



ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO E DA APLICAÇÃO DE GLIFOSATO SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTAMINA SINTETASE EM NÓDULOS RADICULARES DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA

SCHNEIDER, Léa¹; LIMA, Milene Conceição²; DURIGON, Marcel Angelo²; DO AMARANTE, Luciano²; AGOSTINETTO, Dirceu²; BOHM, Giani Mariza Bärwald¹

¹Dept^o de Biologia – IB/UFP e Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas - CEFET; ²Dept^o de Fitossanidade – FAEM/UFPel e Dept^o de Bioquímica – IQG/UFPEL

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.

mschneiderlea@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A área cultivada com soja geneticamente modificada (GM_{RR}) tem sido incrementada de forma acelerada no mundo inteiro. Em 2006 atingiu 58,6 milhões de hectares, que representa 57% da área global da agricultura biotecnológica. O Brasil se insere nesse cenário como terceiro maior produtor mundial de soja GM_{RR}, totalizando 11,5 milhões de hectares (ISAAA, 2006).

Os efeitos do glifosato sobre fisiologia da planta e fixação biológica de nitrogênio foram estudados por REDDY et al. (2000), KING et al. (2001), REDDY & ZABLOTOWICZ (2003) e ZABLOTOWICZ & REDDY (2007). Inicialmente, REDDY et al. (2000) e KING et al. (2001) observaram, em condições de casa de vegetação, que glifosato aplicado na dosagem recomendada pelo fabricante, reduziu o número e a massa de nódulos, o conteúdo de leg-hemoglobina e o teor de N na planta. Esse efeito foi parcial em condições de campo (ZABLOTOWICZ & REDDY, 2007).

Além disto, o efeito negativo do glifosato sobre as bactérias simbiotes (*B. japonicum*) e sobre a redução de acetileno em condições de ensaio em meio de cultura e em casa de vegetação citado por REDDY & ZABLOTOWICZ (2003). Atualmente, duas são as espécies de bactérias capazes de nodular as raízes de soja e fixar o N₂: *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*. MALTY et al. (2006) verificaram que o glifosato apresenta efeitos inibitórios sobre o crescimento de *Bradyrhizobium* em meio de cultura.

O glifosato é um ingrediente ativo herbicida que inibe a enzima 5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase ou EPSPS) e impede que a planta forme aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas e também alguns metabólitos secundários (KRUSE et al., 2000). A resistência induzida por meio da introdução de um gene que corresponde a uma izoenzima da EPSPS tem possibilitado a aplicação de glifosato na pós-emergência no cultivo de soja GM_{RR}, gerando a dúvida se esse procedimento pode ou não causar impacto sobre o metabolismo da planta.

A glutamina sintetase (GS; EC 6.3.1.2) ocupa uma posição central no metabolismo do nitrogênio nas plantas, pois é responsável pela assimilação inicial do amônio. A atividade coordenada da GS possibilita a assimilação do amônio liberado pela redutase do nitrito, quando nitrato está disponível à planta e/ou pela atividade da nitrogenase, enzima responsável pela fixação do N₂ atmosférico no caso de plantas associadas simbioticamente com rizóbio. A GS catalisa a incorporação do amônio no glutamato, formando glutamina, reação dependente de ATP (GREGORSON et al. 1993). A conversão de glutamina em outros aminoácidos envolve, inicialmente, a ação da glutamato sintase que catalisa a transferência do grupo δ-amino da glutamina no α-cetoglutarato, produzindo duas moléculas de glutamato, às custas de poder redutor do NADH (LEA & IRELAND, 1999). A atividade destas enzimas aumenta durante o desenvolvimento dos nódulos e com o aumento na disponibilidade de energia (ATP) no meio de reação (SILVA, 1998; BURRIS, 1999).

Vários trabalhos indicaram que a determinação da atividade da enzima GS poderia ser utilizada como um parâmetro auxiliar na seleção de genótipos mais eficientes na utilização do nitrogênio (MACHADO & MAGALHÃES, 1995). É importante destacar que existe variabilidade genética para essa característica (MAGALHÃES et al., 1993).

Tendo em vista a importância da enzima glutamina sintetase para a assimilação do nitrogênio, processo fundamental para o acúmulo de proteínas em sementes de soja, e da escassez de informações a respeito da influência sobre sua atividade, de herbicidas utilizados na cultura da soja, especialmente o glifosato, assim como o processo de transgenia para obtenção de cultivares resistentes ao herbicida, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade da GS em nódulos de soja transgênica e da cultivar isogênica não modificada submetidas a diferentes dosagens de herbicidas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram instalados no Campus Agropecuário da Palma (CAP) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), localizado no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. O solo da área experimental é classificado como Podzólico vermelho escuro distrófico (EMBRAPA, 2006). Como materiais vegetais foram utilizados sementes de soja GM_{RR} BRS 244 RR e NM BRS 154 (isogênica) fornecidas pela Embrapa-Trigo. A concessão dessas sementes foi concretizada através de Acordo de Transferência de Material firmado entre a UFPEL e a Embrapa, em 2005. O referido termo encontra-se junto à UFPEL e à Embrapa.

No experimento realizado no CAP foram testados os seguintes tratamentos, todos com 03 repetições, num delineamento inteiramente casualizado: T1- soja BRS 244 RR sem aplicação de herbicida, com capina manual aos 28 dias após o plantio (dap); T2- soja BRS 154 sem aplicação de herbicida, com capina aos 28 dap; T3- soja BRS 244 RR com uma aplicação de glifosato a 960 g ia ha⁻¹ aos 28 dap; T4- soja BRS 244 RR com duas aplicações de glifosato a 960 g ia ha⁻¹ aos 28 e 38 dap; T5- soja BRS 244 RR com aplicação de herbicida imazetapir a 100 g ia ha⁻¹ aos 28 dap; T6- soja BRS 154 com aplicação de herbicida imazetapir a 100 g ia ha⁻¹ aos 28 dap.

A extração da enzima glutamina sintetase (GS; EC 6.3.1.2) foi realizada por método de CULLIMORE et al. (1983). Cerca de meio grama de nódulos,

previamente lavado em água destilada gelada, foi macerado em almofariz, sob temperatura de 4°C em câmara fria, com tampão de extração Tris-HCl 100 mM, pH 7,8, contendo 1 mM de DTT, 5 mM de glutamato de sódio, 10 mM de MgCl₂ e 10 % de glicerol, na razão de 5 mL por grama de massa fresca e 20 % de polyclar AT (PVPP) com base na massa de tecido fresco. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 x g por 20 min a 4°C e uma alíquota do sobrenadante foi dessalinizada em coluna Sephadex G-25 médio, de volume total de 10 mL (PD-10; Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com tampão de extração.

A atividade da GS foi dosada pelo método semi-biossintético, segundo CULLIMORE *et al.* (1982). Nesse caso, foi realizada a medição de γ -glutamil hidroxamato, produto da reação obtido quando a hidroxilamina (NH₂OH) é utilizada como substrato alternativo para o NH₄⁺, sendo as absorbâncias registradas a 535nm em espectrofotômetro. Com base nestas leituras, os dados de atividade foram calculados e submetidos à análise de variância, e à comparação de médias pelo método LSD, utilizando-se o programa Statistix 8.0[®].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação de glifosato na soja GM_{RR} resultou na diminuição da atividade da enzima glutamina sintetase (Tabela 1).

Tabela 1 - Teores da enzima Glutamina sintetase em nódulos de soja geneticamente modificada (GM_{RR}, BRS 244RR) e não modificada (NM, BRS 154) com herbicidas, cultivadas na safra de 2008 no Centro Agropecuário da Palma (CAP/UFPel).

Tratamentos	Atividade da glutamina sintetase ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF min}^{-1}$)
T1- BRS 244RR - capina	31,038 ^a
T2- BRS154 - capina	28,403 ^a
T3- BRS 244RR - 1x glifosato	17,276 ^b
T4- BRS 244RR - 2x glifosato	13,469 ^b
T5- BRS 244RR - 1x imazetapir	11,932 ^b
T6- BRS 154 - 1x imazetapir	11,054 ^b
Média	18,862
CV (%)	20,08
P	0,0001

As maiores atividades da enzima glutamina sintetase foram detectadas em nódulos de soja dos tratamentos T1 e T2, justamente aqueles sem aplicação do herbicida, ou seja, mostrando que a modificação genética não influenciou nos teores da enzima GS nos nódulos de soja.

A aplicação do glifosato nos tratamentos T3 e T4, bem como, a aplicação do imazetapir nos tratamentos T5 e T6 resultaram em diminuição nas atividades da GS o que pode indicar uma provável redução nos teores de nitrogênio disponível na planta. Outros autores como MACHADO & MAGALHÃES (1995) e MAGALHÃES & MACHADO (1995) verificaram que a atividade da enzima GS interfere diretamente nos teores de N da planta.

4. CONCLUSÕES

A aplicação dos herbicidas glifosato e imazetapir, nas dosagens recomendadas, causaram diminuição da atividade da enzima glutamina sintetase, tanto nos nódulos de soja geneticamente modificada como na isogênica.

Os resultados obtidos sugerem que a modificação genética para o gene que codifica isoenzima da EPSPS não influencia a atividade da enzima glutamina sintetase.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FUNGUETTO C. I. ; TILLMANN M. Â. A. ; VILLELA F. A.; DODE L. B. Detecção de Sementes de Soja Geneticamente Modificada Tolerante ao Herbicida Glifosato, **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 26, nº1, p.130-138, 2004.

MAGALHÃES J.R., MACHADO A.T. Biochemical parameters selecting maize for nitrogen assimilation efficiency under stress conditions. In: Simpósio Internacional sobre Estresse Ambiental: O Milho em Perspectiva, 1995, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte: Embrapa/CNPMS, 1995. 449p. p 345-367.

MAGALHÃES J.R., MACHADO A.T, FERNANDES M.S., et al. Nitrogen assimilation efficiency in maize genotypes under ammonia stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.5, n.2, p.163-166, 1993.

MACHADO A.T., MAGALHÃES J.R. Melhoramento de milho para uso eficiente de nitrogênio sob condições de estresse. In: Simpósio Internacional sobre Estresse Ambiental: O Milho em Perspectiva, 1995, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte: Embrapa/CNPMS, 1995. 449p. p.321-343.

BREDEMEIER C., MUNDSTOCK C. M. Regulação da Absorção e Assimilação do Nitrogênio nas Plantas, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.

ISAAA- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications - Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. Online. Disponível na internet em:<http://www.isaaa.org./Resources/Publications/briefs/35/executivesummary/default.html> Acesso em 15 de maio 2007.

REDDY, K.N; ZABLOTOWICZ, R. M. Glyphosate-resistant soybean response to various salts of glyphosate and glyphosate accumulation in soybean nodules. **Weed Science**, v.51, p.496-502, 2003.

ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K.N. Nitrogenase activity, nitrogen content, and yield responses to glyphosate in glyphosate-resistant soybean. **Crop Protection**, v.26, p.370-376, 2007.

REDDY K.N.; HOAGLAND R. E; ZABLOTOWICZ R.M. Effect of glyphosate on growth, chlorophyll, and nodulation in glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) varieties. **Journal New Seeds**, v.2, p.37-52, 2000.

KING C.A.; PURCELL L. C.; VORIES E.D. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. **Agronomy Journal**, v.93, p.179-186, 2001.