

GS e GDH em plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas com diferentes concentrações de nitrogênio

Flávia Maria Kazue Kurita⁽¹⁾ & Vívian Tamaki⁽¹⁾

⁽¹⁾Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Instituto de Botânica, São Paulo, SP.
E-mail para contato: flaviakurita@yahoo.com.br

Resumo: *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms é uma bromélia ameaçada de extinção muito utilizada no paisagismo e é endêmica da Serra dos Órgãos/RJ. Apesar da relevância dessa espécie, inexistem estudos para esta planta sobre as atividades das enzimas glutamina sintetase (GS) e desidrogenase do glutamato (GDH-NADH). Estas enzimas participam no metabolismo do nitrogênio (N) nos vegetais na presença de amônio (NH_4^+), que é uma das principais fontes de N disponível para as plantas no solo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade diurna e noturna da GS e GDH-NADH em plantas de *A. imperialis* cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de N. Plântulas germinadas *in vitro* foram transferidas para meios de cultura com diferentes concentrações de N (5, 15, 30 e 60 mM), e após três meses, as coletas foram realizadas de 4 em 4 horas durante 24 horas após a transferência para novos meios de cultura com as mesmas concentrações citadas acima, que se iniciou às 10h, sendo o fotoperíodo de 12 horas (início às 5h e término às 17h). Os resultados mostraram que o aumento na concentração de N influenciou positivamente nas atividades das duas enzimas estudadas, sugerindo uma eficiência na captação do N disponível.

Palavras-Chave: Bromeliaceae, cultivo *in vitro*, nitrato de amônio

INTRODUÇÃO

Alcantarea imperialis (Carrière) Harms, popularmente conhecida como bromélia imperial (Versieux & Wanderley 2007), é uma espécie endêmica da Serra dos Órgãos, no Estado do Rio de Janeiro e está na lista da flora brasileira ameaçada de extinção na categoria "vulnerável" (Martinelli et al. 2013). Inúmeros exemplares desta espécie são retirados ilegalmente da mata, aumentando a sua vulnerabilidade. Assim, medidas de conservação são importantes, como os estudos sobre propagação com o uso do cultivo *in vitro*.

Um aspecto importante do cultivo *in vitro* é o suprimento mineral do meio de cultura, uma vez que a nutrição mineral é essencial para o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Bunn *et al.* 2011). O nitrogênio (N), segundo Marschner (2012), é o principal componente de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas e coenzimas. Quando em deficiência, o N é translocado das folhas mais velhas, que apresentam clorose para as folhas jovens que apresentam um menor desenvolvimento. As duas principais fontes de nitrogênio encontradas no solo são o nitrato (NO_3^-) e o amônio (NH_4^+) (Jackson & Volk 1995).

O NH_4^+ pode ser incorporado em aminoácidos pela ação da sintetase da glutamina (GS) e desidrogenase do glutamato (GDH-NADH) (Kerbaudy 2008).

O objetivo do trabalho foi de analisar a atividade diurna e noturna da GS e GDH-NADH de *A. imperialis* sob cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3).

MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados no Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Plantas Ornamentais, do Instituto de Botânica, da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. As plântulas obtidas *in vitro* foram depositadas nos tratamentos com meio de Murashige & Skoog (1962-MS) modificado com diferentes concentrações de nitrato de amônio (NH_4NO_3) com 5 mM de N (4,37 mM de NO_3^- e 0,63 de NH_4^+), 15 mM de N (9,37 mM de NO_3^- e 5,63 mM de NH_4^+), 30 mM de N (16,88 mM de NO_3^- e 13,12 mM de NH_4^+) e 60 mM de N (31,88 mM de NO_3^- e 28,12 mM de NH_4^+). Após três meses, foram realizadas coletas de 4 em 4 horas durante 24 horas após a transferência para novos meios de cultura com as mesmas concentrações citadas acima, que se iniciou às 10h, sendo o fotoperíodo de 12 horas (início às 5h e término às 17h).

Extração enzimática

A determinação da atividade da sintetase da glutamina (GS) foi determinada de acordo com o método *in vitro* descrito por Farnden & Robertson (1980) e Pérez-Soba *et al.* (1994), enquanto para a desidrogenase do glutamato dependente de NADH (GDH-NADH) a determinação foi realizada com base no método descrito por Cammaerts & Jacobs (1985).

Para cada um dos tratamentos, foi utilizado 1,0 g de massa fresca foliar proveniente de uma amostra composta de pequenos pedaços de várias plantas (30 plantas por coleta). As amostras foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Esse foi, então, transferido para tubos de centrifugação, previamente resfriados, aos quais foram acrescentados 5,0 mL de uma solução composta por tampão imidazol 0,05M, e ditioneitol (DTT) 5mM. Essas amostras foram submetidas a uma centrifugação de 11.000 rpm a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi mantido a 4°C e utilizado para a determinação das atividades de GS e GDH.

Análise estatística

As médias dos valores obtidos foram submetidas à análise de variância (ANOVA), sendo comparadas pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividades da GS medidas nas folhas de *A. imperialis* cultivadas em 30 e 60 mM de N apresentaram as maiores atividades (Figura 1). A importância de se estudar o ciclo diurno das atividades para se determinar o melhor horário para se realizar o ensaio, fazendo coincidir com o período da máxima atividade das enzimas.

Observou-se pela Figura 1, as maiores atividades da GS em 60 mM de N estavam no período com presença de luz, isto pode estar relacionado com a redução do nitrato (Sodek 2004), que nestas plantas também aumentaram neste período de coleta.

Em relação às atividades da GDH, as maiores médias foram medidas nas folhas de *A. imperialis* cultivadas na concentração de 60 mM de N (Figura 2). Este aumento pode estar relacionado com a maior disponibilidade de amônio que continha neste meio de cultura, pois o mesmo é substrato para esta a enzima estudada.

Estas altas atividades das enzimas GS e GDH nas maiores concentrações podem estar relacionadas à maior quantidade de amônio

disponível no meio e à presença de enzimas ativas suficientes para assimilar este composto. Assim, esta rápida assimilação do amônio poderia evitar uma intoxicação causada por amônio, que em níveis elevados podem causar danos para as plantas (Taiz & Zeiger 2013).

CONCLUSÕES

Conclui-se que as atividades de GS e GDH são maiores em altas concentrações de N, sugerindo a eficiência da planta em assimilar o amônio.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fapesp (Processo 2011/09116-6) pela concessão da bolsa de doutorado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bunn, E., Turner, S.R. & Dixon, K.W. 2011. Biotechnology for saving rare and threatened florain a biodiversity hotspot. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 47:188-200.

Farnden, K.J.S. & Robertson, J.G. 1980. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogenase. *In: Bergsen, F.J. (ed.). Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation.* John Wiley & Sons Ltd., pp. 279-286.

Jackson, W.A. & Volk, R.J. 1995. Attributes of the nitrogen uptake systems of maize (*Zea mays* L.): maximal suppression by exposure to both nitrate and ammonium. *New Phytologist* 130(3): 327-335.

Kerbaudy, G. 2008. *Fisiologia Vegetal.* 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Marschner, P. 2012. *Mineral nutrition of higher plants.* 2 ed. Academic Press, London.

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Pérez-Soba, M., Stulen, I. & van der Eerden, L.J.M. 1994. Effect of atmospheric ammonia on the nitrogen metabolism of Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles. *Physiologia Plantarum* 90: 629-636

Sodek, L. 2004. Metabolismo do nitrogênio. *In: Kerbaudy, G.B. (ed.). Fisiologia vegetal.* 2 ed. Guanabara Koogan, pp. 65-81.

Taiz, L., Zeiger, E. 2013. *Fisiologia Vegetal.* 5. ed. Porto Alegre, Artmed.

Versieux, L.M. & Wanderley, M.G.L. 2007. Two new species of *Alcantarea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae) from Brazil. *Brittonia* 59: 57-64.

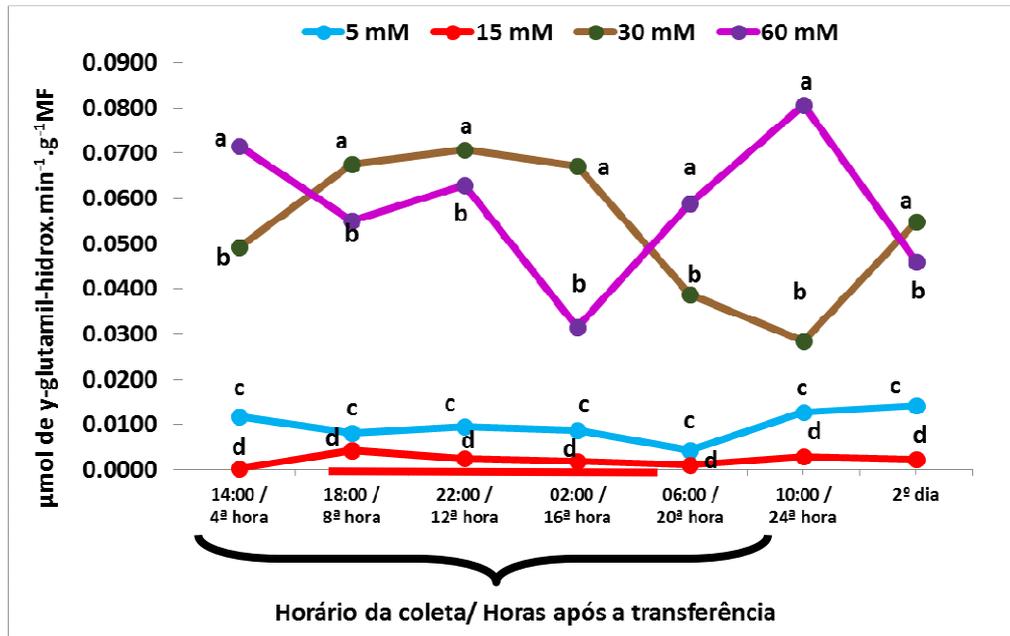


Figura 1. Atividade *in vitro* da sintetase da glutamina (GS) durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) e após 2 dias do início da coleta, nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas por três meses *in vitro* em diferentes concentrações de NH_4NO_3 (5mM-azul; 15mM- vermelho; 30mM- marrom e 60mM- roxo). A barra vermelha indica o período noturno de coleta. A atividade enzimática foi expressa em μmol de γ -glutamyl-hidroxi. $\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}\text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo.

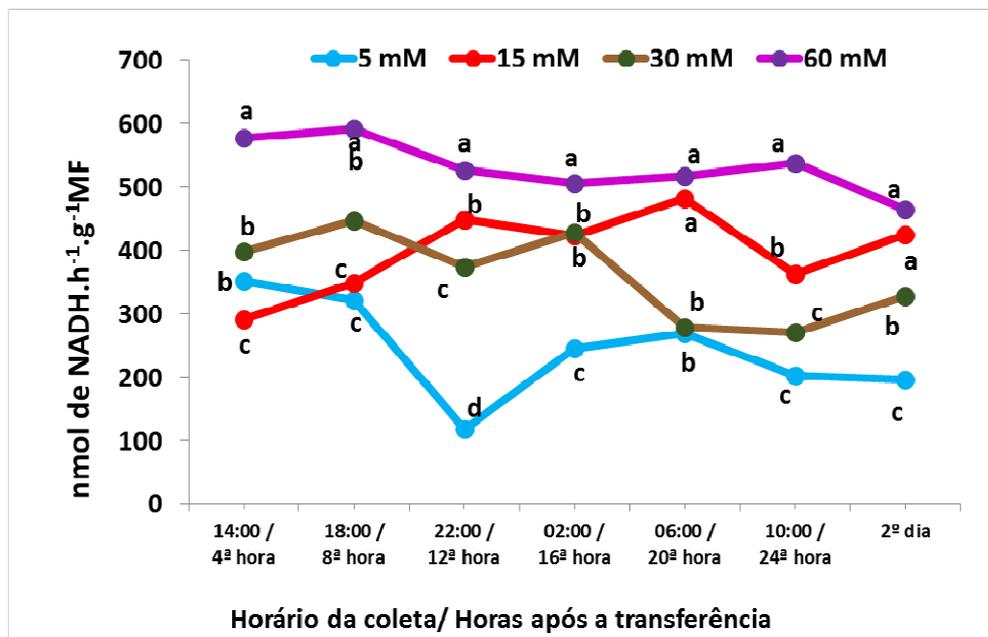


Figura 2. Atividade *in vitro* da desidrogenase do glutamato (GDH-NADH) durante o ciclo diurno e noturno (24 horas) e após 2 dias do início da coleta, nas folhas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms cultivadas por três meses *in vitro* em diferentes concentrações de NH_4NO_3 (5mM-azul; 15mM- vermelho; 30mM- marrom e 60mM- roxo). A barra vermelha indica o período noturno de coleta. A atividade enzimática foi expressa em nmol de $\text{NADH}.\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}\text{MF}$. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas em 5% de probabilidade pelo teste Tukey dentro de um mesmo tempo.

