

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO¹

ALTAIR TOLEDO MACHADO², JOSÉ RONALDO MAGALHÃES²,
RICARDO MAGNAVACA² e MARLÚCIA ROCHA E SILVA³

Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo/EMBRAPA, Rod. MG 424,
km 65, CP 151, Sete Lagoas, MG, CEP-35700

RESUMO - Com o objetivo de verificar a possibilidade de se utilizar enzimas envolvidas no metabolismo do N, como parâmetro bioquímico auxiliar nos programas de seleção genética que visam a obtenção de genótipos eficientes na utilização de N, foi realizado em 1990, no campo experimental da EMBRAPA/CNPBS, uma avaliação de cvs de milho em solo sem adubação nitrogenada. Os genótipos avaliados foram: Nitrodente (ND), Nitroflint (NF), Sintético Elite, HS 1, HS 2 e P 3230. Os três primeiros materiais, são variedades de polinização aberta sendo selecionados para maior eficiência na utilização de N. O HS 1 e HS 2 são híbridos simples supostamente ineficiente e eficiente na utilização de N respectivamente, e o P 3230 é um híbrido duplo comercial supostamente ineficiente. Os parâmetros avaliados foram: produção de grãos (MG) e atividades das enzimas: nitrato redutase (NR), Nitrogenase (Nase) e Glutamina Sintetase (GS). Foi observada uma ampla variação genética na atividade das enzimas, e a GS apresentou correlação positiva com a produção de grãos sendo sua atividade considerada como um bom parâmetro a ser utilizado em programas de seleção genética.

Termos adicionais para indexação: Melhoramento vegetal, glutamina sintetase, nitrogenase e nitrato redutase

ENZYME ACTIVITIES INVOLVED WITH NITROGEN METABOLISM IN DIFFERENT MAIZE GENOTYPES

ABSTRACT- The study aimed to verify a possible utilization of nitrogen assimilating enzymes as biochemistry parameters for a genetic screening program in order to obtain nitrogen assimilating efficient maize genotypes. The experiments were carried out at CNPBS (Rio de Janeiro) in field condition without any nitrogen application, by using randomized complete block design with four replications. The genotypes used were: Nitrodente (ND); Nitroflint (NF), Sintético Elite; HS 1; HS 2 and P 3230. The first three genotypes are varieties selected for nitrogen utilization efficiency. HS 1 and HS 2 are simple hybrids supposed to be nitrogen assimilation efficient and inefficient respectively and P 3230 is a commercial double cross hybrid supposed to be inefficient in N utilization. The studied parameters were: grain production, N assimilating enzymes, nitrate reductase (NR), nitrogenase (Nase) and glutamine synthetase (GS). The observed data showed a wide genetic variation concerning enzyme activities and GS shows significant and positive correlation with grain production, being considered an appropriated parameter to be used in a genetic screening program for maize breeding.

Additional index terms: plant breeding, glutamine synthetase, nitrogenase and nitrate reduction

INTRODUÇÃO

A otimização da produtividade de grãos depende, entre outros fatores, da eficiência de canalização de C e N para o grão e da transformação desses elementos em compostos de reserva. Aumentar a eficiência através da manipulação desses processos pode ser um meio de melhorar a produtividade no futuro. No momento, ainda é necessário conhecer melhor os mecanismos genéticos e bioquímicos de tais processos (Sodek, 1989).

Pode-se observar na literatura que vários trabalhos tem demonstrado a existência de uma ampla variabilidade genética para eficiência na utilização do N pelo milho (Kamprath *et al*, 1982; Anderson *et al* 1984 e 1985; Moll *et al*, 1989; Machado *et al* 1990 e 1991; Machado e Paterniani, 1991) entre outros. Por ser o nitrato a forma preferencial de absorção de N pelas plantas (Arnon, 1937 e Hewitt *et al* 1976) alguns autores acreditam que a seleção para maior atividade da enzima nitrato redutase é um parâmetro importante para obtenção de genótipos eficientes no uso do N (Dunand, 1980; Sherrard *et al* 1984 e Haoeman e Lambert, 1988). Uma outra corrente de pensamento acredita que a fixação biológica através da determinação da atividade da enzima nitrogenase é um caminho alternativo e importante para se obter plantas eficientes (Bullow e Dobereiner, 1975).

Apesar dessas indicações de pesquisa, sabe-se entretanto que os caminhos para se obter genótipos eficientes na utilização do N são bastante complexos, pois o metabolismo do N é influenciado por diversos fatores ambientais tais como: déficit hídrico (Becana *et al*, 1984), encharcamento (Lopes *et al*, 1988), luz (Duke e Duke, 1984), toxidez do alumínio (Cambraia, 1989) e parece não haver dúvida que essas condições de estresse agem diretamente sobre a atividade da enzima nitrato redutase e interfere também, em outros enzimas do metabolismo do N e provavelmente com o catabolismo de aminoácidos, proteínas e outros compostos nitrogenados. Nessas situações o íon amônio parece ser a forma predominante de absorção de N pelas plantas (Magalhães e Fernandes, 1991), e sabe-se ainda que os genótipos eficientes são aqueles que tem alta capacidade de incorporar o íon amônio em aminoácidos através das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), principalmente. Assim, a maior atividade dessas enzimas no tecido verde parece ser um dos parâmetros que melhor indica a eficiência na assimilação da amônia (Magalhães e Huber, 1989, a e b, 1991).

Apesar destas evidências apresentadas, observa-se na

¹Recebido em 05/12/91 e aceito em 29/05/92.

²Pesquisador.

³Bolsista do CNPq.

literatura que proposições e conclusões das enzimas nitrato redutase, nitrogenase e glutamina sintetase foram feitas em genótipos normalmente de estreita base genética e também pouca atenção foi dada a variabilidade da espécie em estudo. Faltam ainda, dados suficientes sobre atividade dessas enzimas em condições de estresse principalmente quando é considerado a diversidade genética.

Assim, nesse trabalho, procurou-se conhecer o comportamento das enzimas descritas quando diferentes genótipos do milho são avaliados em um ambiente de baixa fertilidade natural e ainda verificar a possibilidade de utilizar atividade de algumas dessas enzimas como parâmetro auxiliar em programas de seleção genética que visam a obtenção de plantas eficientes na utilização do N.

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido em 1990, no campo experimental da EMBRAPA/CNPBS, em solo Podizólico Vermelho-Amarelo, e o delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso com 4 repetições sendo que cada parcela foi constituída de 2 fileiras de 5 m.

As populações estudadas foram: NITRODENTE (ND) - população de grãos dentados, amarelos com segregação para branco com predomínio da raça Tuxpeño, com três ciclos de seleção para uma maior eficiência na utilização do N; NITROFLINT (NF) - população de grãos duros, amarelas com segregação para branco, com predomínio das raças Cateto, Eto e Duros do Caribe, também com três ciclos de seleção visando maior eficiência na utilização do N; SINTÉTICO ELITE, população obtida a partir da recombinação de linhagens superiores do CNPHS de base predominantemente Tuxpeño; HS 1 - híbrido simples do CNPHS supostamente exigente a altos níveis de adubação nitrogenada; HS 2 - híbrido simples do CNPHS, supostamente eficiente na utilização do N; e P 3230, híbrido duplo comercial da Pioneer também exigente a adubação nitrogenada.

Com a finalidade de verificar o comportamento desses cvs em níveis baixos de N, a adubação de plantio foi de 300 kg/ha da fórmula 0-30-10 não sendo realizado adubação em cobertura.

A densidade de plantio foi de 27 plantas por 5 m e o espaçamento de 1 m entre fileiras. Os parâmetros avaliados foram produção de grãos (MG) e atividade das enzimas nitrato redutase (NR), nitrogenase (Nase) e glutamina sintetase (GS).

A atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase foram determinadas pelo método *in vivo* (Pereira *et al*, 1978 e Rhodes *et al*, 1975) aos 50 dias após a plantio. Para essa determinação foram retirados discos foliares na terceira folha desenvolvida do ápice para a base em 5 plantas competitivas de cada tratamento por repetição. Os discos foliares foram homogenizados e retirados amostras de 1 g para determinar a atividade das enzimas acima descritas. A atividade da enzima nitrogenase foi realizada nas raízes, também em 5 plantas competitivas e foi utilizado o método *in vivo* descrito por Pereira *et al*, 1978. Por ocasião da colheita foi determinado a produção de grãos dos cvs em estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes à produção de grãos e a quantificação da atividade das enzimas: glutamina sintetase (GS), nitrato redutase (NR) e nitrogenase (Nase) encontram-se na Tabela 1. A partir desses dados pode-se destacar a ampla variabilidade genética existente entre as cvs para os parâmetros acima estudados.

TABELA 1- Valores da glutamina Sintetase (GS) em n moles/g MF/min, massa de grãos em kg/ha (MG), nitrato redutase (NR) em n moles NO₂/g MG/hora, nitrogenase (NASE) em n moles etileno/hora/g raiz, de seis cvs de milho avaliados na EMBRAPA/CNPBS. Rio de Janeiro, 1990.

	GS	MG	NR	NASE
Nitrodente	86,41 a	3739	0,391 b	47,25 b
Nitroflint	91,40 a	4327	0,319 b	43,00 b
HS 1	71,42 bc	3003	0,933 a	75,75 b
HS 2	67,02 bc	3200	0,375 b	326,00 a
Sintético Elite	64,09 c	3024	0,439 b	116,00 b
P 3230	77,92 b	4209	0,381 b	20,00 b
x	75,97	3588	0,42	104
cv (%)	4,23	21,93	98,75	114
TESTE F	** ⁽²⁾	ns ⁽³⁾	ns	* ⁽¹⁾

Dados seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5%.

Com relação a produção de grãos, a cultivar selecionada para maior eficiência na utilização de N (NITROFLINT), apresentou uma produtividade 40% maior em relação ao material considerado ineficiente (HS 1), com produção de grãos de 4327 e 3003 kg/ha, respectivamente. Para a atividade da enzima GS o destaque foi para os cvs NITRODENTE e NITROFLINT e em relação as enzimas NR e Nase os híbridos simples HS 1 e HS 2 foram os que predominaram.

Ao se utilizar parâmetros fisiológicos e bioquímicos, em métodos de seleção deve-se considerar a validade e a confiabilidade desses parâmetros. pois muitos deles sofrem grande efeito ambiental. Dentro desse aspecto pode-se observar que o parâmetro GS apresentou baixo coeficiente de variação (CV=4,23%), a produção de grãos teve um CV médio (CV=21,94) e a atividades das enzimas NR e Nase, apresentaram valores muito elevados (CV=98,75% e CV=114%, respectivamente). Esses dados indicam que a GS foi o parâmetro de maior confiabilidade.

Na Tabela 2, encontra-se a matriz de correlação para os parâmetros, MG, GS, Nase e NR. Observa-se que houve uma correlação significativa a 1% pelo teste F, entre os parâmetros GS e MG. A atividade das enzimas NR e Nase apresentaram correlação negativa com MG e GS. Isso indica que em condições de estresse ao N essas duas enzimas não são parâmetros de boa confiabilidade para ser utilizado em programa de seleção genética para obter genótipos com alta eficiência na utilização do N. Observe-se ainda na Tabela 2, correlação negativa entre NR e Nase, esse tipo de comportamento também foi observado por Pereira *et al*, 1978.

TABELA 2-Matriz de correlação entre a produção de grãos (MG), glutamina sintetase (GS), nitrogenase (Nase) e nitrato redutase (NR).

MATRIZ DE CORRELAÇÃO				
	PG	GS	NASE	NR
PG	1.0000	0.6878**	-0.3633	-0.4740*
GS		1.0000	-0.4638*	-0.1267
NASE			1.0000	-0.2250
NR				1.0000
MÉDIAS	4006.1	76.0	156.2	0.770

*,** correlação significativa a P<0.05 e P<0.01.

Os resultados desse trabalho indicam ainda que a seleção de genótipos para maior atividade das enzimas NR e Nase vai depender da melhoria da precisão dos parâmetros bem como da associação com outros parâmetros como, por exemplo,

produção de grãos e atividade da GS. A alta atividade da NR e da Nase pode não ser sinônimo de alta produtividade, pois essas enzimas estão intimamente ligadas ao sistema de absorção de N pelas plantas via nitrato e via fixação biológica. Assim para que o N absorvido nessas formas ou ainda na forma amoniacal seja utilizado de maneira eficiente pelas plantas, outros mecanismos devem estar envolvidos, dos quais pode-se destacar: disponibilidade de esqueletos de carbono, alta produção de energia e principalmente alta atividade das enzimas responsáveis pela assimilação da amônia, como é o caso do sistema GS/COGAT (Lea & Miflin, 1974, 1979 a e b; Oaks & Hirel, 1985 e Lea *et al*, 1990).

Não se pode deixar de considerar que, se os mecanismos descritos não forem eficientes, poderá ocorrer acúmulo de NH no mesófilo foliar o que pode acarretar uma série de desordens morfo-fisiológicas nas plantas (Magalhães & Huber 1989 a).

A atividade da GS foi o parâmetro que mais se destacou nesse trabalho por apresentar alta correlação com a produção de grãos. Pelo fato dessa enzima estar envolvida diretamente com o metabolismo da amônia, ela tem sido encontrada em múltiplas isoformas em plantas superiores (McNally e Hirrel, 1983). Em milho existem as isoformas GS1 e GS2 que ocorrem em proporções similares nas células do mesófilo, bainha e nervuras. Isso confere uma vantagem em termos de uso do N (Yamaya e Oaks, 1988). Devemos destacar ainda o fato da existência de variabilidade para a atividade da GS, o que permite utilizá-la com sucesso em programas de seleção genética.

CONCLUSÕES

1- A determinação da atividade da enzima GS pode ser utilizada como parâmetro auxiliar em programas de seleção genética visando maior eficiência na utilização do N.

2- As enzimas NR e Nase não apresentaram boa atividade, quando avaliadas em condição de baixo nível de N, deve-se ainda, melhorar a precisão da metodologia utilizada.

3- Os cvs NITRODENTE e NITROFLINT apresentaram alta atividade da enzima GS e tiveram também uma boa produtividade, podendo assim, serem utilizados em programas de seleção genética que visam maior eficiência na utilização do N.

AGRADECIMENTOS

M

Agradeço a colaboração da ENBRAPA/CNPBS em nome dos pesquisadores José Guilherme M. Guerra, Johanns Dobereiner e Maria Cristina Neves e ao Depto de Solos da UFRRJ em nome dos professores Manlio S. Fernandes e Edna Riemke de Souza.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, E.L.; KAMPRATH, E.J.; MOLL, R.H. & JACKSON, W.A. Effect of N fertilization on silk synchrony, ear number, and growth of semiprofitic maize genotypes. *Crop Science*, 24:663-666, 1984.
- ANDERSON, E.L.; KAMPRATH, E.J. & MOLL, R.H. Prolificacy among fertilizer effects on yield and N utilization in maize. *Crop Science*, 25:538-602, 1985.
- ARNON, D.I. Ammonium and nitrate nitrogen nutrition of barley at different seasons in relation to hydrogen-ion concentration, manganese, copper and oxygen supply. *Soil Science*, 44:91-113, 1937.
- BECANA, M.; APARACIO, P.M. & SANCHES-DIAZ, M. Effects of water stress on enzymes of ammonia assimilation in root nodules of alfafa (*Medicago sativa*). *Physiologia Plantarum*, 61:655-657, 1984.
- BULLOW, J.F.W. von & DOBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72:2389-2393, 1975.
- CAMBRAIA, J. Mecanismos de tolerância à toxidez de alumínio em plantas. In: *Reunião Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 2, Piracicaba, SP, 1989. Anais. Piracicaba, SBFV/ESALQ, 1989.
- DUKE, S.H. & DUKE, S.D. Lith control of extractable nitrate reductase activity in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 62:485-493, 1984.
- DUNAND, R.T. **Divergent phenotypic recurrent selection for nitrate reductase activity and correlated responses in maize.** Urbana-Champaign, Univ. of Illinois, 1980. Tese Doutorado.
- HAGEMAN, R.H. & LAMBERT, R.J. The use of physiological traits for corn improvement. In: Sprague, G.F. (ed). **Corn and corn improvement**. 3.ed., Madison, American Society of Agronomy, 1988. P.431-461.
- HEWITT, E.J., HUCKLESBY, D.P. & NOTTEN, B.A., In: Donner, J. & VARNER, J.E. (eds). *Plant biochemistry*. New York, Academic Press, 1976. P.633-68.
- KAMPRATH, E.J., R.H. MOLL, & N. RODRIGUEZ. Effects of nitrogen fertilization and recurrent selection on performance of hybrid population of corn. *Agronomy Journal*, 74:955-958, 1982.
- LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, 251:614-618, 1974.
- LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. Photosynthetic ammonia assimilation. In: Gibs, M. & Latzko, E. (eds). *Photosynthesis*. Berlin, Springer Verlae, 1979 a. v.2, P.445-456.
- LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. The Assimilation of ammonium nitrogen by chlorophyllous tissue. In: Hewitt, E.J. & Cutting, C.V. (eds). *Nitrogen assimilation of plants*. London: *Academic Press*, 1979 b. p.475-487.
- LEA, P.J.; BLACKWELL, R.D.; CHEN, F. & HECHT, V. Enzymes of ammonia assimilation. In: *Methods in plant biochemistry*. London, Academic Press, 1990. v.3, p. 257-276.
- LOPES, M.A.; MAGNAVACA, R.; GAMA, E.E.G.; PARENTONI, S.N.; SANTOS, N.X. & BAHIA FILHO, A.F.C. Mejoramiento de mays para adaptacion a los suelos del "cerrado" brasileno. In: Seminario mejoramiento para tolerancia a factores ambientales adversos en el cultivo del maiz, 3, Quito, Peru, 1987. Anais. Quito, IICA/BID/PROCIANDINO, 1988. 53- 105, 1988.
- MACHADO, A.T.; MAGNAVACA, R. & MAGALHÃES, J.R. Perspectivas do melhoramento genético em duas populações de milho visando maior eficiência na absorção e utilização do nitrogênio. In: Congresso nacional de milho e sorgo, 181 Vitória, ES, 1990. Anais (no prelo). 1991.
- MACHADO, A.T.; PURCINO, A.A.C.; NAGALH4ES, R.C.; MAGNAVACA, R. & MAGALH4ES, J.R. Efeito da seleção genética em duas populações de milho, para maior eficiência na utilização do nitrogênio. In: Reunion de macteros de la zona andina, 14, 8 Reunion Sudamericana de Macieros Maracay, 1, Maracay, 1990. Anais. Maracay, s.ed., 1990.
- MACHADO, A.T. & PATERNIANI, E. Avaliação de germoplasma de milho em relação a eficiência e ou fixação biológica de nitrogênio. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 17, Piracicaba, BP, 1986. Anais (no prelo). 1991.
- MAGALHÃES, J.R. & FERNANDES, M.S. Absorção e metabolismo de nitrogênio sob condições de stress. In: Simpósio Brasileiro de Nitrogênio em Plantas, 1, Rio de Janeiro, 1990. Anais. Rio de Janeiro, UFRRJ, 1990. V.2. P.358-382. 1990.
- MAGALHÃES, J.R. & HUBER, D.N. Growth and ammonium assimilation enzyme activity in response to nitrogen forms and pH control. *Journal of Plant Nutrition*, 12(8):985-996, 1989.
- MAGALHÃES, J.R. & HUBER, D.N. Ammonium assimilation in different plant species as affected by nitrogen form and pH control in solution culture. *Fertilizer Research*, 21(1):1-6, 1989 b.
- MAGALHÃES, J.R. & HUBER, D.M. Responses of ammonium assimilation enzymes to nitrogen treatments in different plant species. *Journal of Plant Nutrition*, 14(2):175-185. 1991.
- MC NALLY, S.F., & HIREL, B., Glutamine synthetase isoforms in higher plants. *Physiol. Veg.*, 21:761-774, 1983.
- MOLL, R.H., E.J. KAMPRATH, & JACKSON, W.A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agronomy Journal*, 74:562-564, 1989.
- OAKS, A. & HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. *Annual Review of Plant Physiology*, 36:345-365, 1985.
- PEREIRA, P.A.A.; BULLOW, J.F.W. von & NEYRA, C.A. Atividade de nitrogenase, nitrato reductase e acumulação de nitrogênio em milho braquitico, *Zea mays* L. (cv. Pirania) em dois níveis de adubação nitrogenada. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 2:28-33, 1978.
- RHODES, D., RENDON, G.A. & STEWART, G.R. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. *Planta*, 125:201-211, 1975.
- SHERRARD., J.H.; LAMBERT, R.J.; NESSNER, N.J.; BELOW, F.E. & HAGEMAN, R.H. Plant breeding for efficient plant use of nitrogen. In: *Nitrogen in crop Production*. Madison, USA. ASA-CSSA-SSSA, p.363-378.
- SODEK, L. Mecanismos bioquímicos de enchimento de grãos em leguminosa. In: *Reunião Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 2, Piracicaba: 1989. Anais. Piracicaba, SBFV/ESALQ, 1989. p.115-121.
- YAMAYA, T., & OAKS, A. Distribution of two isoforms of glutamine synthetase in bundle sheath and mesophyll cells of corn leaves. *Physiologia Plantarum*, 72:23-28, 1988.