

## Expressão das isoformas citossólica e cloroplástica da glutamina sintetase em milhos submetidos a seleção divergente para eficiência de uso de nitrogênio

Antonio A. C. Purcino<sup>(1\*)</sup>, Thales R. Lima<sup>(2)</sup>, Ane C. Pinto<sup>(1)</sup>, N.P. Carneiro<sup>1</sup>, Isabel R. P. de Souza<sup>(1)</sup>, Ivanildo. E. Marriel<sup>(1)</sup>, Sidney N. Parentoni<sup>(1)</sup>, Frederico O.M. Durães<sup>(1)</sup> e Luís J.C.B. Carvalho<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, CEP 35.701-970, Sete Lagoas, MG, <sup>(\*)</sup>corsetti@cnpmc.embrapa.br,

<sup>(2)</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 02372, CEP 70.770-900, Brasília, DF.

### Introdução

Em cereais, a eficiência de uso de nitrogênio (EUN) é definida como a quantidade de grãos produzida pela quantidade de N aplicado como fertilizante, e genótipos eficientes são aqueles mais capazes de absorver, translocar e utilizar o nitrogênio para a produção de grãos. Portanto, o entendimento dos mecanismos genéticos e bioquímicos que controlam esses sistemas pode fornecer aos melhoristas de plantas novas ferramentas que permitam o desenvolvimento de genótipos com alta EUN. Recentemente, várias evidências têm sugerido que a glutamina sintetase (GS) desempenha um papel fundamental na EUN. Em milho, a glutamina sintetase é composta por uma família multigênica, sendo que a isoforma citossólica (GS1) é composta por 5 genes e a isoforma cloroplástica (GS2) por 1 gene. A expressão desses genes é órgão-específica e influenciada pela nutrição nitrogenada (Sakakibara et al 1996), pelo estágio de desenvolvimento das plantas e por estímulos ambientais (Limani et al., 2002). Em milho, QTLs associados com a EUN estão colocalizados com genes que codificam a isoforma citossólica da GS (Hirel et al, 2001) e, em arroz, vários QTLs para conteúdo de GS1 se colocalizaram com QTLs associados com caracteres bioquímicos e fisiológicos envolvidos na reciclagem de N (Obara et al, 2004). Em tabaco, plantas superexpressando a isoforma GS1 produziram maiores áreas foliares e peso de raízes que plantas normais cultivadas sob baixo N, indicando que a manipulação da atividade da GS pode reduzir a necessidade por fertilização com N (Fuentes et al., 2001). O objetivo desse trabalho foi avaliar possíveis padrões de mudanças na atividade ou na expressão das isoformas citossólica e cloroplástica da GS em um grupo de linhagens de milho submetidas a seleção divergente para EUN, e em um grupo de híbridos simples obtidos a partir do cruzamento de 10 linhagens elites em um esquema dialélico completo e selecionados para alta e baixa EUN.

### Materiais e Métodos

A atividade biossintética total e a expressão dos peptídeos GS1 e GS2 em folhas e raízes foram determinados para os genótipos listados na Tabela 1.

Experimentos em casa de vegetação: 5 plantas de genótipos com alta e baixa EUN foram cultivadas em vasos com 1 kg de vermiculita e fertilizados em dias alternados com 200 mL de uma solução de Hoagland preparada para fornecer um nível baixo (0,8 ou 1,6 mM) ou alto (16 mM) de nitrato. Cada combinação nitrogênio x genótipo foi repetida 3 vezes e quando as plantas atingiram 4 folhas, as raízes e folhas foram colhidas e mantidas congeladas até a realização das análises.

Experimento de campo: parcelas de 4 fileiras (4 m x 0,9 m) foram plantadas com 5 plantas/metro. O solo foi adubado com 70 kg/ha P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 40 kg/ha K<sub>2</sub>O e 5 kg/ha Zn e 20 dias após a germinação, tratamentos com zero e 120 kg/ha de nitrato foram estabelecidos. O experimento foi conduzido como blocos casualizados com 3 repetições. Dois dias depois do embonecamento, a segunda folha acima da espiga principal foi colhida e congelada até a realização das análises.

A atividade biossintética total e a expressão dos peptídeos GS1 e GS2 por SDS-PAGE/Western blot foram realizadas como descrito anteriormente (Purcino et al., 1998).

### Resultados e Discussão

No experimento em casa de vegetação, observou-se que a atividade biossintética total dos genótipos com baixa e alta EUN respondeu a nutrição nitrogenada quando as comparações foram feitas em

plantas fertilizadas com 0,8 e 16 mM NO<sup>-3</sup>. Entretanto, quando as comparações foram feitas entre plantas que receberam 1,6 e 16 mM NO<sup>-3</sup>, somente genótipos com alta EUN continuaram a responder à nutrição nitrogenada (Tabela 2). Portanto, esses dados sugerem que em genótipos com baixa EUN, a atividade biossintética da GS não responde a níveis de nitrato acima de 1,6 mM, fato observado somente para os genótipos com alta EUN. Por outro lado, a atividade biossintética total nas raízes não diferiu entre genótipos que receberam 0,8 e 16 mM NO<sup>-3</sup>, independente da classificação para EUN dos genótipos testados. No experimento de campo, a atividade biossintética total em alguns genótipos aumentou em função dos níveis de nitrato, mas isso ocorreu independente da classificação desses quanto a EUN (Tabela 3). Portanto, os dados apresentados nas Tabelas 2 e 3 sugerem que a resposta à nutrição nitrogenada da atividade biossintética da GS nas linhagens utilizadas nesse estudo varia de acordo com o estágio de desenvolvimento das plantas. A análise de expressão dos peptídeos GS1 e GS2 não mostrou um padrão consistente de mudança em função da nutrição nitrogenada entre os genótipos com alta e baixa EUN. Essa constatação está de acordo com observações anteriores indicando que o nível desses peptídeos não é fortemente controlado pelo nível externo de nitrato (Purcino et al., 1998). Por outro lado, existem evidências mostrando que o nitrato externo influencia a expressão individual dos transcritos, e que a ausência de correlação da atividade GS e o conteúdo da proteína GS pode ser devido a uma afinidade diferencial das isoformas da GS pelo nitrato. A observação mais importante desse estudo, foi de que o melhoramento para alta EUN sob baixo e alto nitrato indiretamente levou ao desenvolvimento de linhagens com maior conteúdo de GS1 que GS2. Com exceção da linhagem CMS 28-17.2, esse padrão não foi observado para as linhagens com baixa EUN (Tabela 4). Para as linhagens com maiores teores de GS1 que GS2, a relação GS1:GS2 variou de 1,38 a 2,08, sugerindo que um aumento na relação GS1:GS2 parece ser uma característica importante das linhagens com alta EUN, especialmente sob baixo nitrato. Para os híbridos simples testados nesse trabalho, a EUN parece ser menos influenciada pela relação GS1:GS2. Linhagens e híbridos simples foram utilizados nesse trabalho, porque em culturas de polinização cruzada como o milho, a avaliação de linhagens “per se” permite a identificação de mecanismos de EUN controlados por genes com efeito aditivo, enquanto os híbridos simples permitem a identificação de mecanismos controlados por efeitos aditivos e não aditivos (Hallaer e Miranda Filho, 1998). Os dados reportados nesse trabalho indicam que o aumento do conteúdo da GS1 em relação a GS2 (aumento na relação GS1:GS2), e não o simples aumento na atividade biossintética da GS seja um componente importante da EUN em linhagens de milho, e que se a relação GS1:GS2 pode ser manipulada em linhagens no estágio de 4 folhas, isso sugere que a EUN nesses materiais é controlada por efeitos aditivos, o que pode ter importantes implicações no melhoramento para essa característica.

## Literatura citada

- Fuentes, S.I., D.J. Allen, A. Ortiz-Lopez, G. Hernandez. Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. *J. Exp. Bot.* 2001; 52(358):1071-1081
- Hallaer, A.R., J.B. Miranda Filho. *Quantitative genetics in maize breeding*. Iowa University Press. 1998. 468p
- Hirel, B., P. Bertin, I. Quilleré, W. Bourdoncle, C. Atgnant C. Dellay, A. Gouy, S. Cadiou, C. Retailliau, M. Falque, A. Gallais. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. *Plant Physiol.* 2001; 125: 1258-1270
- Limani, A.M., C. Rouillon, G. Glevarec, A. Gallais, B. Hirel. Genetic and physiological analysis of germination efficiency in maize in relation to nitrogen metabolism reveals the importance of

cytosolic glutamine synthetase. *Plant Physiol.* 2002; 130(4): 1860-1870

Obara, M., T. Sato, S. Sasaki, K. Kashiba, A. Nakano, I Nakamura, T. Ebitrani, M. Yano, T. Yamaya. Identification and characterization of a QTL on chromosome 2 for cytosolic glutamine synthetase content and panicle number in rice. *Theor. Appl. Genet.* 2004; 110(1): 1-11

Purcino, A.A.C., C. Arellano, G.S. Athwal, S.C. Huber. Nitrate effect on carbon and nitrogen assimilating enzymes of maize hybrids representing seven eras of breeding. *Maydica* 1998; 43: 83-94

Sakakibara, H., H. Shimizu, T. Hase, Y. Yamazaki, T. Takao, Y. Shimonishi, T. Sugiyama. Molecular identification and characterization of cytosolic isoforms of glutamine synthetase in maize roots. *J. Biol. Chem.* 1996; 271(47): 29561-29569

Tabela 1 – Genótipos de milho contrastantes para eficiência de uso de nitrogênio usados nesse estudo

<b>Genótipo</b>	<b>Natureza Genética</b>	<b>EUN</b>
CMS 28-7.1	Linhagem	Alta
CMS 28-8.1	Linhagem	Alta
HS 724 x 22	Híbrido simples	Alta
HS 724 x 64	Híbrido simples	Alta
HS 723 x 64	Híbrido simples	Alta
CMS 28-17.2	Linhagem	Baixa
CMS 28-10.2	Linhagem	Baixa
CMS 28-11.1	Linhagem	Baixa
HS 20 x 64	Híbrido simples	Baixa
HS 723 x 11	Híbrido simples	Baixa

Tabela 2 – Atividade da glutamine sintetase em folhas e raízes de genótipos de milho contrastantes em EUN - nmoles GHA g<sup>-1</sup> PF min<sup>-1</sup>. As amostras para análise foram colhidas de plantas cultivadas em casa de vegetação, no estágio de 4 folhas completamente desenvolvidas

	Genótipos com alta EUN				Genótipos com baixa EUN			
<b>Folhas – primeiro experimento</b>								
	CMS 28-7.1	CMS 28-8.1	HS 724 x 22	HS 723 x 64	CMS 28-11.1	CMS 28-10.2	HS 20 x 64	HS 723 x 11
0,8 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	80 Cb*	90 Cb	86Cb	296Aa	79C b	134BC b	164Bb	249A b
16 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	280 BCa	289BCa	242Ca	316ABC a	309BC a	382 A a	285BC a	340 ABa
<b>Folhas – segundo experimento</b>								
1.6 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	223 CDb	290BCb	349ABa	182Db	319ABCa	410Aa	300BCa	248BCDa
16 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	353 Aa	354Aa	334Aa	349Aa	312Aa	397Aa	318Aa	320Aa
<b>Raízes – primeiro experimento</b>								
0,8 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	49 Aa	38 Ca	160 Aa	63 Ca	72 Ca	226A a	89C a	56C b
16 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	64 Ba	75 Ba	102 ABb	57 Ba	96 ABa	142A b	83 ABa	107 ABa

\* Médias seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste de LSD a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas para comparações nas linhas e letras minúsculas para comparações nas colunas.

Tabela 3. Atividade da glutamina sintetase de linhagens de milho contrastantes para EUN cultivadas no campo - nmoles GHA g<sup>-1</sup>PF min<sup>-1</sup>. Utilizou-se a segunda folha acima da espiga principal, colhida 2 dias depois do embonecamento das plantas.

	Linhagens com alta EUN		Linhagens com baixa EUN	
	CMS 28-7.1	CMS 28-8.1	CMS 28-10.2	CMS 28-11.1
0 kg.ha <sup>-1</sup> NO <sub>3</sub>	818 Aa*	1.091 Ab	992 Aa	922 Ab
120 kg.ha <sup>-1</sup> NO <sub>3</sub>	961 Ba	1.463 Aa	1.223 ABa	1.290 ABa

\* Médias seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste de LSD a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas para comparações nas linhas e letras minúsculas para comparações nas colunas.

Tabela 4 – Expressão das isoformas GS1 e GS2 da glutamina sintetase – unidades densitométricas  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína solúvel total - em folhas de linhagens e híbridos simples de milho, contrastantes em EUN, cultivados em casa de vegetação sob dois níveis de nitrato

Genótipos	Conteúdo de GS1 (unidades densitométricas $\mu\text{g}^{-1}$ proteína solúvel total)		Conteúdo de GS2 (unidades densitométricas $\mu\text{g}^{-1}$ proteína solúvel total)		Contraste GS1 x GS2		Relação GS1:GS2	
	0.8mM $\text{NO}_3^-$	16mM $\text{NO}_3^-$	0.8mM $\text{NO}_3^-$	16mM $\text{NO}_3^-$	0.8mM $\text{NO}_3^-$	16mM $\text{NO}_3^-$	0.8mM $\text{NO}_3^-$	16mM $\text{NO}_3^-$
<b>Genótipos com alta EUN</b>								
HS723x64	53.8 a	60.7 a	41.0 b	61.1 a	GS1>GS2 *	ns	1.31	0.99
HS724x22	42.6 a	40.0 a	39.2 a	42.1 a	ns	ns	1.09	0.95
CMS 28-7.1	58.6 a	36.0 b	30.3 a	20.7 a	GS1>GS2 **	GS1>GS2 **	1.92	1.74
CMS 28-8.1	52.4 a	41.7 a	25.2 a	30.3 a	GS1>GS2 **	GS1>GS2 **	2.08	1.38
<b>Genótipos com baixa EUN</b>								
HS 723x11	55.2 a	42.9 a	54.3 a	47.4 a	ns	ns	1.02	0.91
HS 20x64	42,8 a	40.2 a	47.2 a	41.0 a	ns	ns	0.91	0.92
CMS 28-10.2	41.2 a	44.0 a	38.3 a	44.8 a	ns	ns	1.08	0.98
CMS 28-17.2	55.3 a	49.3 a	38.4 a	43.8 a	GS1>GS2 **	ns	1.44	1.13

Para cada genótipo, dentro de cada nível de nitrato, médias seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste de LSD a 5% de probabilidade. Para o contraste GS1 x GS2, \* e \*\* indicam diferenças pelo teste de LSD a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente; ns = não significante.