiores valores no sexto dia de inundação, reduzindo somente após o nono DAI, permanecendo ainda com sua atividade bem superior ao controle até o final do experimento (Fig. 3C). A desidrogenase alcoólica (ADH) que catalisa a redução do acetaldeído tóxico a etanol, é transcricionalmente induzida em hipoxia e anoxia (PREISZNER et al., 2001). Em raízes de milho ocorre aumento de 50 vezes no mRNA dessa enzima, após 5 a 8h de hipoxia (GERLACH et al., 1982).

O aumento na atividade da ADH em função da deficiência de oxigênio permite reciclar o NAD<sup>+</sup> de maneira a manter a via glicolítica ativa (BLOKHINA et al., 2003; TADEGE et al., 1999). Dessa forma, a produção de ATP durante a permanência das plantas nessas condições está relacionada à capacidade das

mesmas em manter essa rota por períodos mais prolongados, embora essa possa ser uma característica do cultivar estudado, tendo em vista que certos cultivares de soja, sob hipóxia, não aumentam a atividade da enzima ADH, que converte acetaldeído em etanol (KENNEDY et al, 1992).

Os dois cultivares de soja tiveram tendências similares no que tange a atividade da ADH nas raízes, durante o período de inundação (Fig. 3A e 3C), mas diferiram estatisticamente no período de recuperação pós-hipoxia (Fig. 3B e 3D). Em relação ao período de inundação, a atividade da ADH foi reduzida substancialmente já no primeiro dia após drenagem (DAD), com valores aproximadamente quatro vezes menores do que os das plantas aos nove DAI. No entanto, a condição de normoxia não foi suficiente para reverter a atividade da ADH a níveis equivalentes ao controle, mesmo nove dias após drenagem, mostrando valores significativamente elevados em relação ao controle em ambos os genótipos. Porém, o genótipo BRS-154 teve redução significativa da atividade da ADH aos nove DAI em relação ao primeiro dia de recuperação (Fig. 3D), sugerindo melhor recuperação do estresse hipóxico em relação ao genótipo BRS-153 (Fig. 3B).

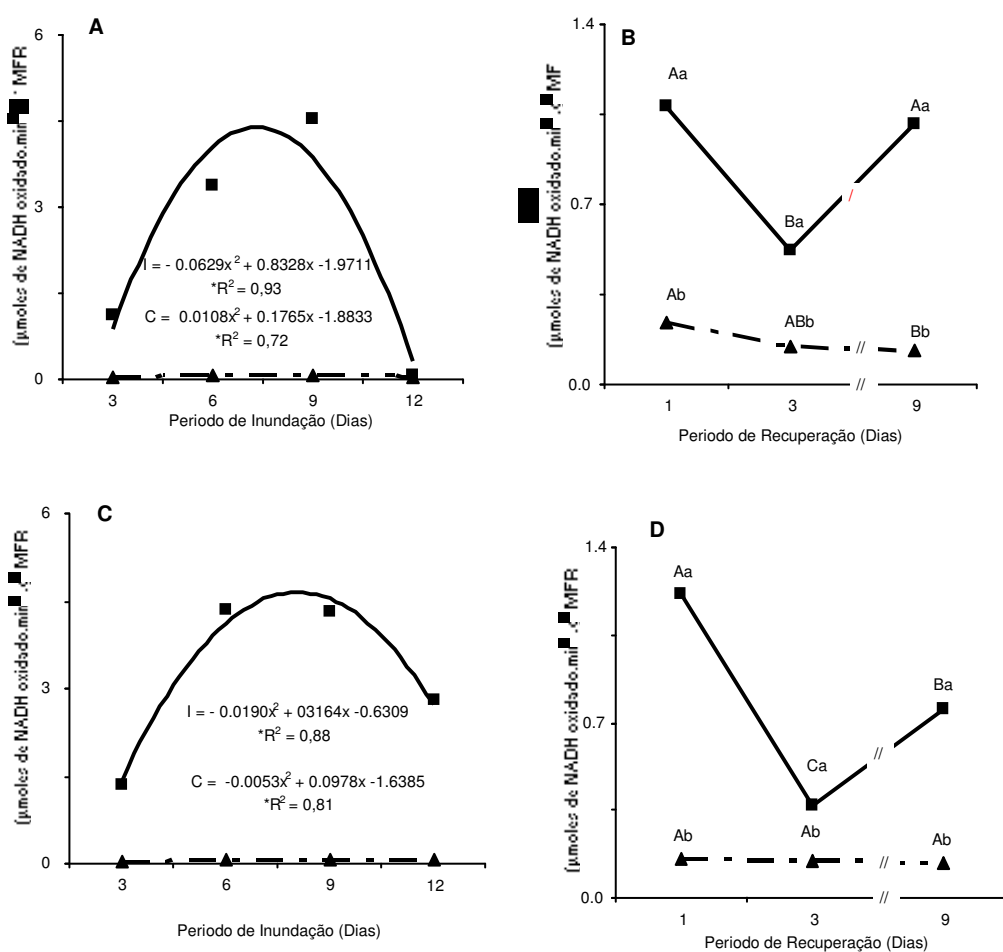


Figura 3 – Atividade da enzima álcool desidrogenase em raízes de genótipos de soja nodulada, BRS-153 (A e B) e BRS-154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular, após nove dias de déficit de O<sub>2</sub>, sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação).

\*P≤0,05; n=4.

\*P≤0,05. (B e D) Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente; n=4.

A atividade da ADH em tecidos nodulares foi semelhante ao das em raízes, porém significativamente maior que o controle desde o primeiro DAI, em ambos os genótipos. A atividade aumentou com o tempo de inundação, sendo esta resposta distinta entre os genótipos BRS-153 e BRS-154, com maior atividade aos nove e seis DAI, respectivamente (Fig. 4A e 4C). As maiores atividades da ADH nos nódulos registradas durante a inundação das plantas foram aproximadamente dez

vezes maiores que as máximas obtidas nas raízes, evidenciando maior atividade fermentativa nesse órgão.

Em arroz, os cultivares tolerantes à anoxia FR13A e Calrose, possuem altas taxas de fermentação etanólica em relação aos que são intolerantes, IR22 e IR42 (SETTER et al., 1994). O aumento da taxa de fermentação alcoólica em arroz quando submerso aumenta sua sobrevivência nessa condição (QUIMIO et al., 2000).

Durante o primeiro dia de recuperação pós-hipoxia, a atividade da ADH aumentou grandemente em relação à registrada aos nove DAI, período de drenagem. Este efeito foi mais acentuado para o genótipo BRS-154, embora atividades mais elevadas foram registradas em BRS-153. Com o decorrer do período após drenagem, a atividade da ADH decresceu, atingindo valores equivalentes ao controle aos 9 DAD (Fig. 4B e 4D). O retorno das plantas às condições normais de O<sub>2</sub>, após três dias de alagamento, promove a restauração do metabolismo aeróbico e a conseqüente redução na atividade de enzimas fermentativas, no entanto em milho cv. BRS – 4154, 30min de re-aeração não foram suficientes para o completo restabelecimento da via aeróbica, uma vez que a atividade da enzima não atingiu o nível do controle (FRIES, 2003).

O período inicial da recuperação após o estresse por falta de oxigênio pode ser crucial para a sobrevivência das plantas. Apesar da maioria das injúrias acontecerem durante o período de estresse, danos também ocorrem no retorno das plantas às condições normais de oxigênio (VAN TOAI & BOLLES, 1991), ocorrendo, também, a formação de espécies reativas de oxigênio e de produtos oxidativos tóxicos, como acetaldeído (CRAWFORD, 1992) que é produzido pela ADH ou catalase, após a re-aeração (ZUCKERMANN et al., 1997). A catalase provavelmente oxida o etanol por meio da redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que é produzido durante a re-aeração (MONK et al., 1987; PAVELIC et al., 2000).

É possível que os mecanismos de tolerância induzidos por um pré-tratamento hipóxico sejam mais eficazes após o retorno às condições aeradas que durante o próprio período de estresse (ELLIS et al., 1999). Também, a re-exposição das plantas ao ar pode gerar radicais superóxidos e o sucesso do retorno se deve à ação das enzimas superóxido dismutase, catalases, peroxidases e à presença de antioxidantes naturais, como a glutatona e o ácido ascórbico (ALBRECHT e



WIEDENROTH, 1994). Ainda, a oxidação de acetaldeído a acetato pela enzima acetaldeído desidrogenase torna possível a sua metabolização durante o período pós-hipoxia, aliviando o estresse causado pelo acetaldeído (TSUJI et al., 2003).

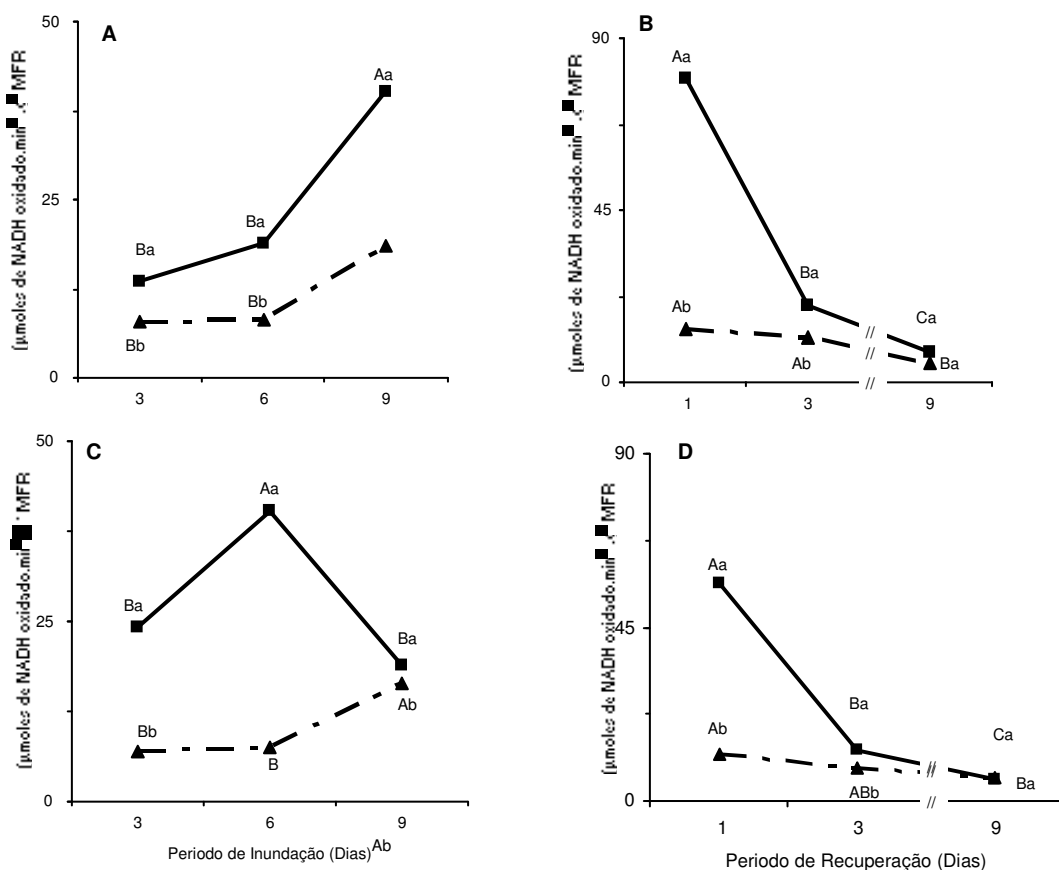


Figura 4 – Atividade da enzima álcool desidrogenase em nódulos de genótipos de soja, BRS-153 (A e B) e BRS-154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radicular após nove dias de déficit de O<sub>2</sub>, sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação).

\*P≤0,05. (B e D); Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente; n=4.

O tratamento de inundação causou um grande incremento da concentração de sacarose em raízes, no terceiro dia de tratamento, aumentando no sexto dia e decrescendo nos períodos posteriores, resultando em teores abaixo do controle no 12 DAI. Essa resposta ocorreu nos dois genótipos testados, porém foi

mais expressiva no genótipo BRS-153 (Fig. 5A e 5C). Baixas concentrações de O<sub>2</sub> promovem aumento nos teores de sacarose em ápices de raízes de cevada e arroz (LIMPINUNTANA e GREENWAY, 1979). Do mesmo modo, ocorre maior taxa respiratória no genótipo de trigo sensível ao alagamento e maior concentração de sacarose no genótipo tolerante (HUANG e JOHNSON, 1995), sugerindo que a combinação entre a redução na respiração das raízes e os altos níveis de sacarose são responsáveis pela tolerância das plantas à condição de hipoxia.

Aumento no conteúdo de sacarose de quase três vezes durante os nove dias de inundação em raízes de cana-de-açúcar (INDRA DENI e SUGI HARTO, 2001) sustentam os resultados obtidos neste trabalho.

Durante o período de recuperação, a concentração de sacarose em raízes aumentou grandemente no primeiro dia. Em seguida houve diminuição, chegando ao terceiro dia de tratamento a teores próximos aos das plantas controle e inferiores aos nove DAI (Fig. 5B e 5D), evidenciando com isso sua utilização em função da retomada do metabolismo aeróbico. Ainda em plantas de milho a sacarose é a principal fonte de carbono sob privação de O<sub>2</sub>, logo disponibilidade de sacarose pode contribuir para a adaptação de plântulas sob anaerobiose (RICARD et al., 1998).

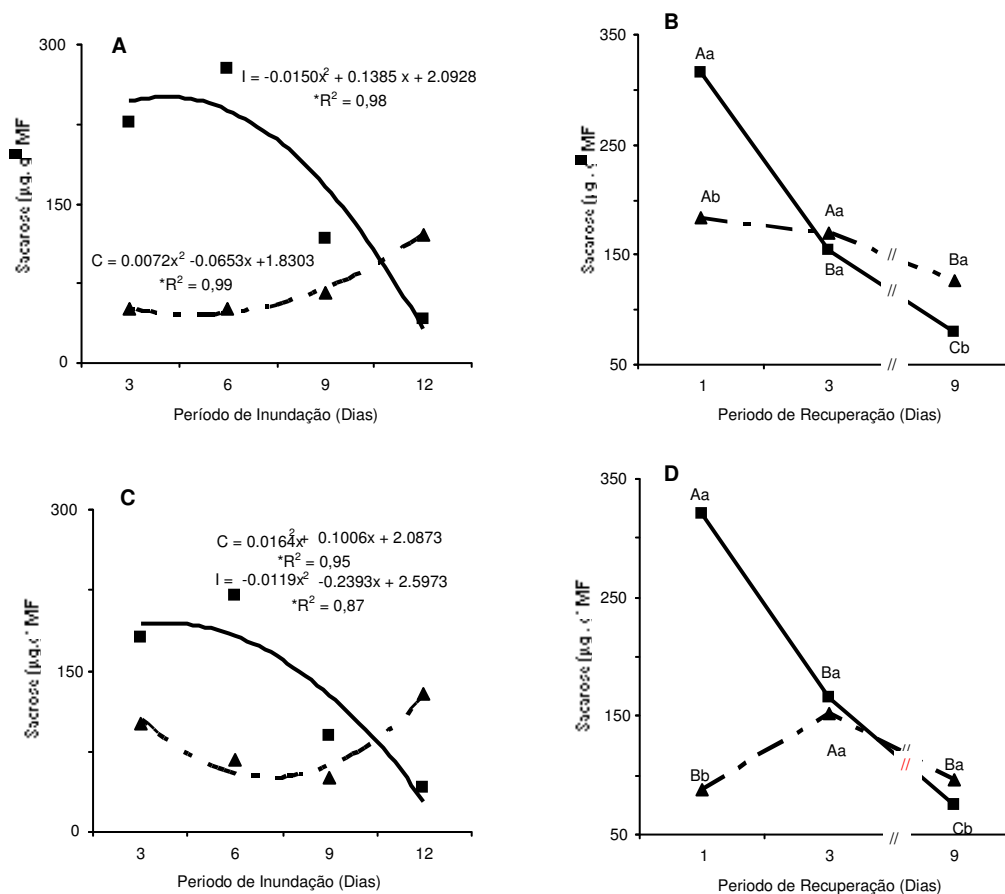


Figura 5 – Teores de sacarose em raízes de genótipos de soja nodulada, BRS-153 (A e B) e BRS-154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radical após nove dias de déficit de O<sub>2</sub>, sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação).

\*P≤0,05 (B e D); Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente; n=4.

A concentração de sacarose em nódulos foi influenciada positivamente pelo tratamento hipóxico, semelhante ao obtido em raízes. Houve um acréscimo no terceiro dia de inundação, elevando significativamente no sexto dia de hipoxia e reduzindo a concentração da sacarose drasticamente aos 9 DAI. Essa resposta foi mais acentuada para o genótipo BRS-153, onde aos 9 DAI, os teores decresceram a níveis inferiores ao controle (Fig. 6A e 6 C).

No primeiro dia de retorno às condições de normoxia, ocorreu uma diminuição do teor de sacarose nos tecidos nodulares do genótipo BRS-153,

permanecendo inferior ao seu controle por todo o período de recuperação, sugerindo um grande consumo desse açúcar pela respiração aeróbica. De forma diferenciada, em BRS-154 ocorreu um acréscimo da concentração de sacarose no primeiro DAD, seguido de diminuição no terceiro dia de recuperação, atingindo níveis significativamente menores do que o controle, permanecendo assim até o fim do experimento. Este efeito foi mais intenso para o genótipo BRS-153 (Fig. 6B e 6 D).

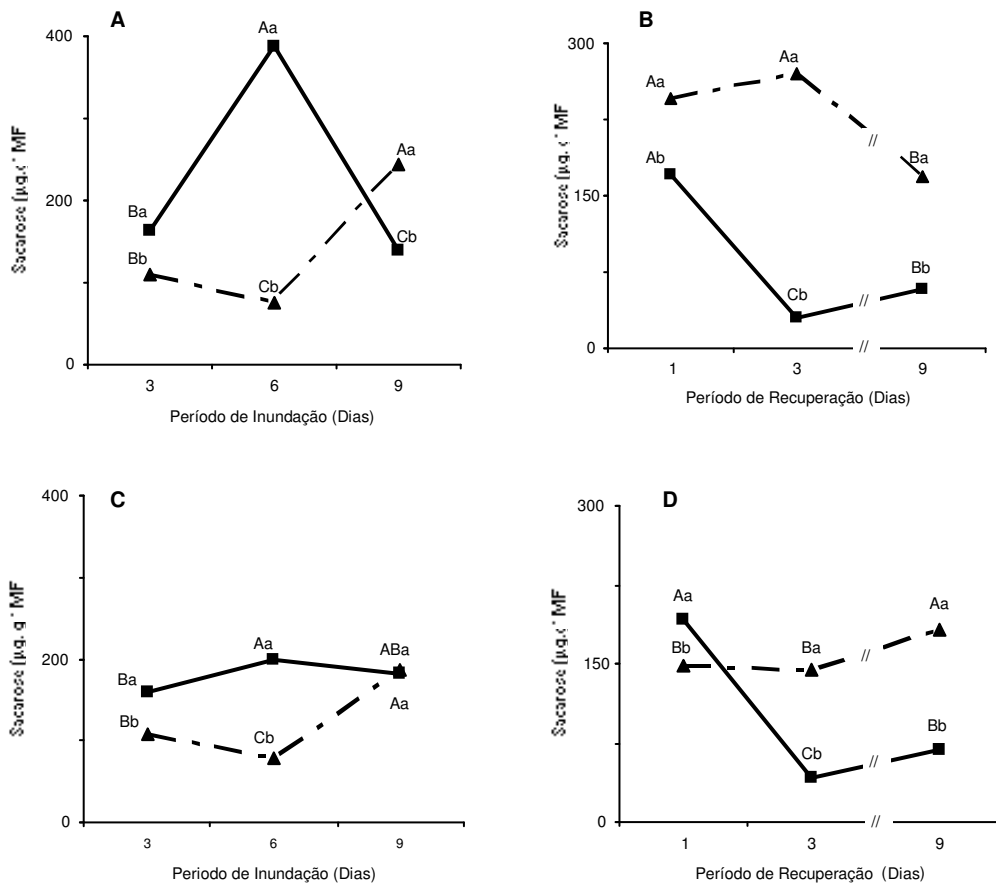


Figura 6 – Teores de sacarose em nódulos de genótipos de soja, BRS-153 (A e B) e BRS-154 (C e D), submetidos a diferentes períodos de hipoxia e pós-hipoxia do sistema radical após nove dias de déficit de O<sub>2</sub> (B e D), sendo ▲ (controle) e ■ (inundado ou recuperação).

\*Os valores de médias, seguidos da mesma letra maiúscula na linha e letras minúsculas entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05), para período e regime hídrico respectivamente; n=4.

A deficiência de O<sub>2</sub> refletiu em aumento da produção de açúcares solúveis totais em raízes, sendo obtidos teores muito elevados em relação às plantas sob normoxia, no terceiro e sexto dia de inundação, especialmente no genótipo BRS-153

(Fig. 7A e 7C). Por outro lado, a translocação de açúcares solúveis das folhas para as raízes é bastante afetada pelo alagamento, e, drasticamente reduzida em numerosas espécies não-tolerantes (KOZLOWSKI e PALLARDY, 1984; PEZESHKI, 1994; KOZLOWSKI, 1997). Em plantas jovens de *Bactris gasipaes* Kunth, durante o tratamento de anoxia, aumenta os teores de açúcares solúveis nas raízes (CARVALHO, 2002). Em muitos trabalhos, o acúmulo de açúcares solúveis em raízes de plantas sob alagamento é descrito como forma de tolerância a esse estresse (LIAO e LIN, 2001). O aumento de açúcares solúveis observado no início do período de estresse por deficiência hídrica ocorre por causa da paralisação do crescimento e certa manutenção da atividade fotossintética e com o avanço desse período, devido à hidrólise de amido (McCREE et al. 1984; PIMENTEL e ROSSIELO, 1995;), semelhante aos resultados obtidos por excesso hídrico neste trabalho.

Após seis dias de tratamento hipóxico, os teores de AST foram diminuindo até atingirem concentrações equivalentes aos seus respectivos controles (Fig. 7A e 7C), possivelmente devido à elevada atividade respiratória sob hipoxia, evidenciada pela grande atividade da ADH em raízes nesse período (Fig. 3A e 3C).

Durante o período de recuperação, o teor de AST nas raízes foi muito superior ao controle no primeiro dia de drenagem dos vasos em ambos os genótipos, e tendeu a se equivaler aos teores pré-hipóxicos, a medida em que as plantas se recuperaram dos efeitos do estresse (Fig. 7B e 7D). A diminuição de AST com o aumento do período de drenagem, provavelmente esteja relacionada à maior atividade metabólica da planta sob normoxia, estimulando o processo respiratório aeróbico e a utilização de esqueletos carbônicos produzidos para retomada do crescimento.

























































