

Plano de Trabalho

Dados do plano de trabalho:

Título do plano de trabalho: Caracterização dos transportadores de Na^+ e K^+ de raízes em cultivares do gênero *Brachiaria* submetidas à salinidade.

Modalidade da Bolsa Solicitada: PIBIC

Projeto de Pesquisa vinculado: Mecanismos de regulação da homeostase iônica em espécies de capim *Brachiaria* submetidas à salinidade

1. Objetivos:

Geral:

O trabalho do bolsista tem como finalidade a instalação dos experimentos para verificar o papel dos transportadores de Na^+ e K^+ na absorção e acúmulo desses íons em cultivares do gênero *Brachiaria* submetidas à salinidade.

Específicos:

1. Determinar o acúmulo de Na^+ e K^+ em cultivares do gênero *Brachiaria* em presença de inibidores de transportadores específicos quando submetidas à salinidade.
2. Calcular constantes cinéticas para a absorção de Na^+ e K^+ na ausência e presença de inibidores de transportadores específicos quando submetidas à salinidade e sob condições controladas.

2. Metodologia

Material biológico. No presente trabalho serão usadas sementes do gênero *Brachiaria* das espécies *B. decumbens* cv. basilisk, e *B. brizantha* cv. xaraes, marandu e piatã.

Condições de cultivo e coletas. As sementes das espécies e variedades acima indicadas serão germinadas em vermiculita umedecida com água destilada durante dez dias. Nesta etapa, uma solução de CaCl_2 a 0,5 mM será usada ao primeiro e quinto dia de cultivo para irrigar e melhorar a taxa de germinação. As plântulas serão transferidas para solução nutritiva de Hoagland de 1/3 de força iônica e com uma concentração de K^+ a 0,75 mM. Estes cultivos serão feitos em bacias de 10 litros, onde serão colocadas 15 plantas e mantidas por um período de 10 dias. Após esse tempo, as plantas serão transferidas para baldes (duas plantas/balde) contendo 2,3 litros de solução nutritiva e submetidas aos tratamentos controle (sem salinidade) e de estresse salino com NaCl a 75 mM. Após 7 dias de cultivo, as plantas serão coletadas para análise de crescimento, quantificação dos íons Na^+ e K^+ , análise do fluxo da seiva e absorção de K^+ .

As soluções serão substituídas regularmente por soluções novas para evitar deficiência nutricional. A concentração de K^+ na solução nutritiva será também monitorada diariamente

para mantê-la próxima aos valores estabelecidos. O pH das soluções nutritivas será mantido entre 5,5 - 6,0 e corrigido, quando necessário, com NaOH ou HCl. As plantas serão cultivadas em casa de vegetação com luminosidade, temperatura e umidade relativa do ar naturais.

Medidas de absorção de K^+ . A absorção radicular de K^+ por plantas do gênero *Brachiaria* sob condições de estresse salino será estimada em ensaios de depleção como descrito por Alvarez-Pizarro *et al.* (2011). As plantas serão transferidas individualmente para copos contendo 200 ml da solução de depleção com uma concentração de K^+ a 0,75 mM e com o mesmo nível de salinidade ao que estavam expostas. O restante dos macronutrientes e micronutrientes terá composição semelhante às soluções usadas para o crescimento das plantas. O pH da solução de depleção será ajustado para valores entre 5,8 - 6,0. Após a transferência das plantas, amostragens de 1,5 ml da solução de depleção serão feitas em intervalos de dez minutos durante as primeiras duas horas, e a cada 30 minutos, até completar seis horas de ensaio. Para evitar a redução do volume da solução de depleção, 1,5 ml de água deionizada será colocado após cada amostragem. Ao final do experimento, as raízes serão cortadas, lavadas em água deionizada por 10 minutos e pesadas para a determinação da massa fresca (MF). A concentração de K^+ nas alíquotas coletadas será determinada com o emprego de um fotômetro de chama e serão expressas em unidades de concentração ($\mu\text{mol. l}^{-1}$). Os dados serão plotados em uma curva de depleção relacionando a concentração de K^+ na solução de depleção vs tempo. Os dados de depleção coletados durante a primeira hora serão utilizados para calcular a velocidade inicial de depleção de K^+ , a qual será expressa como $\mu\text{mol } K^+ \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MF}$.

Para estudar o papel dos transportadores do sistema radicular envolvidos na absorção de K^+ e sua regulação sob condições de estresse salino, os ensaios de depleção serão realizados em presença de tetraetilamônio (TEA) a 10 mM ou cloreto de bário (BaCl_2) a 1 mM (bloqueadores de canais de K^+); cloreto de gadolínio (GdCl_3) a 1,0 mM (bloqueador de canais catiônicos não específicos); e íon amônia (NH_4Cl) a 1mM (inibidor de carreadores de K^+).

Os ensaios na presença de inibidores serão feitos também com as plantas cultivadas em casa de vegetação.

Determinação de íons. A quantificação dos íons K^+ e Na^+ nos tecidos coletados será realizada em extratos aquosos preparados com 100 mg de material fresco. O homogenato será agitado durante uma hora em mesa de agitação rotatória e em seguida, centrifugado a 3.000 g, durante 10 minutos. O sobrenadante obtido será analisado em um fotômetro de chama e os teores dos íons serão expressos como $\mu\text{mol. g}^{-1} \text{ MF}$.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento do experimento será inteiramente casualizado com um arranjo fatorial 4x2, correspondendo a quatro materiais do gênero *Brachiaria* e dois níveis de salinidade (controle e 75 mM). O experimento para verificar a contribuição dos transportadores de membrana no acúmulo de K^+ e Na^+ sob condições de salinidade será conduzido com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por duas plantas. O experimento para verificar o efeito da salinidade nas constantes cinéticas da absorção de K^+ e Na^+ e o papel dos

Os resultados serão apresentados como a média \pm erro padrão. Os dados serão sujeitos à análise de variância (ANOVA) e serão comparados usando-se o teste de Tukey a 5% de significância.

AT1. Montagem de experimentos para avaliar o efeito de inibidores na absorção de Na^+ e K^+ em cultivares de *Brachiaria* sob condições de salinidade.

AT3. Montagem de experimentos (preliminares e definitivos) para estudar a contribuição dos transportadores de Na^+ e K^+ em cultivares de *Brachiaria* sob condições de estresse salino. Cálculo das constantes cinéticas.

AT5. Elaboração de relatório final.

[illegible]