

ANÁLISE DA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASE EM GENÓTIPOS DE MILHO CONTRASTANTES EM RESPONSABILIDADE AO NITROGÊNIO

ANTÔNIO A.C. PURCINO, THALES L. ROCHA, JOSÉ E.F. FIGUEIREDO, LEANDRO L. LOGUÉRCIO, NEWTON C. PORTILLO, IVANILDO E., MARRIEL, SIDNEY N. PARENTONI.

O metabolismo do nitrogênio está relacionado com o metabolismo do carbono (Huppe e Turpin, 1994) e para melhorar a eficiência de uso de nitrogênio é necessário conhecer como as enzimas do metabolismo do carbono e nitrogênio são reguladas e como elas influenciam a produtividade das lavouras. O nitrogênio é fator regulatório essencial para a ação da luz sobre o acúmulo dos mRNAs de várias enzimas, entre elas a fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) (Sakakibara, et al. 1992). A PEPC é uma das enzimas chave na fixação de CO₂ em plantas tipo C₄. Nas células do mesófilo das plantas tipo C₄, a PEPC catalisa a incorporação do CO₂ em oxaloacetato, o qual depois de reduzido a malato é descarboxilado nas células da bainha, sítio da atividade da rubisco. Esta enzima realiza a incorporação final do CO₂ na forma de triose fosfato. Este mecanismo de concentração de CO₂ no sítio de atividade da rubisco aparentemente inibe sua atividade oxigenase, impedindo a perda de CO₂ e amônio pela fotorespiração. A reposição dos níveis de fosfoenolpiruvato (PEP), o qual é o outro substrato fisiológico da PEPC, é feito pela piruvato ortofosfato dicinase (PPDK). A inibição da fotorespiração em plantas tipo C₄ confere a elas maior capacidade fotossintética e eficiência do uso de N quando comparadas com plantas que fotorespiram (Furbank e Taylor, 1965). Em milho e sorgo foram caracterizadas pequenas famílias multigênicas de PEPC. Em plantas os genes da PEPC contém nove introns de tamanhos variáveis (Crétin, et al. 1991). Em milho foram descritos pelo menos cinco genes para PEPC. Um desses genes é expresso somente em raiz enquanto que outros dois, C₃ e C₄, são expressos em folhas. A atividade *in vivo* da PEPC está sujeita a controles alostéricos por metabólitos que apresentam efeito positivo (glicose-6-fosfato) ou negativo (malato). O efeito desses efetores é mais pronunciado quando a atividade é medida em pH fisiológico mas pequeno quando a atividade V_{max} é medida em pH 8,0 (Duff, et al. 1995). O estado de fosforilação que ocorre em resíduos específicos de serina, é outro importante mecanismo de regulação da atividade da PEPC. A fosforilação de um único resíduo de serina na região amino-terminal (Ser-8 no sorgo e Ser-15 no milho) altera a sensibilidade da enzima ao malato em pH fisiológico, sem contudo alterar a V_{max} e o conteúdo da proteína PEPC (Chollet, et al. 1996). O motivo de fosforilação próximo do N- terminal (E/DR/KxxSIDAQL/MR) é específico para PEPC de plantas (Lepenec, et al. 1994). A fosforilação (fosfo-PEPC) desse resíduo de serina é catalizada por uma cinase. Em pH fisiológico a fosforilação torna a PEPC muito menos sensível a inibição pelo malato e, ao mesmo tempo, mais sensível a ativação pela glucose-6-fosfato. A desfosforilação (defosfo-PEPC) é catalisada por uma fosfatase do tipo 2A e torna a PEPC mais sensível a inibição pelo malato (Echevarria, et al. 1990). Em milho, a produtividade de grãos está correlacionada com as concentrações foliares de rubisco, PEPC, PPDK (Sasakawa e Sugiyama, 1989) e as atividades da PEPC e da Fd-GOGAT (Purcino, et al. 1996). A correlação da atividade da PEPC com o rendimento dos grãos foi significativa quando a atividade foi calculada por grama de peso fresco e por mg de proteína (atividade específica). Em milho, a fertilização com nitrogênio provoca aumento na atividade de várias enzimas de assimilação de carbono e nitrogênio, mas o maior aumento é invariavelmente observado na atividade de PEPC. Apartir destes resultados, postulou-se que PEPC pudesse

ser utilizada como um marcador enzimático para discriminação de genótipos de milho quanto a responsividade no uso de nitrogênio. Neste estudo, PEPCs de genótipos contrastantes foram caracterizados quanto a atividade enzimática, atividade em gel desnaturante e Western blots com o objetivo de testar esta hipótese.

MATERIAL E MÉTODO

Os genótipos

Neste estudo foram utilizados os genótipos de milho contrastantes para alta e baixa eficiência no uso de nitrogênio, previamente selecionados em condições de campo utilizando dois níveis de adubação com nitrogênio (30 Kg N/ha e 130 Kg N/ha) pelo programa de melhoramento do CNPMS (tabela 1). O grupo de genótipos era composto por dois híbridos simples e duas linhagens para cada grupo segundo a eficiência na utilização de nitrogênio (tabela 1).

Tabela 1. Genótipos de milho eficientes e ineficientes na utilização de nitrogênio.

Eficiente	Ineficiente
HS 723 x 64	HS 723 X 11
HS 724 X 22	HS 20 X 64
LCMS 28-7.1	LCMS 28-10.2
LCMS 28-8.1	LCMS 28-17.2

HS Híbrido simples

L Linhagens

MATERIAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Cinco plantas de cada genótipo foram plantadas em vasos com vermiculita, regados com solução nutritiva de Hoagland (Arnon e Hoagland, 1940) preparada para fornecer 16mM de nitrato e mantidos em casa de vegetação. Esta solução foi fornecida às plantas até o estágio de terceira folha completamente expandida. A partir desta data, três vasos de cada genótipo continuaram a receber 16mM de nitrato enquanto que três outros passaram a receber apenas 1,6mM de nitrato. As folhas foram colhidas quando as plantas atingiram o estágio de quarta folha completamente expandida. Após a colheita, as folhas tiveram suas nervuras centrais retiradas, foram acondicionadas em gaze, mergulhadas em nitrogênio líquido e mantidas à temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Extração da PEPC

Aproximadamente, 0,5 g de tecido de folhas congeladas provenientes dos diferentes genótipos foram triturados separadamente em cadinhos congelados contendo uma pequena quantidade de areia lavada e 3 ml de tampão de extração também congelado contendo [(50mM Tris-HCl, pH 7,6 contendo 5% glicerol, 100mM de 2-mercaptoetanol, 1mM de PMSF, 2mM EDTA, 10% PVPP e 20% etilenoglicol)]. Os homogenatos foram centrifugados à 14000 RPM durante 30 minutos a 4°C e os sobrenadantes contendo PEPC foram então analisados por eletroforese, ensaio enzimático e Western blot.

Quantificação protéica

A quantificação de proteína solúvel total de folha foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Eletroforese

Géis de poliacrilamida desnaturantes

Extrato total de proteína contendo PEPC foi fracionado por SDS-PAGE de acordo com Laemmli (1970) utilizando o sistema de minigel da Bio-Rad Laboratories. Quinze μmg de proteína total proveniente do sobrenadante dos diferentes genótipos foi carregado em cada poço de um gel empilhador 4% (p/v). A separação das proteínas foi obtida em gel separador 10% (p/v) a 120 V durante 75 minutos. Oito géis de poliacrilamida foram preparados cada um contendo triplicatas de cada genótipo crescido sob alta e baixa concentração de nitrogênio. Após eletroforese, as proteínas separadas foram coradas em Coomassie Brilliant Blue ou transferidas para membrana de PVDF para análises de Western blot.

Géis de poliacrilamida não desnaturantes

As isoformas de PEPC foram separadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida não desnaturantes utilizando o mesmo sistema descrito acima. Quinze μmg de proteína total dos diferentes genótipos foram carregados em cada poço do gel. A separação das proteínas foi alcançada em géis de poliacrilamida 8% a 200 V durante 90 minutos a 4°C. Após eletroforese, as proteínas separadas foram também coradas em Coomassie Brilliant Blue ou transferidas para membrana de nitrocelulose para análises de Western blot.

Análises de Western blot

As proteínas separadas por eletroforese desnaturante e não desnaturante foram transferidas para membrana de nitrocelulose com poros de $0.45\mu\text{m}$ a 15 V constantes durante 45 minutos para SDS-PAGE e 60 minutos para gel não desnaturantes, utilizando o sistema semi seco da Bio-Rad de acordo com instruções do fabricante. As membranas de nitrocelulose contendo PEPC foram incubadas a temperatura ambiente por 12 horas e sondadas com anticorpos policlonais específicos contra PEPC (1:800 diluição) de milho produzidos em coelho. Os complexos antígeno-anticorpo primário foram incubados com anticorpo secundário acoplado a peroxidase (1:3000 diluição) (goat-anti rabbit peroxidase, Sigma Chemical Co.) durante 60 minutos a temperatura ambiente e a revelação das bandas foi obtida com 4-cloro-1-naftoL.

Ensaio da atividade enzimática

A atividade da PEPC dos diferentes genótipos cultivados sob alta e baixa concentração de nitrogênio foi medida espectrofotometricamente em uma reação acoplada com malato desidrogenase. Cem μl de proteína total desalinizada foi encubada com a solução de mistura de reação contendo (0,5 M mercaptoetanol, 208,8 U/malato desidrogenase, 0,05M glicose 6 fosfato, 2mM NADH, 0,05M PEP) a 30°C durante 30 minutos. A reação enzimática foi iniciada com a adição de PEP e a oxidação de NADH foi monitorada a 340nm. A atividade de PEPC, foi também medida diretamente em géis não desnaturantes (Barrat, 1980). Neste procedimento após a eletroforese, o gel foi imerso na solução de mistura de reação contendo, (100mL de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,0, 1M MgCl_2 , 500mg de PVP 40, 120mg de PEP, 160mg de NaHCO_3 e 100 mg de fast blue BB salt). Após a reação, a atividade enzimática foi evidenciada como bandas de coloração marrom escuro (Brown, et al 1978).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade de PEPC fosforilada detectada por ensaio enzimático utilizando extrato protéico de folhas, aumentou variadamente em todos os genótipos quando crescidos em

concentrações altas de nitrato (16mM). Os genótipos 723x64 eficiente e CMS 28-10.2 ineficiente exibiram uma alteração significativa da atividade total variando de (2000 a 8000 μ moles $\text{CO}_2\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco. min^{-1}) para o primeiro e de (2600 a 9200 μ moles $\text{CO}_2\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco. min^{-1}) para o segundo quando crescidos em concentrações de 1.6mM e 16mM de nitrato respectivamente. Contrariamente, os genótipos 20x64 ineficiente e CMS-7.1 exibiram uma pequena mudança de atividade variando de (800 a 12000 μ moles $\text{CO}_2\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco. min^{-1}) e de (700 a 3200 μ moles $\text{CO}_2\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco. min^{-1}) quando crescidos sob as mesmas condições de concentração de nitrato. Adicionalmente, observou-se também que a atividade de PEPC desfosforilada obedeceu o mesmo comportamento da enzima fosforilada aumentando variadamente para todos os genótipos quando crescidos em alto regime de nitrato. No entanto, a variação da atividade total da PEPC fosforilada para todos os genótipos estudados em regimes de nitrato diferentes foi invariavelmente maior do que a forma desfosforilada. Estes resultados estão em concordância com os dados obtidos na literatura onde experimentos mostram que PEPC fosforilada é significativamente mais ativa do que a forma desfosforilada (Chollet, 1996) e que PEPC é mais responsiva a tratamentos com altas concentrações de nitrato. A atividade de PEPC observada em géis não desnaturantes contendo a mesma concentração de proteína total (15 μ g), demonstrou claramente uma variação da intensidade das bandas de PEPC em todos os genótipos quando crescidos em regimes de alta e baixa concentrações de nitrato. As bandas mais intensas eram sempre observadas para os genótipos crescidos em alta concentração de nitrato e este resultado, está em concordância com dados obtidos pela atividade total apresentados pelos ensaios enzimáticos.

Os resultados apresentados por Western blot de membranas de géis desnaturantes também concordam com os dados obtidos previamente, demonstrando seguramente uma variação de intensidade da banda de PEPC quando genótipos eram crescidos em regimes contendo alta concentração de nitrato. A exata variação da concentração de PEPC entre os vários genótipos crescidos em diferentes regimes de nitrato será obtida por análise densitométrica das membranas já existentes.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho utilizando os genótipos de milho crescidos em alta e baixa concentração de nitrato, sugerem a possibilidade da utilização da enzima PEPC como um marcador enzimático na discriminação de genótipos de milho quanto a sua responsividade à aplicação de nitrato.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ARNON, D.I.; HOAGLAND, D.R. Hoagland. Crop production in artificial solutions and soils with special reference to factors influencing yield and absorption of inorganics nutrients. **Soil Science**, Baltimore, v.50, p.463-5471, 1940.
- BARRAT, D.H.P. Method for the detection of glutamine synthetase activity on starch gels. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v.18, p.249-255, 1980.
- BROWN, A.H.D.; NEVO, E.; ZOHARY, D.; DAGAN, O. Genetic variation in natural populations of wild barley (*Hordeum spontaneum*). **Genetica**, The Hague, v.49, p.97-108, 1978.

- CHOLLET, R.; VIDAL, J.; O'LEARY, M.H. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.47, p.273-298, 1996.
- CRETIN, C.; SANTI, S.; KRYER, E.; LEPENIEC, L.; TAGU, D. The phosphoenolpyruvate carboxylase gene family of sorghum: promoter structures, amino acid sequences and expression of genes. **Gene**, Amsterdam, v.99, p.87-94, 1991.
- DUFF, S.M.G.; ANDREO, C.S.; PACQUIT, V.; LEPINIEC, L.; SARATH, G. Kinetic analysis of the non-phosphorylated, in vivo phosphorylated, and phosphorylation-site-mutant (Asp 8) forms of recombinant C4 phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum. **European Journal of Biochemistry**, New York, v.228, p.92-95, 1995.
- ECHEVARRIA, C.; VIDAL, J.; CHOLLET, R. Reversible light activation of the phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase in maize leaves. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.275, p.25-28, 1990.
- FURBANK, R.T.; TAYLOR, W.C.. Regulation of photosynthesis in C3 and C4 plants: a molecular approach. **Plant Cell**, Rockville, v.7, p.797-807, 1995.
- HUPPE, H.C.; TURPIN, D.H. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.45, p.577-607, 1994.
- LEPENIEC, L.; KRYER, E.; PHILLIPE, H.; GADAL, P.; CRETIN, C. Sorghum phosphoenolpyruvate carboxylase gene family: structure, function, regulation and evolution. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.21, p.487-502, 1983.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.
- PURCINO, A.A.C.; SASAKAWA, H.; T. Sugiyama. Enzimas do metabolismo de carbono e nitrogênio em milho. **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1988-1991**. Sete Lagoas, v.5, p.56, 1992
- SASAKAWA, H.T.; SUGIYAMA, T. Contents of carbon-assimilating enzymes of maize hybrids released between 1936 and 1976. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.35, p.161-169, 1980.