

EFEITO DA DEFICIÊNCIA DE POTÁSSIO SOBRE AS ATIVIDADES
DE GLUTAMATO DESIDROGENASE E GLUTAMATO SINTASE EM
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

L.E. Gutierrez*
O.J. Crocomo*
C. Rossi**

RESUMO: Foi estudado o efeito da deficiência de potássio sobre as atividades da glutamato desidrogenase (EC. 1.4.1.2) e glutamato sintase (EC. 2.6.1.53) em folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Os resultados mostraram que a atividade específica da glutamato desidrogenase aumentou nas plantas deficientes em potássio nos dois cultivares estudados. Foi detectada redução na atividade de glutamato sintase nas plantas deficientes em potássio.

Termos para indexação: potássio, glutamato desidrogenase, glutamato sintase, *Phaseolus vulgaris*.

EFFECT OF POTASSIUM DEFICIENCY ON GLUTAMATE
DEHYDROGENASE AND GLUTAMATE SYNTHASE ACTIVITIES
IN BEAN LEAVES (*Phaseolus vulgaris* L.)

ABSTRACT: The effect of potassium deficiency on glutamate dehydrogenase (EC. 1.4.1.2) and glutamate

* Departamento de Química da E.S.A. "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, 13.400 - Piracicaba, SP e CEBTEC/FEALQ.

** Departamento de Bioquímica do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola da UNESP, 18.610 - Botucatu, SP.

synthase (EC. 2.6.1.53) activities in leaves of two cultivars of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) was studied. The results showed an increase of glutamate dehydrogenase and a decrease of glutamate synthase activities in potassium deficient plants of the two cultivars studied.

Index terms: potassium, glutamate dehydrogenase, glutamate synthase, *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUÇÃO

Em plantas deficientes em potássio ocorreu acúmulo de compostos nitrogenados livres como aminoácidos, poliaminas e amônia (EATON, 1952; CROCOMO *et alii*, 1970; BASSO, 1973; SMITH, 1973), visto ser o potássio elemento essencial para a síntese proteica em tecidos vegetais (BOULTER, 1970; PATNAIK *et alii*, 1972). A deficiência em potássio pode provocar alterações nas atividades de enzimas relacionadas com a assimilação do nitrogênio (HARPER & PAULSEN, 1969; CROCOMO & BASSO, 1974) e também aumento na atividade de enzimas da glicólise e ciclo de Krebs (WAKIUCHI *et alii*, 1971) assim como aumento nos teores de açúcares redutores e redução nas concentrações de clorofilas a e b (GUTIERREZ *et alii*, 1978).

A glutamato desidrogenase (GDH) catalisa a reação reversível de formação do ácido glutâmico a partir do ácido alfa-cetoglutárico e amônia, podendo utilizar NAD (E.C. 1.4.1.2) ou NADP (E.C. 1.4.1.4) como cofator (DIXON & WEBB, 1964) enquanto a glutamato sintase (EC. 2.6.1.53) (GOGAT) catalisa a formação do ácido glutâmico a partir da glutamina e do ácido alfa-cetoglutárico, exigindo NAD(P) como cofator (DOUGALL, 1974).

A enzima GDH tem sido encontrada em todos os organismos e tecidos, sendo detectada em folhas (BULEN,

1956), plântulas de ervilha (YAMASAKI & SUZUKI, 1969), raízes (PALICH & JOY, 1971) e cotiledones (KING & WU, 1971). A atividade foi encontrada tanto na fração mitocondrial (KANAMORI *et alii*, 1972) como no citossol (CHOU & SPLITTSTOESSER, 1972).

Durante a assimilação da amônia a GDH desempenha papel importante somente quando a concentração de amônia é elevada (MIFLIN & LEA, 1976). Em *Lemna minor*, RHODES *et alii* (1976) demonstraram que em elevadas concentrações de amônia ocorreu aumento na atividade de GDH e redução na atividade de GOGAT e o oposto foi verificado quando foi baixa a concentração de amônia.

De acordo com DOUGALL (1974) a assimilação do nitrogênio inorgânico em ácido glutâmico não poderia ser realizada pela GDH pois a constante de Michaelis da enzima está em torno de 25mM para amônia (PALICH & JOY, 1971; BARASH *et alii*, 1976) enquanto que o nível de amônia é de 1,6mM em soja e 18,6mM em girassol (WEISSMAN, 1972). Segundo DOUGALL & BLOCH, (1976) a GOGAT é importante no processo de assimilação do nitrogênio porque apresenta um sistema de incorporação para as baixas concentrações de amônia que ocorrem nas plantas.

O objetivo do presente trabalho foi o de estudar o efeito da deficiência de potássio sobre as atividades de GDH e GOGAT em dois cultivares de feijoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Germinação e cultivo das plantas: sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) dos cultivares Goiano Precoce e Rosinha Precoce foram utilizadas para a obtenção de plantas normais e deficientes em potássio. O procedimento foi descrito anteriormente por GUTIERREZ (1977).

Atividade de glutamato desidrogenase (GDH). A enzima foi extraída das folhas normais e deficientes em potássio de acordo com o método de HARPER e PAULSEN

(1969) e o ensaio enzimático realizado de acordo com FAHIEN e COHEN (1970) nas seguintes condições:

Temperatura: 35°C

60 micromoles de ácido alfa-cetoglutárico (pH 8,0)

150 micromoles de cloreto de amônio

30 micromoles de tampão Tris-acetato (pH 8,0)

30 micromoles de EDTA

0,56 micromoles de NADH

extrato enzimático e água até o volume final de 2,8ml.

A reação foi iniciada com a adição de NADH e a velocidade foi calculada a partir do decréscimo da absorção a 340nm em espectrofotômetro Zeiss PM Q II, sendo feitas correções da degradação não enzimática do NADH. A atividade específica é expressa em micromoles de NADH consumido por hora e por miligrama de proteína.

Atividade de glutamato sintase (GOGAT): A enzima foi extraída de folhas de feijoeiro de acordo com método de DOUGALL (1974) e o ensaio enzimático realizado segundo o mesmo autor nas seguintes condições:

Temperatura: 35°C

4 micromoles de L-glutamina (pH 7,5)

4 micromoles de ácido alfa-cetoglutárico (pH 7,5)

2 micromoles de EDTA (pH 7,5)

50 micromoles de tampão Tris-HCl (pH 7,5)

0,7 micromoles de NADH

extrato enzimático e água até o volume final de 2,6ml.

A reação foi iniciada com a adição de NADH. A atividade específica é expressa em micromoles de NADH consumidos por hora e por miligrama de proteína.

Determinação de proteína: A proteína do extrato enzimático foi precipitada com TCA 10%, centrifugada e o precipitado dissolvido em NaOH 0,1N. As determinações foram realizadas segundo método de LOWRY *et alii* (1951) utilizando-se a soroalbumina bovina como padrão.

Análise estatística: Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado segundo PIMENTEL GOMES (1970) com oito repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividades das enzimas GDH e GOGAT de folhas obtidas de plantas normais e deficientes em potássio dos cultivares Goiano Precoce e Rosinha Precoce estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Como pode ser observado na Tabela 1, nas plantas deficientes em potássio foi encontrada maior atividade de GDH nos dois cultivares estudados, sendo que no cultivar Rosinha Precoce houve aumento de cerca de 40% enquanto que no cultivar Goiano Precoce houve um incremento da ordem de 21%. Foi detectada diferença significativa somente para o cultivar Rosinha Precoce.

Na Tabela 2, os resultados mostram que as plantas deficientes em potássio apresentaram redução na atividade de GOGAT nos dois cultivares estudados. No Rosinha Precoce, a redução foi cerca de 45% e no Goiano Precoce foi detectada uma redução da ordem de 42%. Entretanto não foram detectadas diferenças significativas entre plantas normais e deficientes em potássio, provavelmente devido ao elevado coeficiente de variação observado (51,99%).

As plantas deficientes em potássio apresentaram aumento na atividade de GDH e decréscimo na atividade de GOGAT, confirmando observações realizadas por HARPER & PAULSEN (1969) que encontraram aumento na atividade de GDH nas plantas de trigo deficientes em potássio.

A maior atividade de GDH e menor de GOGAT nas plantas deficientes em potássio poderia ser explicada pelo possível maior teor de amônia encontrada nas plantas deficientes em potássio (EATON, 1952), pois é conhecido o fato de que elevadas concentrações de amônia provocaram aumento na atividade de GDH e redução na atividade de GOGAT (MIFLIN & LEA, 1976; RHODES *et alii*, 1976; ROSSI *et alii*, 1980 e 1982). A elevação no teor de amônia em plantas deficientes em potássio poderia ser explicada pela maior atividade da redutase nitrato conforme verificado por GUTIERREZ *et alii* (1978) para o

cultivar Goiano Precoce.

Tabela 1. Atividade específica de GDH em folhas de dois cultivares de feijoeiro normais (N) e deficientes em potássio (-K). (Média de 8 repetições)

Cultivar	N	-K
Rosinha Precoce	2,23	3,12
Goiano Precoce	1,17	1,42
d.m.s. 5% = 0,95		C.V. = 34,24%

Tabela 2. Atividade específica de GOGAT em folhas de dois cultivares de feijoeiro normais (N) e deficientes em potássio (-K). (Média de 8 repetições)

Cultivar	N	-K
Rosinha Precoce	1,08	0,59
Goiano Precoce	0,81	0,47
d.m.s. 5% = 0,53		C.V. = 51,99%

A maior atividade de GDH nas plantas deficientes em potássio poderia explicar o acúmulo de ácido glutâmico e outros aminoácidos que ocorrem nessas plantas (MACLEOD & SUZUKI, 1967).

Está sendo estudado neste laboratório a relação entre os teores de amônia das plantas deficientes em potássio e a atividade das enzimas relacionadas com a assimilação do nitrogênio.

CONCLUSÕES

1. A atividade específica de GDH aumentou nas folhas de dois cultivares de feijoeiro deficientes em potássio.

2. Nas folhas das plantas deficientes em potássio houve redução na atividade específica da GOGAT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARASH, I.; MOR, H.; SADON, T. Isoenzymes of glutamate dehydrogenase from oat leaves: properties and light effect on synthesis. *Plant and Cell Physiology*, Tokyo, 17:493-500, 1976.
- BASSO, L.C. Significado bioquímico da deficiência de potássio na formação de aínas em gergelim (*Sesamum indicum*). Botucatu, 1973. 76p. (Doutorado - Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu).
- BOULTER, D. Protein synthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, Stanford, 21:93-114, 1970.
- BULEN, W.A. The isolation and characterization of glutamic dehydrogenase from corn leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, 62:173-83, 1956.
- CHOU, K. & SPLITTSTOESSER, W.E. Glutamate dehydrogenase from pumpkin cotyledons. Characterization and isoenzymes. *Plant Physiology*, Lancaster, 49: 550-4, 1972.
- CROCOMO, O.J. & BASSO, L.C. Accumulation of putrescine and related amino acids in potassium deficient *Sesamum*. *Phytochemistry*, Oxford, 13:2659-65, 1974.
- CROCOMO, O.J.; BASSO, L.C.; BRASIL, O.G. Formation of N-carbamylputrescine from citrulline in *Sesamum*. *Phytochemistry*, Oxford, 9:537-40, 1970.

- DIXON, M. & WEBB, E.C. *Enzymes*. 2.ed. New York, Academic Press, 1964. 950p.
- DOUGALL, D.K. Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, New York, 58:639-46, 1974.
- DOUGALL, D.K. & BLOCH, J. A survey of the presence of glutamate synthase in plant cell suspension cultures. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 54:2924-7, 1976.
- EATON, S.W. Effects of potassium deficiency on growth and metabolism of sunflower plants. *Botanical Gazette*, Chicago, 114:165-80, 1952.
- FAHIEN, L.A. & COHEN, P.P. L-glutamate dehydrogenase. *Methods in Enzymology*, New York, 17A:839-44, 1970.
- GUTIERREZ, L.E. Atividade de enzimas relacionadas com a assimilação do nitrogênio afetada pela deficiência de potássio e maturidade em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). São Paulo, 1977. 108p. (Doutorado - Instituto de Química/USP).
- GUTIERREZ, L.E.; CROCOMO, O.J.; BASSO, L.C. Efeito da deficiência de potássio sobre alguns aspectos metabólicos em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) *Revista de Agricultura*, Piracicaba, 53(4):209-16, 1978.
- HARPER, J.E. & PAULSEN, G.M. Nitrogen assimilation and protein synthesis in wheat seedlings as affected by mineral nutrition. I. Macronutrients. *Plant Physiology*, Lancaster, 44:69-74, 1969.
- KANAMORI, T.; KONISHI, S.; TAKAHASHI, E. Inducible, formation of glutamate dehydrogenase in rice plant roots by the assition of ammonia to the media. *Physiologia Plantarum*, Kobenhavn, 26:1-6, 1972.
- KING, J. & WU, W.Y. Partial purification and kinetic properties of glutamic dehydrogenase from soybean cotyledons. *Phytochemistry*, Oxford, 10:915-28, 1971.

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 193: 265-75, 1951.
- MACLEOD, A.B. & SUZUKI, M. Effect of potassium on the content of amino acids in alfafa and orchardgrass grown with NO_3^- and NH_4^+ nitrogen in nutrient solution cultures. *Crop Science*, Madison, 7:599-605, 1967.
- MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*, Oxford, 15: 873-85, 1976.
- PALICH, E. & JOY, K.W. Glutamate dehydrogenase from pea roots: purification and properties of the enzyme. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 49:127-38, 1971.
- PATNAIK, R.; BARKER, A.V.; MAYNARD, D.N. Effect of ammonium and potassium ions on some physiological and biochemical process of excised cucumber cotyledons. *Physiologia Plantarum*, Kobenhavn, 27:32-6, 1972.
- PIMENTEL GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. São Paulo, Nobel, 1970. 430p.
- RHODES, D.; RENDON, G.A.; STEWART, G.R. The regulation of ammonia assimilating enzymes in *Lemna minor*. *Planta*, Berlin, 129:203-10, 1976.
- ROSSI, C.; CROCOMO, O.J.; GUTIERREZ, L.E. Efeito de fontes de nitrogênio na atividade de desidrogenase glutâmica em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Biologica Leopoldensia*, São Leopoldo, 4(2):105-14, 1982.
- ROSSI, C.; GUTIERREZ, L.E.; CROCOMO, O.J. Sintase de glutamato (GOGAT) em plântulas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 32., Rio de Janeiro, 1980. p.855. (Resumos).
- SMITH, T.A. Amine levels in mineral deficient *Hordeum vulgare* leaves. *Phytochemistry*, Oxford, 12:2093-100, 1973.

- WAKIUCHI, N.; MATSUMOTO, H.; TAKAHASHI, E. Changes of some enzymes activities of Cucumber during ammonium toxicity. *Physiologia Plantarum*, Kobenhavn, 24:248-51, 1971.
- WEISSMAN, G.S. Influence of ammonium and nitrate nutrition on enzymatic activity in soybean and sunflower. *Plant Physiology*, Lancaster, 49:138-41, 1972.
- YAMASAKI, K. & SUZUKI, Y. Some properties of glutamate dehydrogenase from pea seedlings. *Phytochemistry*, Oxford, 8:963-9, 1969.

Recebido para publicação em: 29/03/89

Aprovado para publicação em: 12/06/89