

TEOR DE AMINOÁCIDOS SOLÚVEIS TOTAIS EM TECIDOS FOLIARES E RADICULARES DE MIL-FOLHAS (*Achillea millefolium* L.)

LIMA, Milene Conceição¹; BORELLA, Junior²; DURIGON, Marcel Angelo³; MARIOT, Márcio Paim⁴, AMARANTE, Luciano do⁵

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas/UFPeL, Caixa postal 354 CEP 96010-900, Capão do Leão/RS. E-mail: mcl_bio@hotmail.com;

²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas/UFPeL;

³Graduando em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas/UFPeL;

⁴Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça/CAVG, IF Sul Rio-grandense, Pelotas.

⁵Instituto de Química e Geociências, Universidade Federal de Pelotas/UFPeL.

1 INTRODUÇÃO

Dentre os processos fisiológicos vegetais mais importantes está o metabolismo do nitrogênio, elemento presente na composição de diversas biomoléculas como nucleotídeos, ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, fitohormônios e clorofilas, que são metabólitos essenciais para o desenvolvimento vegetal, conduzindo a um longo complexo de vias metabólicas altamente reguladas (OLIVEIRA, 2006).

O nitrogênio pode ser transportado, via xilema, na corrente transpiratória, na forma de nitrato, aminoácidos (aspartato ou glutamato), amidas (asparagina ou glutamina) ou ureídeos (alantoína ou ácido alantóico). As plantas que não formam associações para fixar N₂ podem transportar nitrogênio tanto na forma de nitrato como na forma de aminoácidos. A taxa de transporte afeta a concentração de nitrogênio nos tecidos vegetais. Em geral, o teor de nitrogênio é maior em tecidos jovens, reduzindo com a ontogenia, sobretudo nas folhas (MARENCO; LOPES, 2005).

Os aminoácidos são importantes formas de transporte do nitrogênio orgânico proveniente da redução e assimilação do nitrato e amônio na maioria das espécies vegetais e esse processo pode ocorrer nos tecidos foliares ou radiculares (KERBAUY, 2004).

O armazenamento, remobilização e transporte de aminoácidos permite a reciclagem interna do nitrogênio reduzido e a manutenção do metabolismo e crescimento, mesmo quando o nitrogênio do ambiente se torna limitante. Esse armazenamento e remobilização dependem fundamentalmente do transporte de aminoácidos (AMARANTE, 2002).

O transporte de aminoácidos a longa distância envolve uma reciclagem constante entre as partes aéreas das plantas e as raízes, mediada pelas trocas entre xilema e floema. O conteúdo de aminoácidos do floema pode controlar também a velocidade de absorção de nitrogênio. Trabalhos demonstram que o enriquecimento artificial do floema com aminoácidos resulta num decréscimo da absorção de nitrogênio (IMSANDE; TOURAINE, 1994).

O conhecimento da influência da luz e do teor de nitrogênio disponível à planta na absorção, assimilação e transporte do nitrogênio em plantas medicinais é extremamente importante na avaliação do seu comportamento fisiológico nos diferentes estádios de desenvolvimento.

Com base nesses fatores, o objetivo deste trabalho foi avaliar o teor de aminoácidos solúveis totais em tecidos foliares e radiculares de mil-folhas (*Achillea*

millefolium L.) cultivada sob diferentes níveis de sombreamento e doses de nitrogênio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo do material vegetal e condução dos experimentos foram realizados nas áreas experimentais do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça/CAVG, IF Sul Rio-grandense, Pelotas, RS.

As mudas de mil-folhas obtidas por divisão de touceiras foram cultivadas em estufa e após transferidas para o campo. A divisão de touceira foi realizada a partir de uma planta matriz, obtendo-se mudas que, com quatro meses de idade, foram transplantadas para canteiros no campo experimental e irrigadas através de um sistema de gotejamento. Os teores de fósforo e potássio do solo foram corrigidos com superfosfato triplo e cloreto de potássio na proporção de 35 kg ha⁻¹ e 15 kg ha⁻¹, respectivamente.

As plantas foram cultivadas sob três doses de nitrogênio (0, 75 e 150 kg uréia ha⁻¹) durante cinco meses e aos 56 dias que antecederam a coleta, foram submetidas a dois níveis de sombreamento: 0% (luz plena) e 75% (sombrite 75%).

Adotou-se o delineamento experimental de blocos inteiramente casualizados em esquema fatorial 3 x 2 (doses de nitrogênio e níveis de sombreamento) com quatro repetições e a unidade experimental consistiu de dez plantas.

A extração foi realizada utilizando amostras de 1 g de folhas jovens expandidas, sem a nervura central, e de raízes das plantas no estágio de desenvolvimento reprodutivo.

Os tecidos vegetais foram homogeneizados em almofariz, utilizando N₂ líquido e posterior adição de 10 mL de solução extratora M:C:W (metanol:clorofórmio:água na proporção de 12:5:3). As amostras foram deixadas em repouso por 24 horas à temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas a 600 x g durante 10 minutos. A cada 8 mL de sobrenadante obtido, foi acrescentado 2 mL de clorofórmio e 3 mL de água pura em tubos de ensaio, os quais foram centrifugados novamente a 600 x g durante 10 minutos para obter o extrato aquoso. Esse foi coletado e concentrado por evaporação em banho-maria a 37°C por 24 horas, com a finalidade de eliminar o excesso de metanol e resíduos de clorofórmio presentes. Os extratos foram então armazenados em tubos de eppendorf, em freezer, para posterior análise dos teores de aminoácidos solúveis totais (BIELESKI; TURNER, 1966).

Os extratos de folhas e raízes diluídos em água pura, em um volume final de 1 mL, foram acrescidos de 0,5 mL de tampão citrato 0,2 M com pH 5,0, 0,2 mL de reativo de ninhidrina 5% e 1 mL de KCN 2% (v/v), ambos dissolvidos em éter monometílico de etilenoglicol. Os tubos de ensaio foram agitados, tampados com bolas de vidro e transferidos para o banho-maria a 100°C por 20 minutos. Em seguida, foram colocados no escuro até atingir a temperatura ambiente e após foi acrescentado 1,3 mL de etanol 60%, completando o volume para 4 mL e feita a agitação dos tubos. A densidade ótica dos padrões de leucina (0-200 nmol) e das amostras foi medida a 570 nm, sendo feitas três repetições para cada amostra e o teor de aminoácidos solúveis totais foi expresso em µmol g⁻¹ MF (YEMM; COCKING, 1955).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro, no programa estatístico The SAS System.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O teor de aminoácidos solúveis totais em tecidos foliares e radiculares de *Achillea millefolium* L. não foi influenciado pela interação entre os níveis de sombreamento e as doses de nitrogênio. Dentre os efeitos dos fatores principais sobre esta variável, apenas as diferentes concentrações nitrogenadas influenciaram os teores nos tecidos radiculares (Tabela 1 e 2).

Os tecidos radiculares apresentaram um teor de aminoácidos solúveis totais aproximadamente cinco vezes maior em relação aos tecidos foliares (Tabela 1). Esses resultados sugerem uma atividade do metabolismo nitrogenado diferenciado entre os dois órgãos, podendo-se atribuir o teor elevado de aminoácidos nas raízes à transferência do nitrogênio assimilado nas folhas ao sistema radicular via floema, visto que resultados com esta espécie, sugerem que a assimilação primária do nitrogênio é preferencial nos tecidos foliares, demonstrado pela atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase (LIMA, 2009).

Tabela 1. Teor de aminoácidos solúveis totais em folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. submetida a níveis de sombreamento

Níveis de sombreamento	Teor de aminoácidos solúveis totais ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	
	Folhas	Raízes
Sombrite 75%	3,41 a	18,21 a
Luz plena	3,67 a*	17,35 a

*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

MARCHETTI (2006) verificou na espécie de *Memora peregrina* da família Bignoniaceae, uma concentração de aminoácidos solúveis totais maior em rizomas quando comparada com as folhas, assim como observado com *Achillea millefolium* L. O teor de aminoácidos é expressivo nos rizomas de *Memora peregrina* durante seu percurso entre floema e xilema, possibilitando assim a introdução de mais aminoácidos no sistema vascular, provenientes dos processos de assimilação de nitrogênio. Em plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de amônio, o teor de aminoácidos solúveis totais nas raízes foi maior quando comparado com o das folhas (SHAN *et al.*, 2007).

Na tabela 2 constam os teores de aminoácidos solúveis totais em folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio. Os tecidos foliares não sofreram influência significativa das concentrações de nitrogênio testadas. Já nas raízes, os teores foram significativamente menores na presença de adubação nitrogenada. A presença do íon amônio deveria estimular a formação de aminoácidos elevando o seu teor. É possível que nesses tratamentos, a maior disponibilidade de nitrogênio tenha estimulado a produção de outros compostos nitrogenados a partir dos aminoácidos, como proteínas e ácidos nucleicos, necessários ao crescimento do vegetal, diminuindo o seu teor.

Tabela 2. Teor de aminoácidos solúveis totais em folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. submetida a diferentes concentrações de nitrogênio

Concentrações de N (Kg uréia ha ⁻¹)	Teor de aminoácidos solúveis totais (μmol g ⁻¹ MF)	
	Folhas	Raízes
0	3,69 a*	20,96 a
75	3,26 a	16,19 b
150	3,66 a	16,19 b

*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

4 CONCLUSÕES

Os teores de aminoácidos solúveis totais em mil-folhas são maiores nos tecidos radiculares do que nos tecidos foliares.

A adubação nitrogenada na forma de uréia influencia os teores de aminoácidos solúveis totais em tecidos radiculares no estágio de desenvolvimento reprodutivo dessa planta.

5 REFERÊNCIAS

- AMARANTE, L. **Transporte e metabolismo de glutamina em soja (*Glycine max* L.): uma relação estreita com a fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico**. 2002. 173 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- BIELESKI, R. L.; TURNER, N. Separation and estimation of aminoacids in crude plant extracts by thin-layer eletrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 17, p. 278-293, 1966.
- IMSANDE, J.; TOURAINE, B. N Demand and the Regulation of Nitrate Uptake. **Plant Physiol**, v. 105, p. 03-07, 1994.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.
- LIMA, M. C. **Influência de níveis de sombreamento sobre o crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos e assimilação de nitrogênio em mil-folhas (*Achillea millefolium* L.)**. 2009. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.
- MARCHETTI, C. R. **Taxa de crescimento e metabolismo nitrogenado de *Memora peregrina* (Miers). Sandwith (Bignoniaceae) - espécie invasora de pastagens**. 2006. 79 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.
- MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia Vegetal: Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Editora UFV: Viçosa, 2005. 451 p.
- OLIVEIRA, D. B. **Determinação de aminoácidos totais em amostras de plantas empregando multicomutação**. 2006. 54 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, SP.
- SHAN, A. Y. K. V.; SOUZA, G. A.; MESQUITA, A. C. Comportamento nutricional e metabólico de plantas jovens de seringueira cultivadas em diferentes fontes de nitrogênio. In: **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, Gramado, 2007.
- YEMM, E. M.; COCKING, E. C. Estimation of amino acids by ninhidrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.