

### **Atividade da redutase do nitrato e acúmulo de prolina livre em genótipos de soja transgênica (BRS-RR) sob deficiência hídrica**

***Osmar Rodrigues<sup>1</sup>***  
***Mauro Celaro Teixeira<sup>1</sup>***  
***Edson Roberto Costenaro<sup>2</sup>***  
***Paulo Fernando Bertagnoli<sup>1</sup>***  
***Kaleb Pretto Gatto<sup>3</sup>***

Foto: Paulo Kurtz/Embrapa Trigo



**Passo Fundo, RS  
2009**



#### **Resumo**

A atividade da enzima redutase do nitrato (ARN) e o acúmulo de prolina livre são dois indicadores muito usados para avaliar o desempenho de cultivares quanto a tolerância à seca. Contudo, pouco é conhecido sobre o desempenho das cultivares de soja BRS-RR sob condições de deficiência hídrica, tanto em relação a ARN, quanto ao acúmulo de prolina livre. Assim, com o objetivo de verificar a existência de comportamento diferencial entre seis genótipos de soja quanto à tolerância a seca, foi estabelecido o experimento em casa de vegetação para avaliar a ARN e o acúmulo de prolina livre em plantas submetidas a níveis crescentes de deficiência hídrica, mediante a suspensão da irrigação, no ano de 2008/2009 na Embrapa Trigo, município de Passo Fundo, RS. Com relação à ARN, observou-se que a cultivar BRS Charrua RR, assim como a cultivar Embrapa 48, com o declínio

<sup>1</sup> Pesquisador da Embrapa Trigo, Caixa Postal 451, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS. E-mail: osmar@cnpt.embrapa.br; mauro@cnpt.embrapa.br; bertag@cnpt.embrapa.br.

<sup>2</sup> Analista Químico da Embrapa Trigo, Caixa Postal 451, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS. E-mail: edsonc@cnpt.embrapa.br.

<sup>3</sup> Acadêmico do Curso de Biologia da UPF. Estagiário da Embrapa Trigo.

progressivo do potencial hídrico, foram os genótipos que melhor responderam ao déficit hídrico. Já com relação ao acúmulo de prolina, observou-se que as cultivares BRS Macota e Embrapa 48 foram as cultivares que iniciaram o acúmulo de prolina em potenciais hídricos acima de  $-2$  bar.

## **Nitrate reductase activity and free proline accumulation in soybean cultivars under water deficit**

### **Abstract**

Nitrate reductase activity and free proline accumulation in plant tissues are good indicators and are often used to evaluate cultivar response to drought stress. However, little is known about the response to water stress of BRS soybean cultivars. In this way, with the objective of identify different responses of BRS soybean cultivars to water deficit an experiment was established in a growth chamber, during the 2008/2009 growing season, at Embrapa Trigo, Passo Fundo (RS), to evaluate nitrate reductase activity and free proline accumulation in plants exposed to increasing levels of water deficit by the suppression of irrigation. The best response to water stress, considering the nitrate reductase activity was found for BRS Charrua RR and for Embrapa 48. On the other hand, the cultivars BRS Macota and Embrapa 48 accumulated free proline earlier when compared to the other cultivars, even when the water potential was above  $-2$  bars.

### **Introdução**

A soja representa uma das mais importantes oleaginosas cultivadas no mundo devido ao alto valor protéico dos seus grãos, atingindo em algumas cultivares, teores superiores a 35%. Dessa forma, o nitrogênio que representa cerca de 18% do teor de proteína, assume nessa cultura a maior importância do ponto de vista quantitativo e qualitativo entre os macro-elementos nutricionais. Nessa oleaginosa, o nitrogênio utilizado para o seu crescimento e desenvolvimento, pode ter origem do nitrato disponível no solo como também pela fixação simbiótica do nitrogênio. A presença de ambas as fontes contribuem para o alto rendimento de grãos (HARPER e HAGEMAN, 1972).

Essa cultura, no sul do Brasil, frequentemente tem sido afetada pela deficiência hídrica, com perdas significativas na qualidade e quantidades de grãos. A disponibilidade hídrica é fator limitante nos processos biológicos das plantas, afetando desde a fotossíntese até a atividade de enzimas (TAIZ e ZEIGER, 2004). Algumas respostas da soja ao déficit hídrico incluem desde o crescimento celular, síntese protéica, atividade enzimática, fechamento estomático, assimilação de  $\text{CO}_2$ , respiração, translocação, acúmulo de prolina livre (HSIAO et al., 1973) até alteração nos processos de transcrição e tradução e na estrutura dos polissomas (MARUR et al., 2000). Entre essas alterações, destacam-se o efeito da deficiência hídrica na atividade de certas enzimas como a Redutase do Nitrato (RN), pela grande importância que o metabolismo do nitrogênio têm na composição do rendimento dessa

cultura. A RN é a primeira enzima na rota de assimilação do nitrato, e provavelmente representa o passo limitante na incorporação desse nutriente para as plantas (CAMPBELL, 1988). Em função da sua importância, a RN tem sido frequentemente utilizada como indicadora de estresses.

A deficiência hídrica produz um efeito bioquímico no aumento da concentração de compostos de baixo peso molecular, tais como aminoácidos livres, que sustentam o ajuste osmótico das plantas (TROTEL-AZIZ et al., 2003). Nesse sentido, a contribuição da prolina (Iminoácido) para melhorar a tolerância à seca tem sido mostrada (BANDURSKA e STROINSKI, 2003), onde a prolina atua como um “pool” de armazenagem de nitrogênio e como regulador do potencial osmótico celular.

A RN é uma das enzimas envolvidas no processo de redução do nitrato, transformando-o em nitrito, que é uma das fontes primárias de N disponível no ambiente (HATAM, 1980). Vários estudos têm avaliado o efeito da deficiência hídrica na atividade da redutase do nitrato (ARN) em várias espécies de plantas cultivadas (MORILLA et al., 1973; CHEN e SUNG, 1983; RODRIGUES, 1988; FUKUTOKU, 1996; MARUR et al., 2000). Contudo, pouco é conhecido sobre o desempenho de cultivares BRS de soja sob efeito da deficiência hídrica na ARN e no acúmulo de prolina livre nas condições do sul do Brasil. Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar a atividade da redutase do nitrato e o acúmulo de prolina livre em seis genótipos de soja BRS submetidos ao déficit hídrico crescente, a fim de verificar a existência de resposta diferencial entre as cultivares.

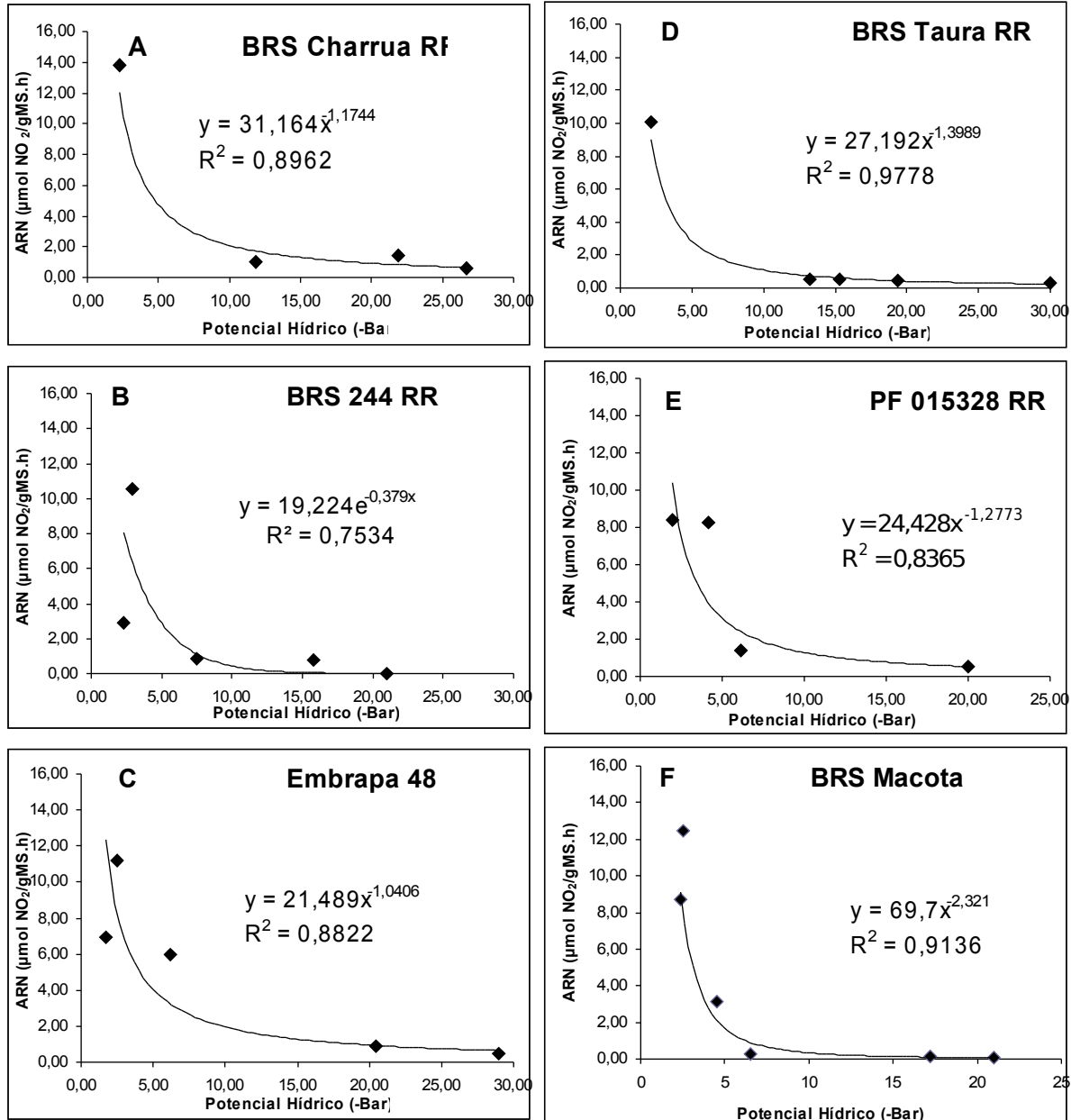
## **Metodologia**

O estudo foi conduzido no ano de 2008/2009, na Embrapa Trigo, município de Passo fundo, RS, cujas coordenadas geográficas são: 28° 15' S, 53° 24' W e 687 m de altitude. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se seis genótipos (BRS Charrua RR, BRS 244 RR, BRS Taura RR, BRS Macota, Embrapa 48 e PF 015328 RR). As cultivares foram semeadas em baldes com volume de 5 L, utilizando-se seis sementes por balde. Após a emergência, o excesso de plântulas foram removidas de modo a manterem-se duas plântulas uniformes por balde. As condições de cultivo e os tratamentos culturais (tratamentos fitossanitários) foram realizados de acordo com as normas técnicas da cultura para a região. As plantas foram mantidas irrigadas diariamente até atingirem no estágio de R5 (FEHR e CALVINESS, 1977), quando foram submetidas à desidratação crescente, mediante a suspensão da irrigação. À medida que a desidratação progredia, o potencial hídrico foi avaliado utilizando uma câmara de pressão (SCHOLANDER et al., 1965). As avaliações foram realizadas diariamente às 7:00 horas da manhã no terceiro trifólio foliar, completamente desenvolvido. Paralelamente, com a progressão da deficiência hídrica foram estimados o acúmulo de prolina livre e atividade da redutase do nitrato. O acúmulo de prolina livre, foi determinado utilizando nihidrina para o desenvolvimento de reação de cor (BATES et al., 1973) e a atividade da redutase do nitrato, foi avaliada *in vivo* (amostras foliares do quarto trifólio completamente desenvolvido) empregando método de Jaworski (1971), adaptado as condições locais. A ARN e o acúmulo de prolina livre foram correlacionados com o potencial hídrico foliar, e o grau de associação entre os diferentes parâmetros foi estimado por modelos de regressão exponencial e linear, respectivamente.

## Resultados e discussão

### Atividade da Redutase do Nitrato (ARN)

Nos genótipos estudados, observou-se de maneira geral similaridade no padrão de comportamento da ARN (Fig. 1), uma vez que em todos os genótipos a enzima sofreu queda abrupta na atividade, sob déficit hídrico. Tal comportamento foi descrito por um modelo exponencial, expresso por uma rápida queda na ARN nas primeiras 24 horas de desidratação (Fig. 1). Com base nesse comportamento, descrito pelo modelo exponencial, observou-se que nas cultivares Charrua RR e Taura RR (Fig. 1A e 1D) a desidratação foi muito intensa, condicionada pela sua maior biomassa, o que não propiciou a obtenção de informações da ARN em potenciais hídricos maiores que -10 bar.



**Fig. 1.** Atividade da redutase do nitrato em função do potencial hídrico em seis genótipos de soja.

Na cultivar BRS Charrua RR, assim como na cultivar Embrapa 48, observou-se que com o declínio progressivo do potencial hídrico, foram os genótipos que melhor responderam ao déficit hídrico, em termos de ARN (Fig. 1A e 1C). Nessas cultivares foi observado que, mesmo com potencial hídrico de

–5 e –10 bar, a ARN apresentou uma menor queda, comparativamente aos demais genótipos, mas principalmente, quando comparado com as cultivares BRS Macota e BRS 244 RR (Fig. 1F e 1B).

Com base no modelo utilizado, observou-se nas cultivares BRS Macota e BRS 244 RR (Fig. 1F e 1B) uma queda na ARN muito mais acentuada e rápida que nas demais cultivares estudadas, podendo-se assim postular que estas cultivares foram mais sensíveis ao déficit hídrico em comparação com as demais, no que diz respeito à ARN. Já a cultivar BRS Taura RR e a linhagem PF 015328 RR possuem comportamento intermediário em relação às demais cultivares estudadas, não demonstrando serem tão eficientes em resposta ao estresse hídrico.

A queda de atividade da ARN na soja em função da deficiência hídrica foi observada por Chen e Sung (1983) e Fukutoku (1996). Tal efeito pode ser atribuído à alta degradação e inativação da enzima (LOBATO et al., 2008), provocada pela falta de poder redutor (NADH) ou de carboidratos, necessários a ARN (SINHA e NICHOLAS, 1981; FOYER et al., 1998). Outra possível causa da redução da ARN é a redução do fluxo de nitrato durante o déficit hídrico, uma vez que a síntese da referida enzima é induzida pelo substrato (FUKUTOKU, 1996), logo este fluxo regula a síntese da enzima. A redutase do nitrato tem uma meia-vida de poucas horas e quando há uma diminuição da disponibilidade de nitrato, a quantidade da enzima é reduzida (TAIZ e ZEIGER, 2004).

### **Acúmulo de Prolina Livre**

Em todos os genótipos estudados houve um acréscimo de produção de prolina à medida que o potencial hídrico diminuiu (Fig. 2). Tal comportamento foi descrito por um modelo linear ( $y = ax + b$ ) entre o acúmulo de prolina e potencial hídrico (Fig. 2). Com base na projeção do modelo sobre o eixo “x”, que denota o potencial hídrico onde iniciou o acúmulo de prolina, procurou-se discriminar os genótipos estudados. Assim, observou-se uma ligeira diferença entre as cultivares com relação ao potencial hídrico no qual iniciou o acúmulo crescente de prolina. Usando como fator de comparação o rápido acúmulo de prolina em potencial hídrico alto, pode-se observar que as cultivares BRS Macota e Embrapa 48 (Fig. 2F e 2C) foram as cultivares que iniciaram o acúmulo de prolina em potenciais hídricos acima de –2 bar. Já as demais cultivares, coincidentemente as cultivares transgênicas (BRS-RR), iniciaram o acúmulo de prolina quando o nível de desidratação foi mais intenso (potenciais hídricos abaixo de –2 bar). Nas cultivares BRS Charrua RR e BRS Taura RR (Fig. 2A e 2D), o início do acúmulo de prolina foi desencadeado nos níveis mais baixos de potencial hídrico, comparativamente aos demais genótipos (–5,23 bar para BRS Charrua e –5,26 bar para BRS Taura). A cultivar BRS 244 RR e a linhagem PF 015328 RR demonstraram comportamento intermediário entre os genótipos estudados, apresentando o início do acúmulo de prolina após –3,50 e –2,18 bar, respectivamente.

Muitos estudos já foram conduzidos no que diz respeito ao acúmulo de prolina para fins de tolerância à seca com resultados semelhantes aos aqui reportados. Riekert van Heerden e Krüger (2002) em soja observaram que o acúmulo de prolina ocorreu no início da desidratação, em potenciais hídricos de –2 bar.

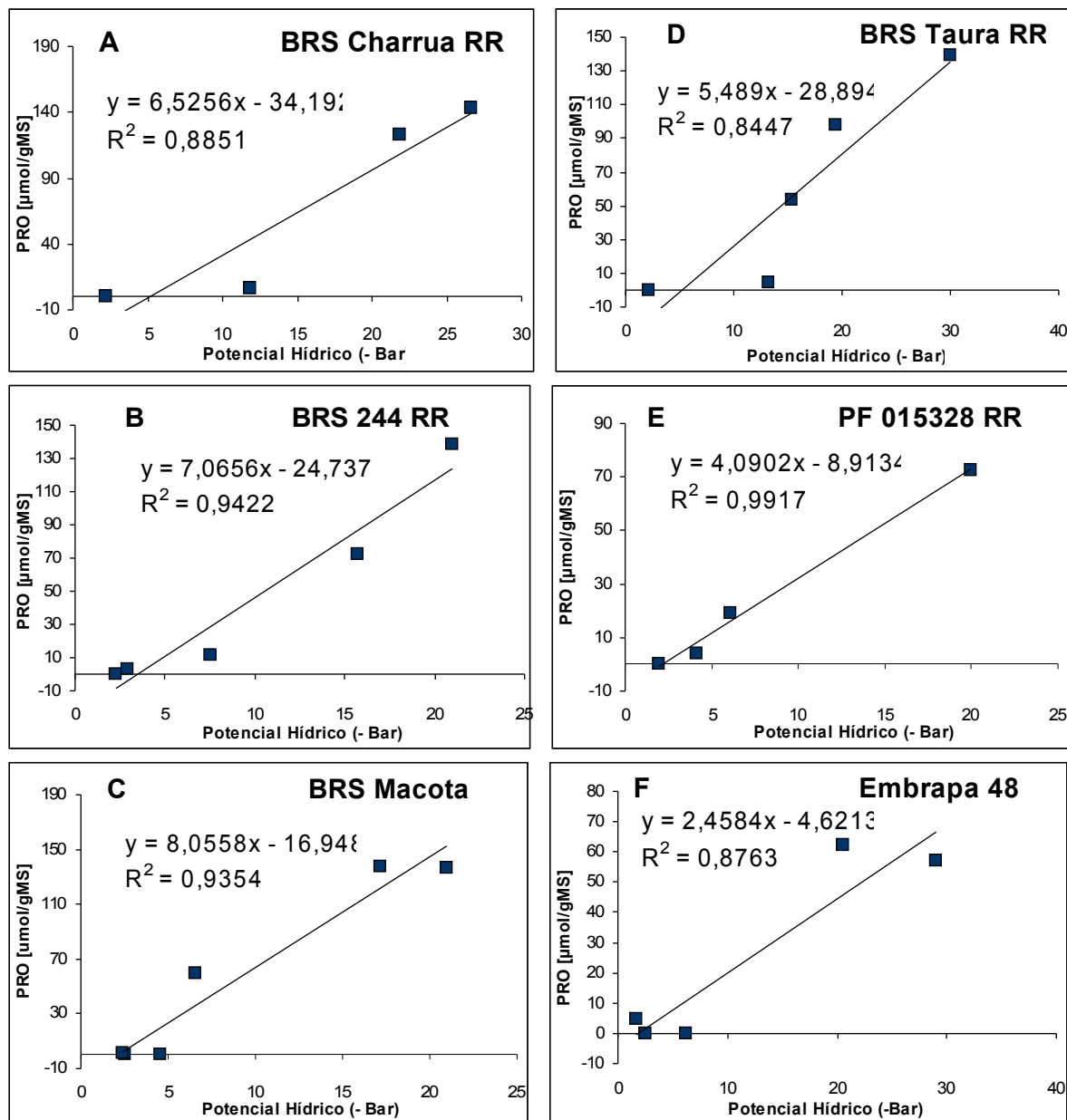


Fig. 2. Acúmulo de prolina livre em função do potencial hídrico em seis genótipos de soja.

### Conclusões

A ARN foi maior nas cultivares BRS Charrua RR e Embrapa 48 mesmo com potencial hídrico de -5 e -10 bar, comparativamente aos demais genótipos.

Com relação ao acúmulo de prolina livre, as cultivares BRS Macota e Embrapa 48, iniciaram o acúmulo de prolina em potenciais hídricos acima de -2 bar. Já as demais cultivares (BRS-RR), iniciaram o acúmulo de prolina quando o nível de desidratação foi mais intenso (potenciais hídricos abaixo de -2 bar).

## Referências bibliográficas

- BANDURSKA, H.; STROINSKI, A. ABA and proline accumulation in leaves and roots of wild (*Hordeum spontaneum*) and cultivated (*Hordeum vulgare* 'Maresi') barley genotypes under water deficit conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 25, p. 55-61, 2003.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.
- CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 74, p. 214-219, 1988.
- CHEN, C. L.; SUNG, J. M. Effect of water stress on the reduction of nitrate and nitrite by soybean nodules. **Plant Physiology**, v. 73, p. 1065-1066, 1983.
- FEHR, W. R.; CALVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University - Agriculture and Home Economics Experiment Station - Cooperative Extension Service, 1977. 11 p. (Special Report, 80).
- FOYER, C. H.; VALADIER, M. H.; MIGGE, A.; BECKER, T. W. Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. **Plant Physiology**, v. 117, p. 283-292, 1998.
- FUKUTOKU, Y. Effect of water stress on nitrate assimilation in soybean leaves. **Bull. Fac. Agr. Saga Univ.**, n. 80, p. 69-76, 1996.
- HARPER, J. E.; HAGEMAN, R. H. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Plant Physiology**, v. 49, p. 146-154, 1972.
- HATAM, M. Seasonal and diurnal variations in nitrate reductase activity of soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Plant and Soil**, v. 56, p. 27-32, 1980.
- HSIAO, T. C. Plant responses to water stress potential. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 24, p. 519-570, 1973.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 43, p. 1274-1279, 1971.
- LOBATO, A. K. S.; MEIRELLES, A. C. S.; SANTOS FILHO, B. G.; COSTA, R. C. L.; OLIVEIRA NETO, C. F.; CRUZ, F. J. R.; FREITAS, J. M. N.; GUEDES, E. M. S.; BARRETO, A. G. T.; FERREIRA, A. S.; MONTEIRO, B. S.; NEVES, H. K. B.; LOPES, M. J. S. Consequences of progressive water deficit and rehydration on nitrate reductase activity and nitrogen compounds in soybean (*Glycine max* cv. Sambaiba). **Research Journal of Agronomy**, v. 2, p. 64-70, 2008.
- MARUR, C. J.; MAZZAFERA, P.; MAGALHÃES, A. C. Atividade da enzima redutase do nitrato em algodoeiro submetido ao déficit hídrico e posterior recuperação da turgescência. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 277-281, 2000.

MORILLA, C. A.; BOYER, J. S.; HAGEMAN, R. H. Nitrate reductase activity and polyribosomal content of corn (*Zea mays* L.) having low leaf water potential. **Plant Physiology**, v. 51, p. 817-824, 1973.

RIEKERT VAN HEERDEN, P. D.; KRUGER, G. H. J. Separately and simultaneously induced dark chilling and drought stress effects on photosynthesis, proline accumulation and antioxidant metabolism in soybean. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 1077-1086, 2002.

RODRIGUES, O. **Efeito da deficiência hídrica na fotossíntese, na resistência estomática, na atividade da redutase do nitrato e no acúmulo de prolina livre em *Coffea arabica* L.** 1988. 52 p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SCHOLANDER, P. F.; HAMMEL, H. T.; BRADSTREET, E. D.; HEMMINGSEN, E. A. Sap pressure in vascular plants. **Science**, v. 148, p. 339-346, 1965.

SIMON-SARKADI, L.; KOCSY, G.; VÁRHEGYI, Á.; GALIBA, G.; DE RONDE, J. A. Stress-induced changes in the free amino acid composition in transgenic soybean plants having increased proline content. **Biologia Plantarum**, v. 50, p. 793-796, 2006.

SINHA, S. K.; NICHOLAS, D. J. D. Nitrate reductase. In: PALEG, L. G.; ASPINAL, D. **The physiology and biochemistry of drought resistance in plants**. Sydney: Academic Press, 1981. p. 145-169.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TROTEL-AZIZ, P.; NIOGRET, M. F.; DELEU, C.; BOUCHEREAU, A.; LARHER, F. R. The control of proline mobilization by abscisic acid during osmotic stress recovery of canola leaf discs. **Physiologia Plantarum**, v. 116, p. 213-221, 2003.



**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Online, 71**

Embrapa Trigo  
Caixa Postal, 451, CEP 99001-970  
Passo Fundo, RS  
Fone: (54) 3316 5800  
Fax: (54) 3316 5802  
E-mail: sac@cnpt.embrapa.br

**Expediente**

Comitê de Publicações

Presidente: **Leandro Vargas**

Anderson Santi, Antônio Faganello, Casiane Saete Tibola, Leila Maria Costamilan, Lisandra Lunardi, Maria Regina Cunha Martins, Sandra Maria Mansur Scagliusi, Sandro Bonow

Referências bibliográficas: Maria Regina Martins  
Editoração eletrônica: Márcia Barrocas Moreira Pimentel

RODRIGUES, O.; TEIXEIRA, M. C. C.; COSTENARO, E. R.; BERTAGNOLLI, P. F.; GATTO, K. P. **Atividade da redutase do nitrato e acúmulo de prolina livre em genótipos de soja transgênica (BRS-RR) sob deficiência hídrica**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. 12 p. html. (Embrapa Trigo. Boletim de pesquisa e desenvolvimento online, 71). Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p\\_bp71.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp71.htm)>.



