

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE EM MIL-FOLHAS (*Achillea millefolium* L.) SUBMETIDA A NÍVEIS DE SOMBREAMENTO E CULTIVADA SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO

LIMA, Milene Conceição¹; DURIGON, Marcel²; SCHNEIDER, Lea²; SERPA, Rosana³; GALHO, Valdecy M.⁴; MARIOT, Márcio P.⁵; AMARANTE, Luciano do²

¹ Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal – DB – IB – UFPel

² Departamento de Bioquímica – IQG – UFPel

³ Departamento de Microbiologia – CCB – UEL

⁴ Escola de Ciências Ambientais – ECA – UCPel

⁵ Conjunto Agrotécnico “Visconde da Graça” – CAVG – UFPel

Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – Pelotas/RS – CEP 96010-900.

E-mail: mcl_bio@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A enzima glutamina sintetase (EC 6.3.1.2) está presente em todos os tecidos vegetais. Apresenta massa molecular de 350-400 KDa e alta afinidade pelo íon amônio (LEA, 1993).

Em plantas superiores, esta enzima está envolvida na transformação de nitrogênio inorgânico em formas orgânicas assimiláveis, catalisando a condensação ATP-dependente de amônio com glutamato para produzir glutamina, que fornece grupos nitrogenados, diretamente ou via glutamato, para a biossíntese de todos os compostos nitrogenados na planta (FORDE; CULLIMORE, 1989).

Em folhas de plantas superiores foram identificadas dois grupos de isoenzimas de glutamina sintetase, a citosólica (GS₁) e a plastídica (GS₂) (CREN; HIREL, 1999). A proporção de GS₁ e GS₂ pode variar com a espécie, estado de desenvolvimento e condições ambientais (LAM *et al.*, 1996). Na maioria das plantas, a GS₂ é predominante em tecidos clorofilados, sendo localizada no estroma do cloroplasto (PEREIRA *et al.*, 1992).

Estudos prévios demonstraram que a isoenzima GS₂ é indispensável para a reassimilação de amônio liberado do ciclo de nitrogênio da fotorrespiração, processo que pode aumentar quando as plantas crescem sob estresse osmótico e alta intensidade de luz (FUENTES *et al.*, 2001; HOSHIDA *et al.*, 2000).

Com base nesses fatores, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da enzima glutamina sintetase na espécie *Achillea millefolium* L. submetida a níveis de sombreamento e cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Mudas de mil-folhas cultivadas em estufa foram transferidas para o campo experimental do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça/CAVG/UFPel. As plantas

foram cultivadas sob três doses de nitrogênio (0, 75 e 150 kg uréia ha⁻¹) durante cinco meses e aos 56 dias que antecederam a coleta, foram submetidas a dois níveis de sombreamento: 0% (luz plena) e 75% (sombrite 75%).

Adotou-se o delineamento experimental de blocos inteiramente casualizados em esquema fatorial 3 x 2 (doses de nitrogênio e níveis de sombreamento) com quatro repetições e a unidade experimental consistiu de dez plantas.

A coleta dos tecidos foliares e radiculares foi realizada em dia ensolarado às 9 horas da manhã. As amostras foram imediatamente acondicionadas em gelo e levadas para o Laboratório de Bioquímica Vegetal do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pelotas/UFPel, no qual executou-se a extração da glutamina sintetase segundo Cullimore *et al.* (1983) e a dosagem da atividade, por meio do ensaio semi-biossintético conforme Cullimore *et al.* (1982), utilizando-se hidroxilamina como substrato alternativo ao NH₄⁺, registrado-se nesse caso a formação de γ -glutamil hidroxamato, produto da reação.

Amostras de 2 g de folhas e raízes foram maceradas em almofariz com N₂ líquido. A homogeneização das amostras foi realizada com 7 mL de tampão de extração tris (pH 7,8) e 20% de PVPP. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 x g por 20 minutos a 4°C. Uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante foi dessalinizada em coluna Sephadex G-25 e o extrato obtido foi utilizado como fonte enzimática.

Os ensaios foram realizados em tubos contendo glutamato 100 mM, hidroxilamina 80 mM, ATP 80 mM, MgCl₂ 160 mM, tris-Cl 100 mM com pH 7,8 e extrato enzimático em volume final de 2,1 mL.

A reação foi iniciada pela adição do extrato ao meio de reação pré-incubado a 30°C, seguida de agitação dos tubos. Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 500 μ L nos tempos 20, 40 e 60 minutos e misturadas, em tubos eppendorf, a 600 μ L de reagente paralisante para interromper a reação (FERGUSON; SIMS, 1971). Em seguida, realizou-se a centrifugação a 14.000 x g durante 5 minutos, a temperatura ambiente, para a remoção das proteínas. Os tubos utilizados como controle incluíam o extrato e todos os reagentes do meio de reação, exceto o ATP.

As leituras das absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 535 nm, utilizando como branco uma mistura de 600 μ L do reagente paralisante e 500 μ L de tampão do ensaio. A quantidade de γ -glutamil hidroxamato produzida foi estimada considerando que 1 μ mol deste produto, gera uma absorvância de 0,34 (MORI, 1981) e a atividade enzimática foi expressa em μ mol g⁻¹ MF h⁻¹.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro, no programa estatístico The SAS System (SAS, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de sombreamento influenciaram a atividade da enzima glutamina sintetase em folhas e raízes de *Achillea millefolium* L., sendo observado redução significativa da atividade da enzima em ambos os órgãos das plantas sombreadas (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade da enzima glutamina sintetase em folhas e raízes de *Achillea millefolium* L., submetida a níveis de sombreamento

Níveis de sombreamento	Atividade da enzima glutamina sintetase (μ mol g ⁻¹ MF h ⁻¹)	
	Folhas	Raízes
Sombrite 75%	4,83 b	1,79 b

Luz plena	10,46 a*	2,88 a
------------------	----------	--------

*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Nos tecidos foliares houve forte efeito estimulatório da luz na atividade da enzima glutamina sintetase. Esse comportamento da atividade enzimática indica a importância da luz na geração de energia para a assimilação do amônio, seja proveniente da redução do nitrato transportado à parte aérea ou daquele proveniente da fotorrespiração. A menor atividade da enzima glutamina sintetase encontrada nas raízes das plantas sombreadas, sugere também a importância da luz na atividade enzimática, o que pode estar relacionado à geração de açúcares via fotossíntese, necessários à produção de energia para assimilação do amônio nos tecidos radiculares.

Os valores obtidos para a atividade da enzima glutamina sintetase em mudas de *Coffea arabica* L. (café) foram maiores nas plantas expostas à radiação solar (100% de luz) em comparação às plantas a meia sombra (50% luz) (NETO, 2005).

As folhas apresentaram atividade superior às raízes, sugerindo ser o sítio preferencial de assimilação de nitrogênio. Grande parte da atividade da glutamina sintetase foliar corresponde à isoenzima cloroplastídica, GS₂, que desempenha um papel fundamental na assimilação do amônio gerado na fotorrespiração (FUENTES *et al.*, 2001). Já a isoenzima citossólica, GS₁, encontra-se em maior concentração nos tecidos radiculares, para auxiliar na mobilização e transporte de nitrogênio na planta (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A atividade da enzima glutamina sintetase foi superior nas folhas em relação às raízes na espécie medicinal *Brugmansia suaveolens* da família Solanaceae (LOPES, 2008), em *Crotalaria juncea* L. da família Fabaceae (MENDONÇA, 2002) e em plantas jovens de seringueira (LEMONS *et al.*, 1999), o que corrobora com os resultados obtidos com *Achillea millefolium* L.

A atividade da enzima glutamina sintetase em folhas de *Achillea millefolium* L. foi influenciada pelas diferentes concentrações de nitrogênio. Houve um aumento significativo da atividade enzimática nos tecidos foliares sob o tratamento com 75 Kg de uréia ha⁻¹ e uma redução na ausência de adubação nitrogenada e na concentração 150 Kg de uréia ha⁻¹ (Tabela 2). Nos tecidos radiculares a atividade da enzima glutamina sintetase não foi influenciada pelas diferentes concentrações de nitrogênio.

Tabela 2. Atividade da enzima glutamina sintetase em folhas e raízes de *Achillea millefolium* L., cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio

Concentrações de N (Kg uréia ha ⁻¹)	Atividade da enzima glutamina sintetase (µmol g ⁻¹ MF h ⁻¹)	
	Folhas	Raízes
0	7,19 b	2,09 a
75	10,05 a*	2,47 a
150	5,70 b	2,44 a

*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

4. CONCLUSÕES

A atividade da enzima glutamina sintetase é maior nas folhas do que em raízes, sugerindo ser os tecidos foliares o sítio preferencial de assimilação de nitrogênio e a luz plena estimula fortemente a atividade dessa enzima nas folhas.

A espécie medicinal *Achillea millefolium* L. possui elevada adaptação à baixa intensidade luminosa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CREN, M.; HIREL, B. Glutamine synthetase in higher plants: regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. **Plant Cell Physiology**, n. 40, p. 1187-1193, 1999.
- CULLIMORE, J. V.; LARA, M.; LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Multiple forms of glutamine synthetase in the plant fraction of *Phaseolus* root nodules. **Israel Journal of Botany**, v.31, p. 155-162, 1982.
- CULLIMORE, J. V.; LARA, M.; LEA, P. J.; MIFLIN. Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of *Phaseolus* root nodules. **Planta**, v. 157, p. 245-253, 1983.
- FERGUSON, A. R.; SIMS, A. P. Inactivation in vivo of glutamine synthetase and NAD-specific glutamate dehydrogenase: Its role in the regulation of glutamine synthesis in yeasts. **Journal of General Microbiology**, v. 69, p. 423-427, 1971.
- FORDE, B. G.; CULLIMORE, J. V. The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. **Plant Molecular and Cell Biology**, v. 5, p. 246-296, 1989.
- FUENTES, S. I.; ALLEN, D. J.; ORTIZ-LOPES, A.; HERNANDEZ, G. Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p.1071-1081, 2001.
- HOSHIDA, A.; TANAKA, Y.; HIBINO, T.; HAYASHI, Y.; TANAKA, A.; TAKABE, T.; TAKABE, T. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. **Plant Molecular Biology**, n. 43, p. 103-111, 2000.
- LAM, H. M.; COSCHIGANO, K.; OLIVEIRA, I.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORRUZZI, G. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Journal Plant Physiology**, v. 47, p. 569-593, 1996.
- LEA, P. J. **Nitrogen metabolism**. IN: Plant Biochemistry and Molecular Biology (Lea, P. J.; Leegood, R. C.) 1ª ed. John Wiley & Sons Ltd. England: Cap. 7; p. 155-180, 1993.
- LEMOS, G. B.; FILHO, N. D.; OLIVEIRA, L. E. M.; PURCINO, A. A. C. Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1999.
- LOPES, M. R. S. **Assimilação e transporte de nitrogênio em *Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht. & J. Presl**. 2008. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.
- MENDONÇA, E. H. M. **Fixação e reações de assimilação de nitrogênio em *Crotalaria juncea* L.** 2002. 86 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- MORI, T. E. S. **Metabolismo do nitrogênio durante a fase do desenvolvimento reprodutivo da soja**. 1981. 94 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- NETO, J. F. A. **Atividades das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em cafeeiro arábica**. 2005. 74 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de concentração Fitotecnia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

PEREIRA, S.; CARVALHO, H.; SUNKEL, C.; SALEMA, R. Immunocytolocalization of glutamine synthetase in mesophyll and phloem of leaves of *Solanum tuberosum* L. **Protoplasma**, v. 167, p. 66-73, 1992.

SAS Institute Inc. **SAS**. Learning Edition, getting started with the SAS Learning Edition, Cary, North Carolina: 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.