

TEORES DE AMINOÁCIDOS SOLÚVEIS TOTAIS TRANSPORTADOS NO XILEMA DE GENÓTIPOS DE SOJA NODULADA SOB CONDIÇÕES DE HIPOXIA E PÓS-HIPOXIA

DUARTE, Daniele Peglow¹; DURIGON, Marcel Angelo¹; BORELLA, Junior²; AMARANTE, Luciano³; EMYGDIO, Beatriz Marti⁴

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPel), graduando em Agronomia, danipduarte@gmail.com; marceldurigon@bol.com.br; ²Mestrando em Fisiologia Vegetal, UFPel; ³Universidade Federal de Pelotas, Prof. Orientador, CCQFA – lucianoamarante@yahoo.com.br; ⁴Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA - Clima Temperado.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, ao longo de seu território, apresenta grande variação de tipos de solos. No Rio Grande do Sul, as áreas de várzea (solos hidromórficos) ocupam extensas áreas (5.400.000 ha - 20% da área total do Estado), porém, poucas culturas se adaptam a estas condições, visto que o alagamento ou umidade excessiva dificultam a difusão do oxigênio às raízes, o que limita a produção de energia e crescimento (DREW, 1997). A introdução de cultivares tolerantes nessas áreas pode constituir uma alternativa econômica ao cultivo do arroz-irrigado, principal espécie produzida nas áreas de várzea, entre elas, a soja, pois apresenta cadeia produtiva bem estruturada, com uma ampla rede de pesquisas que assegura soluções rápidas para possíveis problemas associados à cultura, oferece rápido retorno do investimento e é de fácil comercialização.

As plantas, para suportarem a deficiência de O₂, sofrem alterações metabólicas, anatômicas e fisiológicas. As variações nos teores de aminoácidos solúveis totais em tecidos de plantas submetidas a estresse por deficiência do oxigênio são descritas 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 hipoxia tem revelado aumentos nas concentrações e interconversão entre os aminoácidos (FAN et al., 1997; REGGIANI et al., 2000). Entre eles, o de maior concentração e destaque é a Alanina, pois confere tolerância das plantas à deficiência de O₂ e é um produto do metabolismo que não causa toxidez ao vegetal (Souza e Sodek, 2003). Por outro lado, as mudanças nas concentrações e perfil de compostos nitrogenados na seiva do xilema pode indicar o efeito de estresses sobre a assimilação de N no sistema radicular (Amarante et al, 2006).

Em soja, alguns mecanismos bioquímicos de tolerância ao estresse por encharcamento já têm sido caracterizados, bem como a existência de variabilidade genética para a tolerância a esse estresse (PIRES et al., 2002). Entretanto, são incipientes as informações a respeito das respostas metabólicas de genótipos de soja submetidas ao estresse por excesso de umidade no solo. O objetivo do trabalho foi, portanto, avaliar as concentrações de aminoácidos solúveis totais na seiva do xilema de duas cultivares de soja submetidas a diferentes períodos de inundação e de recuperação do sistema radicular após exposição à deficiência de O₂.

2 METODOLOGIA

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Sementes de soja (*Glycine max* L. Merril) de dois

cultivares, Fundacep 53 RR e BRS Macota, ambos de ciclo precoce, fornecidas pela Embrapa Clima Temperado, foram semeadas em vasos furados de polietileno, de três litros e contendo vermiculita média expandida lavada como substrato inerte. Oito sementes foram semeadas por vaso e após a germinação, no estádio V0 (FEHR et al., 1971), foi realizado o desbaste, permanecendo três plântulas por vaso, e a inoculação com *Bradyrhizobium elkanii*, estirpe Semia 587 (cedida pela FEPAGRO e multiplicada no Depto. de Microbiologia e Parasitologia - IB/UFPEL). A inoculação foi realizada por pipetagem de 2,5 mL de meio líquido de NORIS e DATE (1976) ao redor de cada plântula. As plantas de soja foram nutridas duas vezes por semana com solução de HOAGLAND e ARNON (1938) sem nitrogênio mineral, na proporção de 250 mL por vaso e irrigadas com água sempre que necessário. No estádio R2 (FEHR et al., 1971), o sistema radicular foi submetido à inundação, através do encaixe de um segundo vaso, de mesmo modelo e sem perfurações, nos vasos contendo as plantas e inundado com solução nutritiva diluída a 1/3 da concentração original, de forma a se manter uma lâmina de 20 mm sobre a superfície do substrato. O teor de O₂ na solução nutritiva dos vasos inundados foi monitorado diariamente com o auxílio de um oxímetro (Handylab OX1). Para a avaliação da recuperação das plantas, foi retirado o vaso sem perfurações do vaso contendo as plantas, de forma a permitir a rápida drenagem da solução de inundação.

A seiva do xilema foi coletada para a dosagem de aminoácidos solúveis totais (AAs) no 2º, 4º, 6º e 8º dia após a inundação (DAI) e recuperação (DAR), após as plantas terem sido submetidas a oito dias de inundação. Foi realizado um corte no caule da planta em forma de bisel, logo abaixo do nó cotiledonar, conforme descrito por McCLURE e ISRAEL (1979). Os exsudados foram coletados por até uma hora com auxílio de microcapilares de vidro, e transferidos para tubos *ependorf* em banho de gelo até o armazenamento final, a -20°C.

A dosagem de AAs foi realizada pelo método de YEMM e COCKING (1955), utilizando-se 1mL de cada amostra seiva e/ou dos padrões de leucina (0 - 200 nmol mL⁻¹), 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 metilcelulose e, após agitação, os tubos foram cobertos com bolas de vidro, sendo incubados em banho-maria a 100 °C por 20min. Posteriormente, os tubos foram 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.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 x 2 (regime hídrico x período de inundação x genótipos) com quatro repetições. A unidade experimental consistiu de um vaso com três plantas. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As análises foram realizadas com o auxílio do programa SAS (SAS Institute, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de O₂ monitorados ao longo da inundação foram próximos a zero mg L⁻¹, caracterizando a hipoxia (dados não mostrados). As concentrações de aminoácidos solúveis totais encontrados na seiva do xilema variaram ao longo do período de inundação, sendo observada resposta diferenciada ao déficit de O₂ no sistema radicular entre os dois genótipos de soja avaliados. O cultivar BRS Macota mostrou um decréscimo nos teores de aminoácidos com a hipoxia do sistema

radicular, sendo significativo no sexto dia de inundação, em relação ao seu controle e em relação ao período de inundação (Figura 1A). Já o cultivar Fundacep 53 RR não apresentou variação nos teores de AA quando comparado os períodos de inundação, no entanto, houve redução significativa dos teores comparados ao controle durante todo o período de tratamento (Figura 1B). A queda do teor de aminoácidos está relacionada à diminuição da disponibilidade de N às plantas, resultante do efeito inibitório da hipoxia sobre a fixação de N₂, uma vez que este processo depende estritamente do O₂ e as plantas foram nutridas com solução livre de N-mineral.

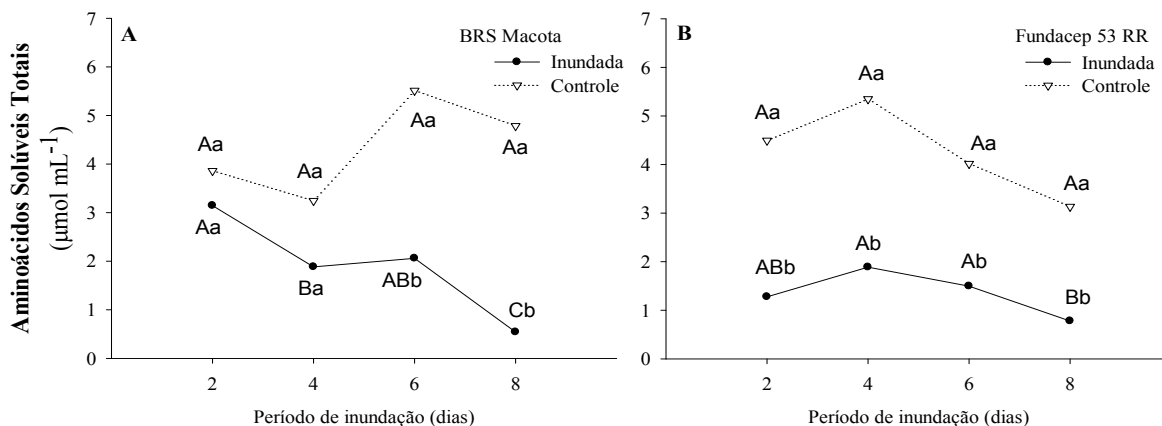


Figura 1. Concentração de aminoácidos solúveis totais em seiva de xilema de soja das cultivares BRS Macota (A) e Fundacep 53 RR (B) submetidas a diferentes períodos de inundação do sistema radicular. Letras maiúsculas comparam 2, 4, 6 e 8 dias para controle e inundado separadamente e letras minúsculas comparam controle e inundado para cada período de avaliação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

No período de recuperação, ambos os genótipos responderam de forma diferenciada, sendo que Fundacep 53 RR restabeleceu mais rapidamente os níveis de aminoácidos na seiva, equivalendo as concentrações do controle na primeira avaliação (2 dias), o que pode ter ocorrido em períodos mais curtos (Figura 1B). BRS Macota, embora tenha restabelecido os níveis de aminoácidos em relação ao controle, apresentou uma resposta mais lenta que Fundacep 53 RR, retornando aos teores normais apenas no quarto dia de recuperação (Figura 1A).

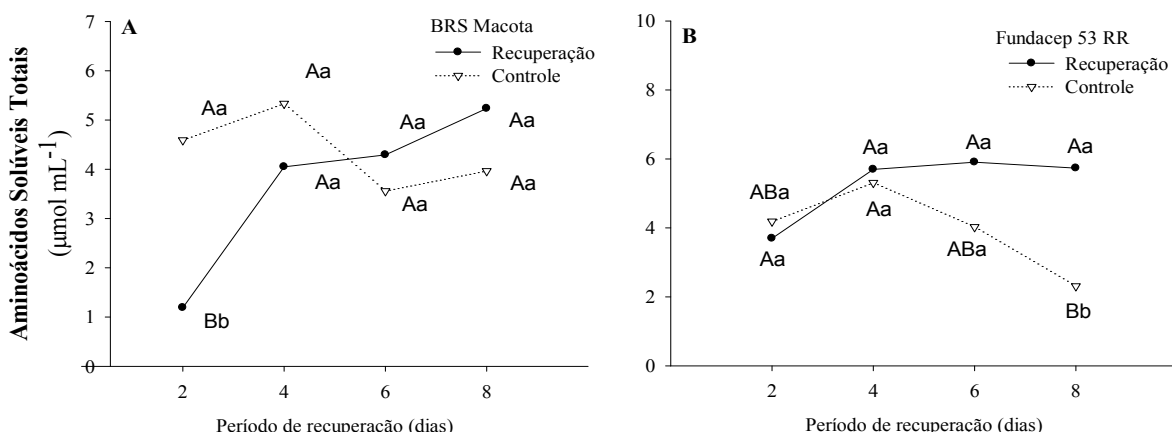


Figura 2. Concentração de aminoácidos solúveis totais em seiva de xilema de soja dos cultivares BRS Macota (A) e Fundacep 53 RR (B) durante diferentes períodos de recuperação, após inundação do sistema radicular por oito dias. Letras maiúsculas comparam 2, 4, 6 e 8 dias para controle e recuperação separadamente e letras minúsculas comparam controle e recuperação para cada período de avaliação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

4 CONCLUSÃO

Nas condições em que foram desenvolvidos os experimentos, há diminuição nas concentrações de aminoácidos solúveis totais no período de inundação para os dois genótipos de soja. Posteriormente, com o retorno a normoxia, há uma recuperação das concentrações de AAs, sendo -Fundacep 53 RR o genótipo que melhor mostrou melhor resultado.

5 AGRADECIMENTOS

Ao convênio Embrapa/Monsanto pelo apoio financeiro e bolsa concedida aos dois primeiros autores e à Fepagro pelo fornecimento da estirpe de *Bradyrhizobium*.

6 REFERÊNCIAS

- AMARANTE, L. DO; LIMA, J.D.; SODEK, L. Growth and stress conditions cause similar changes in xylem amino acids for different legume species. **Environmental and Experimental Botany**. v. 58, p.123-129, 2006.
- DREW, M.C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology** v.48, p. 223–250, 1997.
- Fan, T.W.-M., Higashi, R.M., Frenkiel, T.A. & Lane, A.N., 1997. Anaerobic nitrate and ammonium in flood-tolerant rice coleoptiles. *J. Exp. Bot.* 48: 1655-1666.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, v.11, p. 929-931, 1971.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method of growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**. n.347, p. 1- 39, 1938.
- McCLURE, P.R.; ISRAEL, D.W. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. **Plant Physiology**. v.64, p. 411-416, 1979.
- MIYASHITA, Y.; DOLFERUS, R.; ISMOND, K.P.; GOOD, A.G. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanina after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 49, p. 1108–1121, 2007.
- NORRIS, D.O.; DATE, R.A. Legume bacteriology. In: Tropical Pastures Research; Principles and Methods. SHAW, N.H. e BRYAN, W.W. (Eds). **Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, Bull.**, p. 134-174, 1976.
- PIRES, J.L.; SOPRANO, E.; CASSOL, B. Adaptações morfo-fisiológicas da soja em solo inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 37, p.41-50, 2002.
- Reggiani, R., Nebuloni, M., Mattana, M. & Brambilla, I., 2000. Anaerobic accumulation of amino acids in rice roots: role of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle. *Amino acids* 18: 207-217.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. Cary: Statistical Analysis System Institute, 2000. CD-ROM.
- SOUSA, C.A.F. DE; SODEK, L. Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. **Experimental Botany**. v.50, p.1-8, 2003.
- YEMM, E.M.; COCKING, E.C. Estimation of amino acids by ninhidrin. **The Analyst**. v.80, p. 209-213, 1955.