

Análise de lignina em diferentes partes da soja utilizando o método do brometo de acetila

CASULA. D. K.¹; KRZYZANOWSKI F. C.¹

¹Embrapa Soja, Caixa Postal, 231, 86001-970, Londrina, Paraná. e-mail: divalter.casula@colaborador.embrapa.br

Introdução

A lignina é um complexo heteropolímero natural encontrado na parede celular de plantas vascularizadas. Perdendo somente para a celulose, é o segundo maior componente da parede celular. Sua presença fornece à planta rigidez, suporte estrutural e impermeabilidade à água (FRY, 1986; BAY, 1995). Essa é sintetizada pelas plantas a partir da polimerização de álcool p-hidroxicianamil substituindo-o através da catálise de peroxidases. Sua formação pelos álcoois cianamílicos precursores varia de acordo com o tecido vegetal, idade, clima, luz solar e temperatura (VAN SOEST et al, 1991).

Alguns autores enfatizam estudos com essa substância, pois a sua presença na parede celular do tegumento oferece à planta resistência a danos mecânicos. (RIJO, 1983). Como a semente de soja é muito

suscetível ao dano mecânico (FRANÇA, 1984), a qualidade da semente acaba sendo comprometida nos processos de colheita e manuseio (COSTA, 1987).

A variabilidade genética da soja para resistência ao dano mecânico foi demonstrada por Carbonell e Krzyzanowski (1995), que através do teste do pêndulo, classificaram 12 cultivares de soja em três grupos de resistência: resistentes, moderadamente resistentes e suscetíveis. Posteriormente, Alvarez et al. (1997) demonstraram que tal superioridade de qualidade de semente da cultivar Doko era atribuída ao maior conteúdo de lignina no tegumento de suas sementes, que possuíam índices acima de 6%, verificando uma estreita correlação entre o conteúdo desse polímero e a resistência ao dano mecânico, indicando a importância da seleção de linhagens com alto teor de lignina para a geração de cultivares com melhor qualidade de semente.

Os métodos mais comuns para a determinação da Lignina são o de Klason, e os que utilizam Ácido Tioglicólico, e Brometo de Acetila. Destes métodos o mais rápido, simples e que apresenta melhores índices de recuperação de lignina é o método com Brometo de Acetila (MOREIRA-VILAR, 2014), o qual também foi escolhido como padrão de referência para o método espectrofotométrico por FUKUSHIMA, 2000.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as diferenças nos teores de lignina nas folhas, vagens e tegumentos de três cultivares de soja, utilizando para a sua determinação o método espectrofotométrico com Brometo de Acetila.

Material e métodos

Para determinar a quantidade de lignina nas folhas, estas foram inicialmente selecionadas com e sem ferrugem; posteriormente, foram separadas para análise com pedúnculo e nervuras e somente o limbo foliar. Na análise do tegumento as sementes foram imersas em água por aproximadamente 12 horas, em um béquer de 50 mL, para posterior separação dos tegumentos. Para a quantificação de lignina na vagem, foram retiradas e descartadas todas as sementes. Todos os

materiais, folhas, tegumentos e vagens foram secos em estufa, por 16 horas a 80°C.

Os tecidos a serem analisados foram submetidos a um tratamento prévio para excluir as proteínas e outros materiais absorventes de UV. Esta remoção é essencial para evitar a medição destes constituintes em conjunto com a lignina a 280 nm. Amostras secas (0,3 g) foram homogeneizadas em tampão de fosfato de potássio 50 mM (7 ml, pH 7,0) utilizando um almofariz e um pilão e, em seguida, transferida para um tubo de centrifugação. O material homogeneizado foi centrifugado (1400 x g, 5 min) e depois lavado e centrifugado duas vezes com tampão de fosfato (pH 7,0; 7 ml), três vezes com 1% (v / v) de Triton X-100 em tampão a pH 7,0 (7 ml), duas vezes com 1 Molar de NaCl em tampão de pH 7,0 (7 ml), duas vezes com água destilada (7 ml), e duas vezes com acetona (5 ml). O sedimento foi seco sob vácuo e logo após em uma estufa (60 °C, 24 h). A matéria seca foi definida como a fração da parede celular livre de proteínas.

Alíquotas (20 mg) desse material foram colocadas em tubos de centrífuga com tampa de rosca contendo 0,5 ml de brometo de acetila a 25% (v / v em ácido acético glacial) e incubadas a 70 °C durante 30 min. Depois de completa a digestão, a amostra foi colocada rapidamente num banho de gelo, e, em seguida, misturada com 0,9 ml de NaOH 2 M, 0,1 ml de 7,5M de hidroxilamina-HCl, e com um volume de ácido acético glacial suficiente para a solubilização completa do extrato de lignina. Após a centrifugação (1400 x g, 5 min), a absorbância do sobrenadante foi medida a 280 nm.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 repetições composta 4 sub-amostras cada uma, das cultivares BRS 360 RR, Doko e VMAX. As variáveis respostas analisadas foram porcentagem de lignina na parede celular das vagens, tegumento e folhas. A análise de variância (ANOVA) e os testes de comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) foram utilizados (CANTERI, 2001).

Resultados e discussão

Não foram observadas diferenças significativas entre as cultivares avaliadas quanto ao percentual de lignina nas vagens (Tabela 1.)

Na análise de lignina do tegumento das sementes das cultivares BRS 360RR e V-MAX, observou-se diferença significativa entre os genótipos avaliados (Tabela 2).

Quando foram analisadas folhas infectadas com ferrugem, foi detectado um aumento da quantidade de lignina na parede celular das folhas em diferentes épocas. Sabe-se que a planta altera a quantidade de lignina em sua parede celular conforme o estágio de maturação (Tabela 3).

Na análise das folhas das cultivares (folhas completas) BRS 360RR e Doko também ocorreu diferença significativa na concentração de lignina na parede celular (Tabela 4).

Conclusão

Faz-se necessário um estudo mais detalhado para avaliar se ocorre variabilidade genética para teor de lignina nas vagens de distintos cultivares, por ser este o primeiro tecido protetor da semente no campo e nas cultivares avaliadas não foi observada variação.

Na análise da concentração de lignina nos tegumentos das cultivares V-MAX e BRS 360 RR foi detectada uma diferença que já era esperada, dado que a cultivar V-MAX é conhecida por ter sementes com alta resistência aos danos mecânicos.

Na análise das folhas com ferrugem observou-se um aumento no teor de lignina conforme avançou o estágio de desenvolvimento. Uma hipótese que pode ser discutida é que esse aumento pode ser entendido como uma reação de defesa da planta à ação do fungo quanto à penetração via parede celular.

A variação no teor de lignina nas folhas de distintos cultivares é um indicativo de que existe variabilidade genética para teor de lignina nas folhas.

Referências

- ALVAREZ, P.J.C.; KRZYZANOWSKI, F.C.; MANDARINO, J.M.; FRANÇA-NETO, J.B. Relationship between soybean seed coat lignin content and resistance to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, v. 25, n.2, p. 209–214, 1997.
- BAY, A.P.M.; TAYLOR, A.G.; and BOURNE, M.C. The influence of water activity on three genotypes of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in relation to mechanical damage resistance. **Seed Science and Technology**, v. 23, n.3, p. 583–593, 1995.
- CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V.; SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24, 2001.
- CARBONELL, S.A.M.; KRZYZANOWSKI, F.C. The pendulum test for screening soybean genotypes for seed resistant to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, v. 23, n.2, p. 331–339, 1995.
- COSTA, A.B.; KUENEMAN, E.A.; MONTEIRO, P.M.F.D. Varietal differences in soybeans for resistance to physical damage of seed. **Soybean Genetics Newsletter**, v. 14, p. 73–76, 1987.
- FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. **Qualidades fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: Embrapa CNPSO, 1984. 39P. (Embrapa CNPSO. Circular técnica, 9)

FRY, S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 37, p. 165–186, 1986.

FUKUSHIMA, R.S.; DEHORITY, B.A. Feasibility of using lignin isolated from forages by solubilization in acetyl bromide as a standard for lignin analyses. **Journal of Animal Science**, v.78, p.3135-3143, 2000.

MOREIRA-VILAR, F. C.; SIQUEIRA-SOARES, R. de C.; FINGER-TEIXEIRA, A.; OLIVEIRA, D. M. de; FERRO, A. P.; ROCHA, G. J. da; FERRARESE, M. de L. L.; SANTOS, W. D. dos; FERRARESE-FILHO, O. The Acetyl Bromide Method Is Faster, Simpler and Presents Best Recovery of Lignin in Different Herbaceous Tissues than Klason and Thioglycolic Acid Methods. **PLOS ONE**, 2014. disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0110000>>. Acesso em: 2 jun. 2015.

RIJO, L.; VASCONCELOS, I. Formação de calose e de lignina em combinações incompatíveis *Coffea sp. H. vastatrix*. (Calloses and lignin formation in incompatible combinations *Coffea sp. H. vastatrix*). In: **Simpósio sobre ferrugens do cafeeiro**. Oerias, 1983, p. 269–281.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

Tabela 1. Percentual de lignina da parede celular das vagens das cultivares BRS 360RR e Doko.

Cultivares	Lignina %
BRS 360 RR	7,99a
Doko	7,64a
C.V.: 2,46%	

Medias seguidas de letras iguais não diferem entre si segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2. Percentual de lignina da parede celular dos tegumentos das sementes das cultivares BRS 360RR e V-MAX.

Cultivares	Lignina %
BRS 360 RR	3,47a
V-MAX	5,03b
C.V.: 2,30%	

Medias seguidas de letras distintas diferem entre si segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3. Percentual de lignina na parede celular das folhas da cultivar BRS 360RR com ferrugem em diferentes épocas de coleta.

Épocas	Lignina %
Época 1	9,45a
Época 2	11,67b
C.V.: 4,21%	

Época 1 corresponde a data de plantio de 04/02/2015 e Época 2 data de plantio 19/01/2015.

Medias seguidas de letras distintas diferem entre si segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 4. Percentual de lignina na parede celular das folhas das cultivares BRS 360RR e Doko.

Cultivares	% de Lignina
BRS 360 RR	6,58a
Doko	5,95b
C.V.: 3,25%	

Medias seguidas de letras distintas diferem entre si segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).