

## Padrões eletroforeticos da família multigênica da glutamina sintetase em genótipos de milho contrastantes em eficiência de uso de nitrogênio

Antonio A. C. Purcino <sup>(1\*)</sup>, Thales R. Lima <sup>(2)</sup>, Ane C. Pinto <sup>(1)</sup>, Isabel R. P. de Souza <sup>(1)</sup>, Ivanildo E. Marriel <sup>(1)</sup>, Sidney N. Parentoni <sup>(1)</sup>, Frederico O.M. Durães <sup>(1)</sup> e Luís J.C.B. Carvalho <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, CEP 35.701-970, Sete Lagoas, MG, <sup>(\*)</sup>corsetti@cnpms.embrapa.br, <sup>(2)</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 02372, CEP 70.770-900, Brasília, DF.

### Introdução

Em plantas, a glutamina sintetase é codificada por uma família multigênica cuja expressão é regulada por múltiplos promotores e por estímulos ambientais de maneira específica a órgãos e tecidos (Mifflin e Habash, 2002). Em milho, as isoproteínas da glutamina sintetase (GS, EC 6.3.1.2) podem ser separadas em colunas de DEAE-celulose em dois picos correspondentes as isoformas citossólica (GS1) e cloroplástica (GS2). A isoforma GS2 é codificada por um único gene, mas a isoforma GS1 é codificada por 5 genes (GS<sub>1-1</sub>, GS<sub>1-2</sub>, GS<sub>1-3</sub>, GS<sub>1-4</sub> e GS<sub>1-5</sub>), sendo que o GS<sub>1-5</sub> é bastante difícil de ser identificado por hibridação de RNA (Sukanya et al., 1994). Ao nível de transcrito, esses genes mostram resposta diferencial ao amônio e ao nitrato. No mesófilo foliar e nas células das raízes, a GS2 é responsiva ao nitrato mas não a amônia e, portanto, nas raízes a GS2 pode ser detectada somente em plantas tratadas com nitrato (Sakakibara et al., 1992). Em raízes de plântulas de milho cultivadas em nitrato por 6 dias, o GS<sub>1-1</sub>, GS<sub>1-3</sub> e o GS<sub>1-4</sub> são mais expressos que o GS<sub>1-2</sub>, enquanto na parte aérea, o GS<sub>1-3</sub> e GS<sub>1-4</sub> são mais expressos que o GS<sub>1-1</sub> e o GS<sub>1-2</sub> (Sukanya et al., 1994). O objetivo desse trabalho foi avaliar o padrão de expressão das isoenzimas da GS em linhagens e híbridos simples de milho selecionados para alta e baixa eficiência de uso de nitrogênio (EUN). Mais especificamente, avaliou-se nesse trabalho a hipótese de que plantas com alta e baixa EUN mostram padrões diferenciais de expressão das isoenzimas da GS em resposta à nutrição com nitrato. Utilizou-se nesse estudo linhagens e híbridos simples, porque em culturas de polinização cruzada como o milho, a avaliação de linhagens “per se” permite a identificação de mecanismos de EUN controlados por genes de efeito aditivo, enquanto híbridos simples permitem a identificação de mecanismos controlados por efeitos aditivos e não aditivos (Hallauer e Miranda Filho, 1998).

### Materiais e Métodos

Cultivos das plantas em casa de vegetação: 5 plantas de genótipos com alta e baixa EUN listados na Tabela 1 foram cultivadas em vasos com 1 kg de vermiculita e fertilizados em dias alternados com 200 mL de uma solução de Hoagland preparada para fornecer um nível baixo (0,8 ou 1,6 mM) ou alto (16 mM) de nitrato. Cada combinação nitrogênio x genótipo foi repetida 3 vezes e quando as plantas atingiram 4 folhas, as raízes e folhas foram colhidas e mantidas a -80° C até a realização das análises.

Separação da isoenzimas da GS por PAGE nativa e coloração para atividade transferase: para visualização do polimorfismo das isoenzimas da GS, 15 µg de proteína solúvel total foram separadas por eletroforese PAGE nativa, em géis de 8%, a 200V, por 90 min e 4°C. A visualização das bandas foi obtida pelo desenvolvimento de cor para a atividade transferase como descrito por Brune et al. (1998). Em um experimento adicional, o polimorfismo da GS de

milho e tabaco foi comparado em um mesmo gel para identificação da banda de GS2, já que plantas jovens de tabaco não possuem a banda GS1.

Separação das isoenzimas da GS por PAGE seguida de Western blot: após a eletroforese em PAGE nativa como descrito acima, as isoenzimas da GS foram transferidas para filtros de PVDF, sondadas com anticorpos contra GS1 e GS2 conforme descrito por Purcino et al. (1998) e fotografadas.

Eletroeluição das bandas de PAGE, separação por SDS-PAGE seguida de Western blot: as isoenzimas da GS de folhas do HS 723 x 64 cultivado sob alto e baixo nitrato foram separadas por eletroforese PAGE preparativa como descrito acima. Depois da eletroforese, cada gel foi cortado em segmentos de 1 cm de largura e 1 segmento de cada gel foi colorido para atividade transferase para ser utilizado como marcador da localização das bandas nos géis que não foram coloridos. A porção de cada gel correspondente a essas bandas foi individualmente cortada, o conteúdo das proteínas foi eletroeluído, passou por uma nova separação por SDS-PAGE e a seguir sondado com os anticorpos contra GS1 e GS2.

## **Resultados e Discussão**

O polimorfismo para as bandas de GS separadas por PAGE nativa e visualizadas para atividade transferase nos genótipos de milho cultivados sob dois níveis de nitrato, aparece na Figura 1 para a análise de folhas e na Figura 2 para a análise das raízes. Os resultados obtidos mostraram que em géis nativos a GS de folhas pode ser separada em uma banda “superior” mais bem definida e uma “inferior” mais difusa. De maneira geral, a expressão dessas bandas não mostrou um padrão claro para o efeito do nitrato, capaz de diferenciar genótipos com baixa e alta EUN. Em raízes a banda “superior” foi mais expressa que a banda “inferior” e, aparentemente, favorecida pela nutrição com nitrato. Para identificar qual dessas bandas correspondiam à isoformas GS1 e GS2, a posição da banda GS2 do milho foi comparada com a posição da banda GS2 de tabaco, uma planta cujas folhas jovens não apresenta a isoforma GS1 (Figura 3). Os resultados da Figura 3 sugerem, portanto, que a banda “superior” observada nas folhas do milho tinham uma densidade de carga correspondente a isoforma unigênica GS2, e que a banda “inferior” corresponderia a isoforma multigênica GS1. Entretanto, a Figura 2 mostra que a banda “superior” das raízes foi mais expressa que a banda “inferior” e, como em raízes de milho a isoforma citossólica é mais expressa que a isoforma plástidica GS (Sakakibara et al., 1992), esses resultados não indicam de maneira inequívoca que a banda “superior” seja a isoforma GS2 e que a banda “inferior” seja a isoforma GS1. Visando responder essa dúvida, os produtos da família multigênica da GS foram separados em géis de PAGE, transferidos para membranas de PVDF e sondados com os anticorpos contra GS1 e GS2 (Figura 4). Nas folhas, os resultados obtidos indicaram que o produto do gene GS2 estava presente tanto na banda “superior” quanto na banda “inferior”, mas nas raízes o sinal estava mais visível na banda “superior” que na banda “inferior”. A eletroeluição das bandas “superior” e “inferior”, seguida de análise por SDS-PAGE e sondagem com os anticorpos contra GS1 e GS2 (Figura 5) confirmaram que essas duas bandas contêm epitopos reconhecidos por esses dois anticorpos. Em conjunto, esses resultados sugerem que tanto a banda “superior” quanto a banda “inferior” observadas nos géis de PAGE nativo são uma mistura de produtos dos genes da GS, e elas não podem ser consideradas como indicativos da expressão das isoformas cloroplástica GS2 e citossólica GS1. É possível que a presença desses dois peptídeos nas duas bandas da eletroforese PAGE seja resultado da fosforilação parcial e da interação da GS com a proteína 14-3-3 (Lima et al., 2005), o que pode modificar o padrão de migração da

holoenzima GS. Observou-se que a expressão das bandas de GS em PAGE foi influenciada pela nutrição com nitrato, sem haver entretanto, uma correlação com a classificação da EUN dos genótipos testados.

### **Literatura citada**

Brune, W., A.C. Alfenas, T.G. Jughans. Identificações específicas de enzimas em géis. p. 201-328 *In* A.C. Alfenas (ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Editora UFV, Viçosa; 1998

Hallauer, A.R., Miranda Filho, J.B. Quantitative Genetics in maize breeding. Iowa University Press-Ames, 1988. 468 pp.

Lima, L., A. Seabra, P. Melo, J. Cullimore, H. Carvalho. Phosphorylation and subsequent interaction with 14-3-3 proteins regulate plastid glutamine synthetase in *Medicago truncata* *Planta* 2005; 223(3):558-567

Miflin B.J., D. Habash. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J. Exp. Bot.* 2002; 53(370): 979-987

Purcino, A.A.C., C. Arellano, G.S. Athwal, S.C. Huber. Nitrate effect on carbon and nitrogen assimilating enzymes of maize hybrids representing seven eras of breeding. *Maydica* 1998; 43: 83-94

Sakakibara, H., S. Kawabata, H. Takahashi, T. Hase, T. Sugiyama. Molecular cloning of the family of glutamine synthetase genes: expression of genes for glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthetase in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Plant Cell Physiol.* 1992; 33(1): 49-58

Sukanya R., M.G. Li, D.P. Snustad. Root- and shoot-specific responses of individual glutamine synthetase genes of maize to nitrate and ammonium. *Plant Mol Biol* 1994; 26(6): 1935-1946.

Tabela 1 – Genótipos de milho contrastantes para eficiência de uso de nitrogênio usados nesse estudo

| Genótipo    | Natureza Genética | EUN   |
|-------------|-------------------|-------|
| CMS 28-7.1  | Linhagem          | Alta  |
| CMS 28-8.1  | Linhagem          | Alta  |
| HS 724 x 22 | Híbrido simples   | Alta  |
| HS 724 x 64 | Híbrido simples   | Alta  |
| HS 723 x 64 | Híbrido simples   | Alta  |
| CMS 28-17.2 | Linhagem          | Baixa |
| CMS 28-10.2 | Linhagem          | Baixa |
| CMS 28-11.1 | Linhagem          | Baixa |
| HS 20 x 64  | Híbrido simples   | Baixa |
| HS 723 x 11 | Híbrido simples   | Baixa |

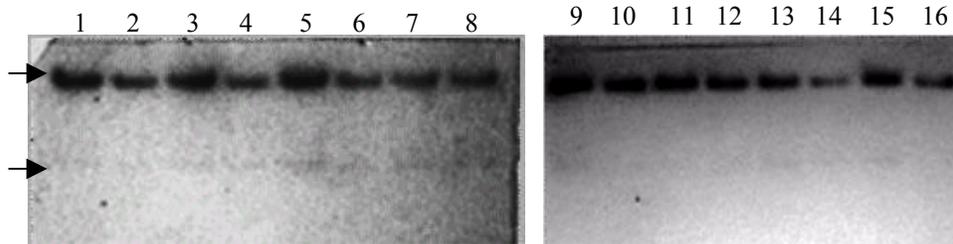
Figura 1 – Polimorfismo dos produtos da família multigênica GS, depois da separação das bandas por PAGE nativa e desenvolvimento de cor para a atividade transferase, de folhas de genótipos de milho, contrastantes para EUN e cultivados sob dois níveis de nitrato. Abaixo das bandas aparecem os picos densitometricos das bandas

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

1 - CMS 28-7.1 - 0.8 mM nitrate  
 2 - CMS 28-7.1 - 16 mM nitrate  
 3 - CMS 28-8.1 - 0.8 mM nitrate  
 4 - CMS 28-8.1 - 16 mM nitrate  
 5 - CMS 28-17-2 - 0.8 mM nitrate  
 6 - CMS 28-17-2 - 16 mM nitrate  
 7 - CMS 28-10.2 - 0.8 mM nitrate  
 8 - CMS 28-10.2 - 16 mM nitrate

9 - HS 724 x 22 - 0.8 mM nitrate  
 10 - HS 724 x 22 - 16 mM nitrate  
 11 - HS 723 x 64 - 0.8 mM nitrate  
 12 - HS 723 x 64 - 16 mM nitrate  
 13 - HS 20 x 64 - 0.8 mM nitrate  
 14 - HS 20 x 64 - 16 mM nitrate  
 15 - HS 723 x 11 - 0.8 mM nitrate  
 16 - HS 723 x 11 - 16 mM nitrate

Figura 2 – Polimorfismo dos produtos da família multigênica GS, depois da separação das bandas por PAGE nativa e desenvolvimento de cor para a atividade transferase, de raízes de genótipos de milho, contrastantes para EUN e cultivados sob dois níveis de nitrato.



Genótipos com baixa EUN

|          |              |   |                                     |
|----------|--------------|---|-------------------------------------|
| <b>1</b> | – CMS 28-7.1 | - | 16 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>  |
| <b>2</b> | – CMS 28-7.1 | - | 0.8 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |
| <b>3</b> | – CMS 28-8.1 | - | 16 mM NO <sub>3</sub>               |
| <b>4</b> | – CMS 28-8.1 | - | 0.8 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |
| <b>5</b> | – HS 724x22  | - | 16 mM NO <sub>3</sub>               |
| <b>6</b> | – HS 724x22  | - | 0.8 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |
| <b>7</b> | – HS 724x64  | - | 16 mM NO <sub>3</sub>               |
| <b>8</b> | – HS 724x64  | - | 0.8 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |

Genótipos com alta EUN

|           |               |   |                                     |
|-----------|---------------|---|-------------------------------------|
| <b>9</b>  | – CMS 28-10.2 | - | 16 mM NO <sub>3</sub>               |
| <b>10</b> | – CMS 28-10.2 | - | 0.8 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |
| <b>11</b> | – CMS 28-17-2 | - | 16 mM NO <sub>3</sub>               |
| <b>12</b> | – CMS 28-17-2 | - | 0.8 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |
| <b>13</b> | – HS 20x64    | - | 16 mM NO <sub>3</sub>               |
| <b>14</b> | – HS 20x64    | - | 0.8 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |
| <b>15</b> | – HS 723x11   | - | 16 mM NO <sub>3</sub>               |
| <b>16</b> | – HS 723x11   | - | 0.8 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |

Figura 3 – Isoformas da GS de folhas jovens de milho e tabaco obtidas por PAGE nativa e desenvolvimento de cor pela atividade transferase

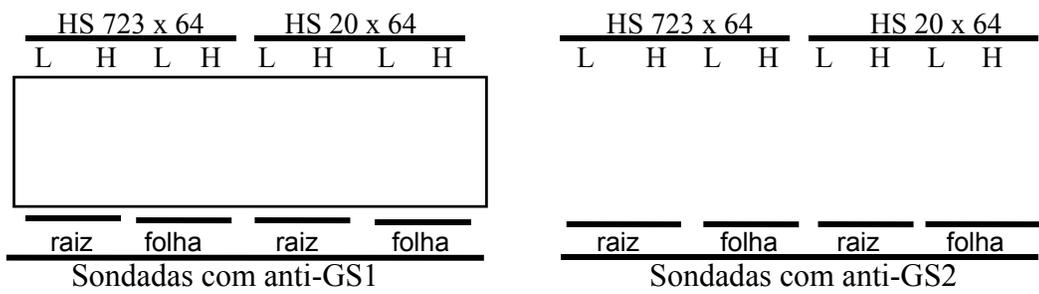
milho tabaco      milho tabaco      milho tabaco

Mistura completa  
para atividade  
transferase

Menos ADP

Menos Mg<sup>2+</sup>

Figura 4 – Separação das isoenzimas da GS de folhas de milho por PAGE nativa, eletrotransferência para membranas de PVDF e sondagem com anti-GS1 e anti-GS2



L – Plantas cultivadas com 0.8 mM nitrato  
 H – Plantas cultivadas com 16 mM nitrato

Figure 5 - (A) – Separação das isoformas foliares da GS por PAGE nativa e desenvolvimento de cor para atividade transferase B) – As bandas “superiores” e “inferiores” foram eletroeluidas, separadas por SDS-PAGE e sondadas com anticorpos contra GS1 e GS2. Amostras foliares do HS 723x64 foram colhidas quando as plantas tinham 4 folhas completamente desenvolvidas

A            B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7

A

A - isoformas da GS separadas por PAGE nativa

B1 - banda superior, plantas com baixo N, sondadas com anti-GS2.

B2 – ibid, sondada com anti-GS1

B3 – banda inferior, plantas com baixo N, sondadas com anti-GS2.

B4 - ibid, sondada com anti-GS1

B5 – banda superior, plantas com alto N, sondadas com anti-GS2.

B6 – ibid, sondadas com anti-GS1

B7 – banda inferior, plantas com alto N, sondadas com anti-GS2.

B8 – ibid, sondadas com anti-GS1.

---