

# ATIVIDADE DA PEP-CARBOXILASE E DA GLUTAMINA SINTETASE EM GENÓTIPOS DE MILHO E SORGO CONTRASTANTES EM EFICIÊNCIA DE USO DE NITROGÊNIO<sup>1</sup>

ANTONIO ALVARO CORSETTI PURCINO<sup>2</sup>, FREDOLINO GIACOMINI DOS SANTOS<sup>3</sup>, MANOEL XAVIER DOS SANTOS<sup>4</sup>, EDILSON PAIVA<sup>2</sup> e MARLUCIA DA ROCHA E SILVA<sup>5</sup>

EMBRAPA/CNPMS, CP 151, Sete Lagoas, MG, 35700-000, Brasil.

**RESUMO-** A seleção para aumento da eficiência de uso do N (EUN) foi feita no campo, mas para as determinações das atividades da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP-case) e da glutamina sintetase (GS), duas linhagens de milho (*Zea mays* L.) e duas cvs de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), contrastantes em EUN, foram cultivadas em vermiculita por 21 e 35 dias respectivamente, quando a 4ª folha de cada planta foi colhida para análise. A atividade biossintética da GS foi determinada em uma reação acoplada com a piruvato quinase e a lactato desidrogenase, enquanto a atividade da PEP-case foi determinada pela redução do oxaloacetato a malato, em presença da malato desidrogenase e NADH. Nos dois ensaios monitorou-se a oxidação do NADH em 340 nm.

Os resultados indicaram, no nível de 1.6 mM de  $NO_3^-$ , que as atividades da GS não foram diferentes entre os genótipos de milho e sorgo contrastantes em EUN. No nível de 16 mM de  $NQ^-$ , entretanto, os genótipos de milho e sorgo com maior EUN mostraram maior atividade da GS que os genótipos menos eficientes. A cv eficiente de sorgo 8701016 mostrou maiores atividades da PEP-case que a menos eficiente 9109065, nos dois níveis de nitrato utilizados nesse experimento.

**Termos adicionais para indexação:** *Sorghum bicolor*, *Zea mays*.

## PEP-CARBOXYLASE AND GLUTAMINE SYNTHETASE ACTIVITY IN MAIZE AND SORGHUM GENOTYPES WITH CONTRASTING NITROGEN USE EFFICIENCIES

**ABSTRACT-** Selection for increased N use efficiency (NUE) was done under field conditions, but for activity determinations

<sup>1</sup>Recebido em 14/10/1993 e aceito em 28/03/1994.

<sup>2</sup>Eng. Agr., Ph.D, Bolsista do CNPq, Laboratório de Biotecnologia.

<sup>3</sup>Eng. Agr., D.S, Subprograma Melhoramento de Sorgo.

<sup>4</sup>Eng. Agr., D.S, Subprograma Melhoramento de Milho.

<sup>5</sup>Bióloga, Bolsista do CNPq

of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEP-case) and glutamine synthetase (GS), two contrasting maize (*Zea mays* L.) lines and two sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) cvs were grown in vermiculite for 21 and 35 days respectively, when the 4th leaves were harvested for analysis. The biosynthetic activity of GS was determined in a coupled reaction with pyruvate kinase/lactate dehydrogenase, and PEP-case activity, after reduction of oxaloacetate to malate, in the presence of malate dehydrogenase and NADH. For both assays, NADH oxidation was monitored at 340 nm. Results obtained indicated that the activities of GS were not significantly different between contrasting NUE maize and sorghum genotypes, under 1.6 mM  $NQ^-$ . Under 16 mM  $NO_3^-$  however, maize and sorghum genotypes considered efficient N users, had higher GS activities than less efficient materials. The efficient sorghum cv 8701016 had higher PEP-case activities than the less efficient 9109065 under both nitrate levels used in this experiment.

**Additional index terms:** *Sorghum bicolor*, *Zea mays*.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, principalmente a partir dos anos 60, a maior disponibilidade de fertilizantes e calcário permitiu que grandes extensões de solos de baixa fertilidade tivessem suas características químicas melhoradas e fossem cultivados com níveis satisfatórios de produtividade. O enfoque predominante nos programas de melhoramento de plantas era, então, desenvolver cvs que respondessem a essas condições melhoradas do solo, e um grande número de experimentos de competição de materiais genéticos sob níveis crescentes de fertilizantes foi realizado.

Inegavelmente, esse enfoque permitiu que a fronteira e a produtividade agrícola brasileira crescessem a taxas elevadas, aumentando a oferta de alimentos. Entretanto, mais recentemente, ficou claro que a produtividade agrícola não poderia ter sua sustentação baseada no uso crescente de insumos, inclusive dos fertilizantes, principalmente porque um grande número de produtores não tem acesso a esses insumos e, mais

recentemente, por causa dos problemas ecológicos que a utilização indiscriminada desses pode acarretar. Sabe-se hoje, por exemplo, que o N pode contaminar os lençóis freáticos e, possivelmente, torná-los impróprios para consumo. Sabe-se também, que os híbridos de milho selecionados sob altos níveis de N em solos naturalmente muito férteis como os do "corn belt" americano ou, em áreas adubadas com mais de 180 kg ha<sup>-1</sup>, são bioquimicamente menos eficientes na utilização desse nutriente, pois algumas enzimas de assimilação de N e enxofre foram indiretamente selecionadas para um maior Km (constante de Michaelis-Menten) pelos seus substratos (Cacco et al., 1983), o que significa que essas enzimas precisam de maiores concentrações desses substratos para se tornarem ativas. Em vista disso, ficou evidente que se deveria pesquisar a possibilidade de se adaptar as plantas ao ambiente e não apenas desenvolver tecnologias visando a modificação do ambiente em benefício das plantas. Com esse enfoque, iniciou-se no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, uma série de trabalhos com o intuito de identificar genótipos de milho e sorgo que fossem mais eficientes no uso de N, definindo-se essa eficiência como a quantidade de grãos produzidos por quilo de fertilizante aplicado ao solo. O objetivo desse experimento foi verificar se a seleção para eficiência de uso de N nessas culturas teve algum efeito na atividade da PEP-carboxilase (PEP-case) e da glutamina sintetase (GS), duas enzimas chaves na assimilação de carbono e N em plantas tipo C<sub>4</sub> e, verificar se elas podem ser utilizadas como marcadores bioquímicos para seleção de materiais com eficiência de uso de N mais alta.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se duas linhagens de milho e duas cvs de sorgo contrastantes, em experimentos de campo, em eficiência de uso de N (EUN). As sementes das linhagens de milho foram obtidas de plantas S4, produzidas a partir de trabalhos conduzidos em solo aluvial eutrófico que recebeu 400 kg/ha da fórmula 4-14-8 no plantio e, com uma densidade de 100000 plantas/ha. Essa adubação corresponde a 16 kg/ha de N e essas plantas não receberam adubação em cobertura. As cvs de sorgo foram obtidas em experimentos de competição de materiais contrastantes em EUN conduzidos em um latossolo vermelho-escuro, fase cerrado, que recebeu calcário para eliminar o alumínio tóxico e uma adubação basal com P, K, micronutrientes e 10 kg/ha de N no plantio, sem adubação em cobertura e, com 160000 plantas/ha. A linhagem de milho Sintético Elite 1, quando cultivada sob baixo nível de N, apresenta plantas sem sintomas visuais de deficiência desse nutriente, enquanto a linhagem Sintético Elite 2, nas mesmas condições de cultivo, mostra sintomas de deficiência. A cv de sorgo 8701016 é considerada mais eficiente que a 9109065. Para a determinação da atividade da PEP-case e da GS, esses materiais foram cultivados em vasos com 2

Kg de vermiculita (7 plantas/vaso, após o desbaste) e regadas em dias alternados com 200 mL de uma solução de Arnon & Hoagland (1940) preparada para fornecer dois níveis de nitrato (1.6 e 16 mM). Cada tratamento foi repetido 3 vezes, sendo que as folhas do milho foram amostradas aos 21 dias após a germinação (DAG) e as do sorgo, aos 35 DAG. Por ocasião da amostragem, colheu-se a quarta folha a partir da base da planta, da qual se retirou a nervura central. Essas lâminas foliares das 7 plantas de cada vaso foram então empacotadas em gaze de algodão, imediatamente congeladas em N<sub>2</sub> líquido e transferidas para um freezer a -80 °C, até a determinação das atividades enzimáticas.

Para extração das enzimas, pesou-se 1 g de folha, a qual foi finamente macerada em almofariz na presença de N<sub>2</sub> líquido, adicionando-se então 100 mg de polivinilpirrolidona (PVPP). O descongelamento foi realizado em quatro volumes de [Tris(hidroximetil)aminometano]-[Tris]-HCl pH 7.5, contendo 20 mM de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 10 mM de 2-mercaptoetanol. No caso do sorgo, à essa solução de extração acrescentou-se ainda 0.5 mM de fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF). Após o descongelamento, a amostra foi centrifugada a 16.464 g, 2°C, por 15 min, sendo o sobrenadante, contendo as enzimas, recolhido em tubos de vidro mantidos abaixo de 4 °C.

A determinação da atividade da PEP-case foi realizada após a redução do oxaloacetato a malato, em presença da malato desidrogenase (MDH) e B-nicotinamida adenina dinocluotídeo em sua forma reduzida (NADH) (Uedan & Sugiyama, 1976). O meio de reação, com um volume final de 1 ml continha 100 mM de Tris- HCl pH 7,2, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 10 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM de 2- mercaptoetanol, 5.5 UI de lactato desidrogenase (LDH), 12 UI de MDH, 5 mM de glucose-6-fosfato, 0.2 mM de NADH, 5 mM de fosfoenolpiruvato (PEP) e 100 µ L do extrato cru diluído 10 vezes para o milho e 5 vezes, para o sorgo. A reação foi iniciada, após incubação em banho-maria por 3 min, a 30°C, pela adição do PEP e, a oxidação do NADH foi monitorada a 340 nm.

A determinação da atividade biossintética da GS foi efetuada após acoplamento com a piruvato quinase (PK) e a LDH (Stewart & Rhodes, 1977). O meio de reação, com um volume final de 2 mL, continha 50 mM de Tris-HCl pH 7.8, 5 mM de adenosina trifosfato (ATP), 20 mM de MgSO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA, 50 mM de KCl, 0.2 mM de NADH, 1mM de PEP, 50 mM de glutamato dissódico, 1 UI de LDH, 3.2 UI de PK, 20 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 100 µ L de extrato cru diluído 5 vezes. As enzimas de acoplamento e o extrato cru foram previamente dessalinizados em uma coluna de 1x5 cm de Shephadex G-25, equilibrada com o tampão de extração. O PEP, o ATP e o NADH foram preparados frescos, imediatamente antes do uso. A mistura de reação foi incubada em banho-maria por 3 min, a 30°C,

e a reação iniciada pela adição de NADH, sendo sua oxidação monitorada em 340 nm.

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa de computador MSTATC. Considerou-se que cada experimento, milho e sorgo, foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com os tratamentos arrançados em um fatorial com dois genótipos (eficiente e ineficiente), dois níveis de nitrato (1.6 e 16 mM) e, repetidos 3 vezes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto para o milho quanto para o sorgo, não foi possível diferenciar o genótipo eficiente do ineficiente, no nível de 1.6 mM de  $NO_3^-$ , baseado na atividade da GS (Tabela 1). Entretanto, nesse nível de N, o genótipo 8701016 de sorgo, considerado como material mais eficiente no uso desse nutriente, apresentou uma atividade para PEP-case significativamente mais alta que o material menos eficiente. No nível de 16 mM de  $NO_3^-$ , os materiais mais eficientes de milho e sorgo apresentaram atividades de GS e PEP-case mais altas que os materiais menos eficientes.

Com relação ao efeito do aumento no suprimento de N, os resultados da Tabela 1 mostram que as atividades da GS e as da PEP-case aumentaram significativamente nos genótipos eficientes de milho e sorgo, enquanto nos genótipos ineficientes isso ocorreu somente para a PEP-case do sorgo.

No caso do milho, quando as plantas foram cultivadas no nível de 1.6 mM de  $N Q^-$ , esses resultados mostram que as linhagens utilizadas nesse experimento não são diferentes entre si, tomando-se como critério de separação a atividade da PEP-case ou da GS. Entretanto, a diferenciação entre essas linhagens foi possível no nível mais alto de  $NO_3^-$ , tanto pela atividade da GS quanto pela da PEP-case. Para o sorgo, cujas cvs são geneticamente mais diferentes entre si do que as linhagens de milho, a separação entre material eficiente e ineficiente foi possível no nível mais alto de  $NO_3^-$ , para a atividade da PEP-case e da GS e, no nível mais baixo de  $NO_3^-$ , para a atividade da PEP-case.

Esses dados mostram que a atividade da GS foi um bom critério para a diferenciação de eficiência de uso de N, tanto no milho quanto no sorgo, quando as plantas foram cultivadas no nível mais alto de  $NO_3^-$ , mas não no nível mais baixo. Existem nas folhas dessas plantas duas isoformas de GS (Yamaya & Oaks, 1988), uma conhecida como GS1, a qual está presente no citosol e a outra, GS2, presente nos cloroplastos, mas a determinação da atividade de cada uma dessas isoformas não é possível em extratos crus, como no caso desse experimento. Aparentemente, o papel da GS2 é assimilar o amônio gerado a partir da redução do nitrato ou liberado durante o processo de

fotorrespiração da glicina (Blackwell et al., 1990), enquanto altos níveis de atividade de GS1 são observados em resposta ao acúmulo de amônio, devido ao processo de degradação de proteínas, em plantas senescentes (Kawakami & Watanabe, 1988; Sakakibara et al., 1992), ou com deficiência de N (Purcino et al., 1992).

**TABELA 1-** Atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP-case,  $mmoles\ kg^{-1}\ min^{-1}$  de  $CO_2$ ) e da glutamina sintetase (GS,  $mmoles\ kg^{-1}\ min^{-1}$  de glutamina) em genótipos de milho e sorgo, contrastantes na eficiência de uso de N, cultivados sob dois níveis de N.

Genótipos	PEP-case		GS	
	1.6 mM	16 mM	1.6mM	16 mM
	$NO_3^-$	$NO_3^-$	$NO_3^-$	$NO_3^-$
<b>MILHO</b>				
Sintético Elite 1	42 Ba	121 Aa	138 Ba	191 Aa
Sintético Elite 2	54 Aa	72 Ab	129 Aa	133 Ab
<b>SORGO</b>				
8701016	98 Ba	266 Aa	38 Ba	58Aa
9109065	67 Bb	164 Ab	31 Aa	39Ab

Em cada espécie, médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de F ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam médias na mesma linha e letras minúsculas na mesma coluna.

A atividade da GS não foi um critério adequado para separar os materiais eficientes dos ineficientes no nível de 1.6 mM de  $NO_3^-$  e, provavelmente, isso aconteceu porque nos materiais menos eficientes, a atividade da GS1 tenha aumentado em função do estresse causado pela deficiência desse nutriente, compensando uma diminuição na atividade da GS2 e, essa modificação da relação GS1/GS2 não é possível de ser observada pela medição da atividade dessas isoformas em extratos crus. No nível de 16 mM de  $NO_3^-$ , onde as plantas não estavam estressadas, deve ter havido um aumento na atividade biossintética (Huber et al., 1989) da GS2, permitindo a separação dos materiais eficientes dos menos eficientes. Nesse nível de  $NO_3^-$ , o conteúdo de GS2 é sempre maior que o de GS1 (Purcino et al., 1992).

A separação e quantificação dessas isoformas de GS é possível de ser feita, mas como envolve metodologias mais complexas, trabalhosas e caras, sua utilização em um programa para seleção de materiais com maior EUN é pouco prática.

No sorgo, a atividade da PEP-case permitiu separar os materiais eficientes dos menos eficientes nos dois níveis de fornecimento de N. Duas isoformas de PEP-case já foram identificadas (Jiao & Chollet, 1992), uma encontrada em folhas iluminadas e outra em folhas mantidas no escuro, mas uma possível vantagem da PEP-case como critério para diferenciar materiais de

milho e sorgo contrastantes em EUN, advém do fato de que em plantas tipo C<sub>4</sub>, as duas isoformas de PEP-case sempre catalizam uma reação irreversível (Ashton et al., 1990), ou seja, a carboxilação do fosfoenolpiruvato para oxaloacetato.

Novos experimentos estão sendo conduzidos para se determinar a validade desses resultados no campo.

### AGRADECIMENTOS

À Organização dos Estados Americanos (OEA), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e este projeto. Aos assistentes de pesquisa Nilson Machado Lopes e Miguel Reis, pelo apoio técnico na realização das análises laboratoriais.

### REFERÊNCIAS

- ARNON, D.I. & HOAGLAND, D.R. Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients. *Soil Science*, Baltimore, 50:463-485, 1940
- ASHTON, A.R., BURNELL, J.N., FURBANK, R.T., JENKINS, C.L.D. & HATCH, M.D. Enzymes of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Methods in Plant Biochemistry*, New York, 3:39-69, 1990.
- BLACKWELL, R.D., MURRAY, A.J.S. & LEA, P.J. Enzymes of the photorespiratory carbon pathway. *Methods in Plant Biochemistry*, New York, 3:129-144, 1990.
- CACCO, G., SACCOMANI, M. & FERRARI, G. Changes in the uptake and assimilation efficiency for sulfate and nitrate in maize hybrids during the period 1930-1975. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 58:171-174, 1983.
- HUBER, S.C., SUGIYAMA, T. & ALBERTE, R.S. Photosynthetic determinants of growth in maize plants: effects of nitrogen nutrition on growth, carbon fixation and photosynthetic features. *Plant & Cell Physiology*, Kyoto, 3:1063-1072, 1989.
- JIAO, J.A. & CHOLLET, R. Light activation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase activity is inhibited by mesophyll and bundle sheath-directed photosynthesis inhibitors. *Plant Physiology*, Bethesda, 98:152-156, 1992.
- KAWAKAMI, N. & WATANABE, A. Senescence-specific increase in cytosolic glutamine synthetase and its mRNAs in radish cotyledons. *Plant Physiology*, Bethesda, 88:1430-1434, 1988.
- PURCINO, A.A.C., SASAKAWA, H. & SUGIYAMA, T. Enzimas do metabolismo de carbono e N em milho. *Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo 1988-1991*, Sete Lagoas, p.54-56, 1992.
- SAKAKIBARA, H., KAWABATA, S., TAKAHASHI, H., HASE, T. & SUGIYAMA, T. Molecular cloning of the family of glutamine synthetase genes from maize: expression of genes for glutamine synthetase and ferredoxin-glutamate synthase in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Plant & Cell Physiology*, Kyoto, 33:49-58, 1992.
- STEWART, G.R. & RHODES, D. A comparison of the characteristics of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase from *Lemna minor* L. *New Phytology*, Cambridge, 79:257-268, 1977.
- UEDAN, K. & SUGIYAMA, T. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiology*, Bethesda, 57:906-910, 1976.
- YAMAYA, T. & OAKS, A. Distribution of two isoforms of glutamine synthetase in bundle sheath and mesophyll cells of corn. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 72:23-28, 1988.