

## **ANÁLISE DA GLUTAMINA SINTETASE EM GENÓTIPOS DE MILHO CONTRASTANTES NA EFICIÊNCIA DO USO DE NITROGÊNIO**

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

EMBRAPA MILHO E SORGO – Núcleo de Biologia Aplicada - Laboratório de Bioquímica de Plantas. Rodovia MG 424 Km 65, Caixa Postal 151, 35701-970. Sete Lagoas, MG.  
E-mail: thales@cnpmembrapa.br

Palavras-chave: Glutamina Sintetase, Atividade, SDS-PAGE, Gel Nativo, Western Blot.

### **INTRODUÇÃO**

O metabolismo do nitrogênio está relacionado com o metabolismo do carbono (Huppe e Turpin, 1994) e para melhorar a eficiência do uso de nitrogênio, é necessário conhecer como as enzimas do metabolismo do nitrogênio são reguladas e como elas influenciam a produtividade das lavouras.

O nitrogênio é um fator regulatório essencial para ação da luz sobre o acúmulo dos RNA mensageiros da ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco), fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), piruvato ortofosfato dicinase (PPDK), glutamina sintetase (GS) e ferredoxina-glutamato sintase (Fd-GOGAT) (Sakakibara et al., 1992; Sugihato et al., 1990). A rubisco, a PEPC e a PPDK são enzimas chave no processo de fixação de CO<sub>2</sub> em plantas tipo C4 e a GS e Fd-GOGAT formam a principal rota de assimilação primária de amônio em aminoácidos. Em células de plantas superiores, GS é uma proteína octamérica (350kDa) que apresenta duas formas: GS1 localizada no citoplasma com múltiplas isoformas, e GS2 (cloroplástica).

Nos últimos anos, tem se tornado evidente que as isoenzimas da GS executam funções bastante distintas no metabolismo do nitrogênio (Lam et al., 1996). Em cotilédones de rabanete, a concentração de GS1 aumenta enquanto a concentração de GS2 diminui quando as plantas entram em senescência pela ausência de luz (Kawakami e Watanabe, 1988). Este incremento observado na concentração de GS1, acontece em resposta ao aumento na quantidade de amônio que fica disponível para ser transportado para os tecidos em crescimento quando as proteínas dos tecidos mais velhos entram em degradação. Em plantas transgênicas de tabaco, GS1 é expressa no floema e é responsável pela síntese de glutamina que será transportada para tecidos jovens, enquanto, a GS2 é responsável pela assimilação primária do amônio derivado da redução do nitrato ou liberado durante o processo de fotorespiração (Edwards et al., 1990). Já em plantas de arroz, quando as folhas entram em senescência, a atividade total da GS decresce porque a concentração da GS2 diminui enquanto a da GS1 permanece constante por várias semanas. Durante este processo de intensa degradação protéica nas folhas, o papel da GS1 é sintetizar glutamina que será carregada no floema até os grãos em enchimento (Kamachi et al., 1991). Em experimentos preliminares, utilizando 6 genótipos de milho, previamente classificados como eficientes e ineficientes pelo Programa de Melhoramento de Milho do CNPMS/EMBRAPA, notou-se que os materiais que aparentemente tinham alta eficiência na utilização de nitrogênio quando cultivados em concentrações mais baixas 1.6mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apresentavam concentrações mais altas de GS2 que GS1, enquanto genótipos supostamente ineficientes, apresentavam maiores

concentrações de GS1 do que GS2 (Purcino et al., 1992). Em trabalhos mais recentes, foi demonstrado, que genótipos de milho crescidos em meio com alta e baixa concentração de nitrogênio sempre tinham mais GS2 do que GS1 e sob estas circunstâncias, a média da razão da concentração das isoformas GS1/GS2 era menor para as plantas cultivadas sob baixa concentração de nitrogênio quando comparadas com aquelas plantas crescidas sob alta concentração de nitrogênio. A partir destes resultados, postulou-se que GS pudesse ser utilizada como um marcador enzimático para discriminação de genótipos de milho quanto a eficiência no uso de N. Neste estudo, GSs de genótipos contrastantes foram caracterizadas quanto a atividade biosintética, atividade em gel nativo e Western blots com a finalidade de testar esta hipótese.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Os genótipos

Os oito genótipos utilizados neste estudo foram previamente classificados como eficientes ou ineficientes na utilização de nitrogênio. Os genótipos foram selecionados em condições de campo usando dois níveis de adubação com nitrogênio (30 Kg N/ha e 130 Kg N/ha). 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.

<b>Eficiente</b>	<b>Ineficiente</b>
<b>HS 723 x 64</b>	<b>HS 723 X 11</b>
<b>HS 724 X 22</b>	<b>HS 20 X 64</b>
<b>LCMS 28-7.1</b>	<b>L CMS 28 10.2</b>
<b>LCMS 28-8.1</b>	<b>L CMS 28 17.2</b>

**HS** Híbrido simples

**L** Linhagens

### Material e condições de cultivo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação sob condições naturais de luminosidade. Quarenta e duas sementes de cada genótipo foram plantadas em potes de vermiculita com dois tratamentos distintos (1.6mM e 16mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Após germinação, cada pote foi regado em dias alternados com 200 ml de solução nutritiva de Hoagland (Arnon e Hoagland, 1940).

### Extração da Glutamina sintetase

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 [(100mM tampão fosfato de potássio (pH 7.5), 500mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM ácido etilenodiaminotetracídico (EDTA), 200mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 500mM (DTT) e 10% de p/v (PVPP)]. Os homogenatos foram centrifugados a 14000 RPM durante 30 minutos à 4°C e os sobrenadantes contendo GS 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

Os polipeptídeos (GS1) citosólico e (GS2) cloroplástico de GS foram fracionados por

SDS-PAGE de acordo com Laemmli (1970) utilizando o sistema de minigel da Bio-Rad Laboratories. Quinze  $\mu\text{g}$  de proteína total proveniente do sobrenadante dos diferentes genótipos foram carregadas em cada poço de um gel empilhador 4% (P/V). A separação dos polipeptídeos foi obtida em gel separador 10% (P/V) a 120 V durante 75 minutos. Oito géis de poliácridamida foram preparados cada um contendo triplicatas de cada genótipo cultivado sob alta e baixa concentração de nitrogênio. Após eletroforese, as proteínas separadas foram coradas em Coomassie Brilliant Blue ou transferidas para membrana de nitrocelulose para análises de Western blot.

### **Géis de poliácridamida não desnaturantes**

As isoformas de GS também foram separadas eletroforéticamente em gel de poliácridamida não desnaturantes utilizando o mesmo sistema descrito acima. 15 $\mu\text{g}$  de proteína total dos diferentes genótipos foram carregadas em cada poço do gel. A separação das proteínas foi alcançada em géis de poliácridamida 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 PVDF com poros de 0.45 $\mu\text{m}$  a 15 V constantes durante 45 minutos para SDS-PAGE e 60 minutos para gel nativo, utilizando o sistema semi seco da Bio-Rad de acordo com instruções do fabricante. As membranas de PVDF contendo as isoformas de GS1 e GS2 foram incubadas a temperatura ambiente por 12 horas e sondadas com anticorpos policlonais específicos contra GS1 e GS2 (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 GS dos diferentes genótipos cultivados sob alta e baixa concentração de nitrogênio foi determinada pelo ensaio biosintético que se baseia na síntese de glutamil hidroxamato (Metzler, 1977). Trezentos  $\mu\text{l}$  de proteína total foram incubados com a solução de mistura de reação contendo (250mM tampão Tris-acetato + glutamina pH 7.5, 1M hidroxilamina, 5mM (ADP), 50mM cloreto de manganês e 1M arseniato de sódio) a 30°C durante 30 minutos. A reação enzimática foi então interrompida com a adição da solução de cloreto férrico contendo 0.67M de HCl, 0.20M de TCA e 0.3M  $\text{FeCl}_3$ , centrifugada e alíquotas de 1ml foram lidas em espectrofotômetro a 540nm.

A atividade de GS foi também medida diretamente em géis não desnaturantes de poliácridamida (Barrat, 1980). Neste procedimento, após a eletroforese, o gel foi imerso na mesma solução de mistura descrita anteriormente e então incubado a 30°C durante 30 minutos. A reação enzimática foi interrompida utilizando solução de cloreto férrico e atividade da enzima foi evidenciada como bandas de coloração marrom escuro que foram imediatamente fotografadas.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A atividade total de GS obtida por de ensaios biosintéticos, utilizando extrato protéico de folhas, demonstrou que os genótipos 723x64 e CMS28-7.1 de milho eficientes na utilização de nitrogênio exibiram uma mudança significativa da atividade total variando de 0.16 a

0.34  $\mu$  moles GHA  $g^{-1}$  peso fresco  $minuto^{-1}$  para o primeiro e de 0.22 a 0.36  $\mu$  moles GHA  $g^{-1}$  peso fresco  $minuto^{-1}$  para o segundo quando cultivados em concentrações de 1.6mM e 16mM de nitrato respectivamente. Ao contrário destes, o genótipo eficiente CMS 28 8.1 exibiu apenas uma pequena mudança de atividade variando de 0.29 a 0.34  $\mu$  moles GHA  $g^{-1}$  peso fresco  $minuto^{-1}$  enquanto o genótipo eficiente 723x64 praticamente não mostrou nenhuma variação de atividade sob as mesmas condições de concentração de nitrato. Por outro lado, somente uma variação mínima de atividade de 0.28 a 0.30  $\mu$  moles GHA  $g^{-1}$  peso fresco  $minuto^{-1}$  foi observada para o genótipo ineficiente 723x11 enquanto os outros genótipos ineficientes CMS 28 10.2, CMS 28 17.2 e 20x64 não mostraram nenhuma variação de atividade quando cultivados sob as mesmas condições descritas acima. Paralelamente, os genótipos eficientes e ineficientes apresentaram sempre uma maior concentração de proteína e de peso seco total quando cultivadas sob alta concentração de  $NO_3^-$ .

A atividade de GS observada em géis nativos, contendo a mesma concentração de proteína total demonstraram claramente um polimorfismo com variação de mobilidade e intensidade das bandas da isoforma GS1 em todos os genótipos quando cultivados em regimes distintos de  $NO_3^-$ . Estes resultados, estão em concordância com os dados de atividade total apresentados pelos ensaios biosintéticos.

Análise de Western blot de géis desnaturantes demonstraram que os genótipos cultivados tanto em alta quanto em baixa concentração de  $NO_3^-$  tenderam a apresentar bandas de GS2 mais intensas do que GS1. Western blot de membranas de géis nativos demonstraram a presença de uma única banda, quando sondado com anti GS2 e pelo menos quatro bandas quando sondado com anticorpo anti-GS1. Este resultado, está em concordância com os dados apresentados na literatura.

## CONCLUSÃO

Até o presente momento, os dados obtidos em relação à atividade total de GS para genótipos de milho cultivados em condições de alta e baixa concentração de  $NO_3^-$  pelo ensaio biosintético, atividade em géis não desnaturantes e Western blot são indicativos, mas não permitem concluir sobre a utilização de GS como um possível marcador molecular para discriminação de genótipos de milho contrastante no uso de nitrogênio. A confirmação da variação na relação de concentração das isoformas GS1/GS2 entre genótipos contrastantes na utilização de nitrogênio, será feita por análises densitométricas das membranas de Western blot já obtidas.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARNON, D.I.; HOAGLAND, D.R. 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.

EDWARDS, J.W.; WALKER, E.L.; CORUZZI, G.M. Cell-specific expression in transgenic

plants reveals nonoverlapping roles for chloroplasttic and cytosolic glutamine synthetase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.87, p.3459-3463, 1990.

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.

KAMACHI, K.; YAMAYA, T.; MAE, T.; OJIMA, K. A role for glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v.96, p.411-417, 1991.

KAWAKAMI, N.; WATANABE, A. Senescence-specific increase in cytosolic glutamine synthetase and its mRNA in radish cotyledons. **Plant Physiology**, Bethesda, v.88, p.1420-1434, 1988.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.

LAM, H.M.; COSCHIGANO, K.T.; OLIVEIRA, I.C.; MELO-OLIVEIRA, R. ; COUZZI, G.M. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.47, p.569-563, 1996.

METZLER, D.E. **Biochemistry, the chemical reactions of living cells**. New York: Academic Press, 1977. 1129p.

PURCINO, A.A.C.; SASAKAWA, H. ; SUGIYAMA, T. 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.

SAKAKIBARA, H. , KAWATA, S. ; HASE, T. ; SUGIYAMA, T. Differential effects of nitrogen and light on the expression of glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v.33, p.1193-1198, 1998.

SUGIHATO, B. ; MYATA, K. NAKAMOTO, H. SASAKAWA, H. ; SUGIYAMA, T. Sugiyama. Regulation of expression of carbon assimilating enzymes by nitrogen in maize leaf. **Plant Physiology**, Bethesda, v.92, p.963-969, 1990.