

# **EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A CINÉTICA DE ABSORÇÃO DE NO<sub>3</sub>-/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> E NAS ENZIMAS DE ASSIMILAÇÃO DE C E N EM GENÓTIPOS DE MILHO CONTRASTANTES EM TOLERÂNCIA AO AL<sup>3+</sup>- TOXICO**

ANTÔNIO A.C. PURCINO, VERA M.C. ALVES, SIDNEY N. PARENTONI, CHRISTIANE L. BELELE e LEANDRO L. LOGUERCIO

Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, 35.701-970, Sete Lagoas, MG, corsetti@cnpms.embrapa.br

Palavras chaves: toxidez de Al, metabolismo de N, GS, GOGAT, GDH, PEPC

## **REVISÃO BIBLIOGRAFICA**

Trabalhos conduzidos para determinar o efeito do Al no metabolismo do nitrogênio têm produzidos resultados inconsistentes. Enquanto alguns autores têm reportado que o Al inibe a absorção e redução de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Cambraia et al., 1989), outros têm demonstrado que o Al, pelo menos em algumas situações, pode estimular o crescimento radicular e a absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Em sorgo, o Al rapidamente reduz a absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> aumentando a de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, com isso mantendo a absorção total de N praticamente inalterada (Ketjens, 1988). Várias espécies vegetais adaptadas a solos ácidos e tolerantes ao Al são igualmente tolerantes a altos níveis de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Foy et al. 1978). Portanto, este aumento na absorção de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> induzido pelo Al pode afetar a atividade das enzimas de assimilação deste ion, influenciando o crescimento das plantas. Como o Al altera a composição aminoacídica do xilema (Gomes et al., 1985), estas observações sugerem que o Al pode ter um efeito direto nas enzimas de incorporação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em aminoácidos. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do Al na absorção de N e na atividade das enzimas chaves na assimilação de N (glutamina sintetase, GS; glutamato sintase, GOGAT; glutamato desidrogenase, GDH) e C (fosfoenolpiruvato carboxilase, PEPC) em genótipos de milho diferencialmente tolerantes à toxidez deste metal.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

As sementes dos genótipos de milho utilizados nos ensaios conduzidos neste projeto foram obtidas do Programa de Melhoramento de Milho para Solos Ácidos da Embrapa Milho e Sorgo. A caracterização destes genótipos com relação a tolerância a este metal foi realizada de acordo com o metodologia do Crescimento Relativo da Raiz Seminal (Magnavaca et al. 1987).

Cinética de absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - sementes de 4 genótipos sensíveis (HS 9148, HS 11x36, HS 36x723 e HS 50x20) e 3 tolerantes (HS 13x1143, HD 91102 e HD 9176) foram germinadas em papel toalha. Depois da germinação as plântulas foram transferidas para caixas contendo 13 L da solução de Steinberg (Foy et al., 1967), pH 5,5, e cultivadas por mais 5 dias, sendo a solução nutritiva aerada constantemente e renovada a cada 2 dias. No sexto dia, metade da plantas foram cultivadas em solução nutritiva modificada para conter 166 µmoles L<sup>-1</sup> de AlCl<sub>3</sub> e pH 4,5 e, a outra metade, mantida como controle na solução original. A determinação dos valores de V<sub>max</sub> para absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi feita em grupos de 2 plantas colocadas em vasos contendo 1,6 L da solução estabilizadora (solução de Steinberg diluída 4 vezes com pH 4,5) com e sem Al e cultivadas em uma câmara de

crescimento por mais 2 dias. Noventa minutos antes do início dos trabalhos de cinética, a solução estabilizadora foi renovada e a fonte de N modificada para 200  $\mu\text{moles L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Alíquotas de 10 mL foram retiradas de cada vaso a cada 30 min durante 8 h e congeladas até a análise de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ . Os valores de  $V_{\text{max}}$  foram determinados como proposto por Claassen e Barber (1974) utilizando o modelo gráfico-matemático de Ruiz (1985). Depois das medidas de cinéticas as plantas foram lavadas em água deionizada, secas em papel toalha e separadas em parte aérea e raiz para determinação da matéria seca e dos teores de N, P, K, Ca, Mg e S.

Determinação do efeito do Al na atividade da GS, GOGAT, GDH e PEPC – sementes dos genótipos sensíveis ( HD 9148, HS 11x723 e HS 36x723) e dos tolerantes ( HS 13x1143, HS 91102 e HD 9176) foram germinados em papel toalha e cultivados por 5 dias na solução de Steinberg, pH 5,5, aerada e renovada a cada 2 dias. O estresse de Al foi imposto incorporando 220  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  e abaixando o pH da solução nutritiva para 4,5. Vinte e quatro, 72, 144 e 216 horas depois de início do estresse amostras de folhas e raízes foram colhidas para determinação das atividades da GS, GOGAT, GDH e PEPC. A extração das enzimas e as análises enzimáticas foram realizadas conforme descrito anteriormente (Purcino et al., 1996, 1998).

Determinação do efeito do Al nas isoformas da GS nas raízes de genótipos sensíveis ao Al – as isoformas GS1 e GSr das raízes de genótipos sensíveis (HD 9148, HS 11x723 e HS 36x723) tratados com Al por 216 h, foram separadas por SDS-PAGE, eletrotransferidas para membranas de PVDF e visualizadas por Western blot utilizando anticorpos específicos produzidos em coelhos. A quantificação de cada isoforma foi feita por densitometria (Purcino et. 1998)

Determinação do efeito do Al nas isoformas citossólica e cloroplástica da GS em raízes e folhas de genótipos sensíveis e tolerantes ao Al – sementes dos genótipos sensíveis (HS 22x36, HD 9148 e L 19) e tolerantes ( CMS 36, HS 13x1143 e HD 9176) foram germinadas e cultivadas sob estresse de Al por 144 horas como descrito anteriormente. Os polipeptídeos GS1, GS2 e GSr foram sondados nos ápices de raízes, no tecido radicular imediatamente acima do ápice das raízes e nas folhas destes genótipos como descrito anteriormente. A proteína solúvel total foi determinada pelo método de Bradford (1976).

## **RESULTADOS**

Nos ensaios de cinética observou-se que o Al inibiu tanto a absorção de  $\text{NO}_3^-$  quanto de  $\text{NH}_4^+$ , sendo a redução mais acentuada na absorção de  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 1). Plantas cultivadas em solução nutritiva contendo 166  $\mu\text{moles L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$ , pH 4,5, depois de 6 dias de tratamento apresentavam redução no peso da parte aérea e no conteúdo de N, P, Ca, Mg e S nas folhas. Nas raízes observou-se acúmulo de P e K e decréscimo no conteúdo de N, Ca e Mg. Nas enzimas de assimilação de  $\text{NH}_4^+$  observou-se que o tratamento com Al não afetou a atividade foliar da GS mas diminuiu sua atividade nas raízes. As atividades da ferredoxina-GOGAT nas folhas e da NADH-GOGAT nas raízes não foram afetadas pelo tratamento com Al. A atividade foliar da GDH foi drasticamente reduzida pelo Al em todos genótipos testados enquanto nas raízes essa redução foi verificada somente nos genótipos HS 11x723, HD 9148, HS 36x723, HD 91102 e HD 9176 (Tabela 2). Similarmente, o tratamento com Al reduziu a atividade foliar da PEPC em todos genótipos estudados e a atividade radicular dos genótipos HS 36x723 e HS 13x1143 (Tabela 3). Observou-se também, que o tratamento com Al

favoreceu o aumento no teor de GS1 e reprimiu o de GSr nas raízes dos genótipos sensíveis, mas não nos genótipos tolerantes, a este metal (Tabela 4). Coletivamente, estes dados indicam que o Al afetou o metabolismo do N nos genótipos de milho independentemente de suas classificações quanto à tolerância a este metal.

Tabela 1, Absorção ( $V_{max}$ ) de  $NO_3^-$  and  $NH_4^+$  em genótipos de milho diferencialmente tolerantes ao Al e cultivados em presença e ausência de Al.

Genótipo	$V_{max}$		Redução (%)	$V_{max}$		Redução (%)	$V_{max} NH_4^+ / V_{max} NO_3^-$		Increase (%)
	-Al	+Al		-Al	+Al		-Al	+Al	
	$NO_3^-$			$NH_4^+$					
	-- $\mu moles.g^{-1}.h^{-1}$ --			-- $\mu moles.g^{-1}.h^{-1}$ --					
HS 9148 (S)	29,76 bc	9,90 b	66,7	104,52 a	59,29 a	43,3	3,52 a	5,99 ab	70,2
HS 11x36 (S)	30,86 b	8,68 b	71,9	98,44 a	68,33 a	30,6	3,19 a	7,87 a	146,7
HS 36x723 (S)	22,48 cd	10,96 b	51,2	82,94 a	59,64 a	28,1	3,68 a	5,72 b	55,4
HS 50x20 (S)	48,22 a	16,22 ab	66,4	100,66 a	75,33 a	25,2	2,09 a	4,75 bc	127,3
HS 13x1143 (T)	20,21 d	10,42 b	48,4	81,83 a	46,97 a	42,6	4,18 a	4,62 bc	10,5
HD 91102 (T)	45,13 a	19,58 a	56,6	110,91 a	48,70 a	56,01	2,46 a	2,50 c	1,6
HD 9176 (T)	25,09 bcd	14,84 ab	40,8	78,36 a	59,72 a	23,8	3,16 a	4,03 bc	27,5
Média	30,98 A	13,16 B	57,5	92,29 A	58,23 B	36,9	3,20 B	5,07 A	56,6
CV (%)	12,95			16,81			32,15		

Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a  $P > 0.05$ . Letras maiúsculas para comparações nas colunas, letras minúsculas para comparações dentro das linhas.

Tabela 2. Efeito do tratamento com Al na atividade foliar e radicular da glutamato desidrogenase em genótipos de milho diferencialmente tolerantes à toxidez de Al

Genótipo	Duração do tratamento com Al								Média
	24 h		72 h		144 h		216 h		
	-Al	+Al	-Al	+Al	-Al	+Al	-Al	+Al	
	Atividade da GDH na folha - $\mu mol GLU g^{-1} PF min^{-1}$								
HS 11x723	968	906	1029	877	972	498	1318	1190	970 ns
HD 9148	977	944	882	726	1152	441	802	901	853 ns
HS 36x723	1039	636	892	792	1228	612	697	740	705 ns
HS 13x1143	944	792	863	863	958	835	863	877	875 ns
HD 91102	958	778	797	730	792	228	968	740	745 ns
HD 9176	1096	982	977	968	555	427	1091	991	886 ns
	Atividade da GDH na raiz - $nmol GLU g^{-1} PF min^{-1}$								
HS 11x723	2106	2533	2258	2713	2058	1859	1262	1736	2065 A
HD 9148	1192	2191	2153	2227	1632	2011	1271	1613	1892 AB
HS 36x723	1897	2234	1726	2201	1375	2428	939	1489	1736 AB
HS 13x1143	2067	1911	2153	2125	1745	1717	1821	1119	1831 AB
HD 91102	1769	1888	1992	2068	1262	1859	939	1518	1662 B
HD 9176	1883	2159	1641	1622	1318	2106	1034	1527	1661 B

Efeito principal do tratamento com Al nas folhas - Al : 951 A  
+Al : 770 B

Interação genótipo x Al na atividade da GDH nas raízes

	HS 11x723	HD 9148	HS36x723	HS13x1143	HD91102	HD 9176
- Al	1921 B	1762 B	1484 B	1947 A	1490 B	1469 B
+ Al	2210 A	2023 A	2088 A	1761 A	1823 A	1853 A

Médias dentro da mesma coluna seguidas pela mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey para  $P > 0,005$ . ns não significante

Tabela 3. Efeito do tratamento com Al na atividade foliar e radicular da fosfoenolpiruvato carboxilase em genótipos de milho diferencialmente tolerantes à toxidez de Al

Genótipo	Duração do tratamento com Al								Média
	24 h		72 h		144 h		216 h		
	-Al	+Al	-Al	+Al	-Al	+Al	-Al	+Al	
	Atividade da PEPC na folha - $\mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ Fw min}^{-1}$								
HS 11x723	35.7	23.5	16.1	31.4	24.3	12.5	25.8	14.9	23.0 ns
HD 9148	29.6	27.5	15.7	22.8	28.8	11.0	5.3	6.6	18.4 ns
HS 36x723	43.3	16.9	48.8	18.4	30.7	15.2	17.2	6.5	24.6 ns
HS 13x1143	26.9	43.5	44.1	16.7	23.9	20.8	22.7	14.4	26.6 ns
HD 91102	18.2	27.1	20.3	26.8	19.8	5.6	7.8	5.5	16.3 ns
HD 9176	41.7	31.1	37.1	4.7	13.6	10.7	14.3	10.2	20.4 ns
	Atividade da PEPC na raiz - $\mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ Fw min}^{-1}$								
HS 11x723	0.648	0.579	0.746	1.078	0.746	1.214	0.822	1.261	0.887 A
HD 9148	0.539	0.579	0.533	0.618	0.528	0.886	0.473	1.099	0.657 C
HS 36x723	0.494	0.558	0.584	0.916	0.707	0.976	0.852	1.155	0.776 B
HS 13x1143	0.528	0.537	0.511	0.951	0.550	0.865	0.682	0.869	0.686 BC
HD 91102	0.626	0.652	0.571	0.771	0.707	0.899	0.694	0.993	0.752 BC
HD 9176									

Efeito principal do tratamento com Al nas folhas: -Al : 0.626 B  
+Al : 0.876 A

Interação em genótipo e Al na atividade foliar da PEPC

	HS 11x723	HD 9148	HS36x723	HS13x1143	HD91102	HD 9176
- Al	25.4 A	18.2 A	33.0 A	28.7 A	17.3 A	29.5 A
+ Al	22.7 A	18.5 A	15.4 B	24.4 B	18.8 A	16.7 A

Médias dentro da mesma coluna seguidas pela mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey para  $P > 0,005$ . ns não significante

Tabela 4. Quantificação da GS1 e da GSr em raízes de genótipos sensíveis ao Al, depois de 216 horas de tratamento

Isoforma da GS	HS 36x723		HS 11x723		HD 9148	
	- Al	+Al	-Al	+Al	-Al	+Al
	Unidades /15 mg proteína solúvel					
GS1	79.6	89.2	78.6	148.3	47.0	106.6
GSr	31.7	11.0	22.0	19.2	46.2	6.0