

## ATIVIDADES DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO NA PLANTA DANINHA *Ipomoea grandifolia*

Isabela de Carvalho Contesoto (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Márcio Shigueaki Mito, Gislaine Cristiane Mantovanelli, Emy Luiza Ishii-Iwamoto (Orientador),  
e-mail: eliiwamoto@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Bioquímica/Maringá,  
PR.

**Área e subárea do conhecimento:** Bioquímica/ Metabolismo e Bioenergética

**Palavras-chave:** planta daninha, nitrito redutase, glutamina sintetase

### Resumo:

Os compostos naturais liberados por plantas de cobertura podem alterar a emergência de plantas daninhas por interferência no metabolismo de nitrogênio. Neste trabalho foram padronizadas as metodologias de avaliação das enzimas nitrato redutase (NR), nitrito redutase (NRi) e da glutamina sintetase (GS) na planta daninha *Ipomoea grandifolia* L. Foram também avaliadas as respostas dessas enzimas ao tratamento com o extrato de uma espécie de cobertura\* (fração acetato de etila, FAE) e de um composto isolado desta fração, o ácido *p*-cumárico. Foi possível avaliar com sucesso as enzimas GS e NRi nas raízes e folhas de *I. grandifolia*. O tratamento com ácido *p*-cumárico inibiu a atividade da GS, mas a FAE foi inativa. As medidas das atividades de enzimas do metabolismo de nitrogênio são uma ferramenta importante para a elucidação do modo de ação de produtos naturais com atividade herbicida.

### Introdução

Plantas de cobertura utilizadas em sistema de plantio direto podem reduzir a emergência das plantas daninhas no campo por meio da liberação de compostos químicos que interferem sobre um processo bioquímico essencial da planta daninha. O nitrogênio (N) é um elemento essencial para as plantas. O nitrato pode ser reduzido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), no citosol, através da enzima nitrato redutase (NR) e, logo a seguir, convertido a amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) no plastídio pela enzima nitrito redutase (NRi). O amônio é, então, incorporado em aminoácidos pelas enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), formando glutamina, glutamato e outros aminoácidos e seus metabólitos. Para investigar se os compostos ativos liberados pelas plantas de cobertura afetam o metabolismo de nitrogênio da planta daninha, neste trabalho foram padronizadas metodologias para avaliação das enzimas NR, NRi e GS na planta daninha *Ipomoea grandifolia* L. Os efeitos de um extrato

isolado de uma espécie de cobertura\* que demonstrou ser ativa na *I. grandifolia* e de um composto isolado desta fração, o ácido p-cumárico, foram também avaliados.

(\* Devido a cláusulas de confidencialidade do convênio UEM/BASF o nome desta espécie não pode ser divulgado.

## Materiais e métodos

**Germinação e crescimento de *I. grandifolia*.** Para o desenvolvimento inicial das plântulas por 96 horas, 50 sementes foram colocadas em gerbox, contendo 10 mL de solução nutritiva. Para o desenvolvimento por 30 dias as sementes foram adicionadas em vasos contendo perlita como substrato (12g/vaso) e diariamente os vasos receberam 10 mL de solução nutritiva (pH 6,0) (Hogland e Arnon, 1950). Para o tratamento, a fração obtida após extração da palhada da planta de cobertura com o solvente acetato de etila (FAE) ou o ácido p-cumárico foram acrescentados ao meio de incubação na concentração de (500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A incubação dos gerboxes ou dos vasos foi feita em uma germinadora com fotoperíodo de 12 horas, a 30 °C, umidade relativa de 60% e fluxo de fótons de 600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

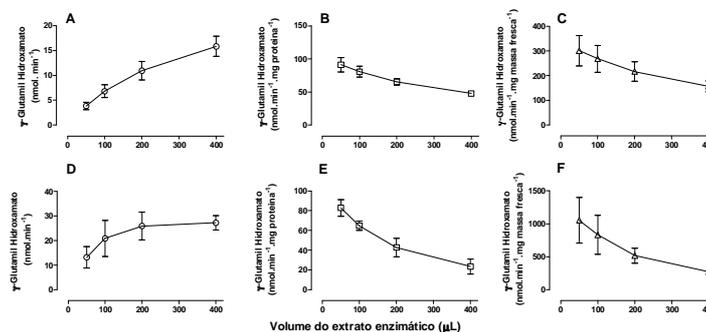
**Obtenção dos extratos enzimáticos das plântulas de *I. grandifolia*.** Para a atividade da RN e RNi, cerca de 1 g de raízes ou folhas foram macerados no meio descrito por Redinbaugh (1981): tampão fosfato 50 mM, cisteína 5 mM e EDTA 0,5 mM (pH 7,5). Para a determinação da atividade da GS o meio de extração continha: tampão imidazol-HCl 50 mM (pH 7,2), DTT 1 mM, EDTA 0,5 mM, Triton X-100 0,1% e mercaptoetanol 5 mM. Após centrifugação, o sobrenadante foi utilizado como fonte das enzimas. A proteína dos extratos foi determinada pelo método de Bradford (1976).

**Determinação da atividade da nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NRi).** A NR foi avaliada no meio de tampão Hepes/fosfato 72 mM/8,5 mM (pH 7,5),  $\text{KNO}_3$  11 mM, NADH 0,5 mM e extrato enzimático (Redinbaugh, 1981). Após 12 min, a 30 °C, a reação foi paralisada pela adição de acetato de zinco 0,5 M e metassulfato de fenazina 0,15 mM (Scholl et al., 1974). Após centrifugação, ao sobrenadante (500  $\mu\text{L}$ ) foi adicionado 250  $\mu\text{L}$  de sulfanilamida (em HCL 1,5 M) e 250  $\mu\text{L}$  de 1-naftil-etilenodiamino-dicloreto 0,02%. A absorbância foi determinada, a 540 nm. A atividade foi expressa pela produção de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) em  $\text{nmol min}^{-1} \text{proteína}^{-1}$  ou massa fresca<sup>-1</sup>. A atividade da NRi foi avaliada em tampão Tris-HCL 50 mM (pH 7,5),  $\text{NaNO}_2$  2mM, metilviologênio 1,5 mM e extrato enzimático (Nagaoka et al., 2014). A reação foi iniciada com  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  21,5 mM. Após 5 min, a 30 °C, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  1 M. Após centrifugação, à uma alíquota do sobrenadante (25  $\mu\text{L}$ ) foi adicionada 250  $\mu\text{L}$  de sulfanilamida em HCL 1,5 M e 250  $\mu\text{L}$  de 1-naftil-etilenodiamino-dicloreto 0,02%. A absorbância foi determinada em 540 nm. A atividade da enzima foi expressa como  $\text{NO}_2^-$  consumido em  $\text{nmol min}^{-1} \text{proteína}^{-1}$  ou massa fresca<sup>-1</sup>.

**Determinação da atividade da glutamina sintetase.** O meio de reação continha tampão Imidazol-HCl 40 mM pH 7,2, MgCl<sub>2</sub> 45 mM, hidroxilamina 5 mM, glutamato 75 mM, ATP 5 mM e extrato enzimático. Após incubação por 40 min, a 30 °C, a reação foi paralisada com solução de CFe<sub>3</sub>. A absorbância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro, a 540 nm. A atividade da enzima foi expressa pela produção de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato em  $\mu\text{mol min}^{-1}$  g de proteínas<sup>-1</sup> ou peso fresco de tecido<sup>-1</sup>.

## Resultados e Discussão

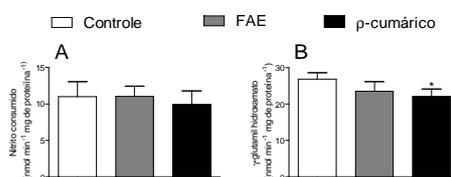
Para cada nova espécie de planta daninha a ser estudada, é essencial atestar se a atividade enzimática medida é diretamente proporcional à quantidade de enzima teoricamente presente no extrato enzimático. Assim foram realizadas curvas de atividade das enzimas em função do volume de extrato enzimático. A partir destes dados os resultados foram expressos em função do conteúdo de proteínas existentes no extrato ou em função do material fresco das partes das plântulas (raiz ou folha). A Figura 1 mostra as curvas de atividade da enzima GS de raízes e folhas de *I. grandifolia* crescida por 30 dias. A velocidade de formação do produto ( $\gamma$ -glutamil hidroxamato) por minuto aumentou gradativamente com o aumento do volume de extrato utilizado (Figuras 1A e D).



**Figura 1** – Atividade da enzima GS de raízes (A, B, C) ou de folhas (D, E, F) de *Ipomoea grandifolia* crescida por 30 dias. A atividade enzimática foi expressa como quantidade de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato formado por minuto (A, D); ou por minuto por mg de proteína (B, E); ou por minuto por mg de massa fresca (C, F). Os valores são média  $\pm$  erro padrão, n=2-4.

Quando os valores foram expresso pela quantidade de proteína (mg) (Figs. 1B e E) ou pela massa fresca (Figs. 1C e F) foram obtidas curvas decrescentes. Este fenômeno pode ser decorrente de perda de sensibilidade das medidas espectrofotométricas. O decréscimo foi mais acentuado em folhas do que em raízes provavelmente devido às dificuldades metodológicas adicionais decorrentes da presença dos pigmentos foliares. Assim, para os ensaios da GS em raízes de *I. grandifolia* crescidas por 30 dias a concentração de proteína deve ser fixada na faixa de 0,040 – 0,100 mg de proteínas e nas folhas de 0,150 – 0,300 mg de proteínas no extrato enzimático. Não foi possível detectar a presença de atividade da NR nas plântulas pelos métodos utilizados. As figuras 2A e 2B mostram que o tratamento da *I. grandifolia*, crescida por 96 horas, com a FAE ou o ácido p-

cumárico não alterou a atividade da NRi, mas o ácido p-cumárico inibiu a atividade da GS.



**Figura 2** – Efeito da FAE e do ácido p-cumárico ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) sobre a atividade das enzimas NRi (A) e GS (B) em raízes de *I. grandifolia* crescidas por 96 horas. Os valores são média  $\pm$  erro padrão,  $n=5-6$ . (\*) Diferença significativa em relação ao controle de acordo com teste t-pareado,  $p \leq 0,05$ .

## Conclusões

Foi possível padronizar com sucesso as metodologias para avaliação das enzimas GS e NRi nas plântulas de *I. grandifolia*. Verificou-se que o ácido p-cumárico inibe a atividade da GS, indicando que uma interferência sobre o metabolismo de nitrogênio pode contribuir para o efeito inibidor da palhada de cobertura estudada sobre a planta daninha *I. grandifolia*.

## Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

## Referências

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The waterculture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, 347, 1950.
- NAGAOKA, S.; HIRASAWA, M.; FUKUSHIMA, K.; TAMURA, G. Methyl viologen-linked nitrite reductase from bean roots. **Agricultural and biological chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1179-1188, 1984.
- REDINBAUGH, M. G.; CAMPBELL, W. H. Purification and characterization of NAD(P)H: nitrate reductase and NADH: nitrate reductase from corn roots. **Plant physiology**, v. 68, n. 1, p. 115-120, 1981.
- SCHOLL, R. L.; HARPER, J. E.; HAGEMAN, R. H. Improvements of the nitrite color development in assays of nitrate reductase by phenazine methosulfate and zinc acetate. **Plant Physiology**, v. 53, n. 6, p. 825-828, 1974.

SODEK, L.; LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Distribution and properties of a potassium-dependent asparaginase isolated from developing seeds of *Pisum sativum* and other plants. **Plant Physiology**, v. 65, p. 22-26, 1980.