

IDENTIFICAÇÃO *in vivo* DE UM PONTO DE CONTROLE NA SÍNTESE DO AMIDO EM MILHO NORMAL¹

FELICIANO E.V. FLORES² e MICHAEL DESMOND DAVIES³

SINOPSE.— Para verificar *in vivo* o efeito do 3-PGA (3-fosfoglicerato ou ácido 3-fosfoglicérico) e do PPI (pirofosfato inorgânico) sobre a atividade da ADPG (adenosina difosfato glicose-pirofosforilase), já demonstrado *in vitro* atuarem como ativador e inibidor, respectivamente, desta enzima, efetuou-se a aplicação de soluções desses dois metabolitos em espigas de milho normal durante o desenvolvimento dos grãos. A análise do conteúdo em açúcares redutores, sacarose e açúcares solúveis, após a maturação dos grãos, parece ter comprovado *in vivo* o comportamento *in vitro* desses dois metabolitos.

No tratamento com 3-PGA o nível da sacarose baixou acentuadamente, assim como o nível dos açúcares solúveis, indicando sua utilização para a síntese do amido, com a velocidade da reação aumentada pela ativação da ADPG-pirofosforilase.

No tratamento com PPI houve aumento do nível dos açúcares redutores, indicando sua não utilização na síntese do amido devido à inibição da ADPG-pirofosforilase, e, também neste tratamento, diminuição do nível da sacarose. A germinação dos grãos ocorrida neste tratamento explicaria a diminuição no nível da sacarose por sua utilização na síntese de poli-holosídeos estruturais e não na síntese do amido.

Os resultados sugerem que 3-PGA e PPI modificam a atividade da ADPG-pirofosforilase e indicam que as conclusões baseadas em estudos *in vitro* parecem ser válidas *in vivo*, comprovando evidências anteriores de que este passo enzimático é um importante ponto de controle na síntese do amido.

Palavras chaves adicionais para índice: 3-PGA (3-fosfoglicerato ou ácido 3-fosfoglicérico), PPI (pirofosfato inorgânico), ADGP-pirofosforilase (adenosina difosfato glicose-pirofosforilase), açúcares redutores, açúcares solúveis, sacarose.

INTRODUÇÃO

A síntese do amido, assim como da maioria dos glicídios das plantas, depende da formação de precursores denominados nucleotídeo-açúcares ou nucleosídeo-difosfato-açúcares. A síntese destes NDP-açúcares⁴ é catalisada por pirofosforilases específicas que ligam um nucleotídeo-trifosfato a uma ose monofosfatada, produzindo também pirofosfato inorgânico.

Preiss *et al.* (1967) comprovaram a ativação da ADPG-pirofosforilase por 3-PGA, e sua inibição por Pi, em extratos foliares de espinafre. Como parece que as sintetases do amido não são estimuladas por nenhum intermediário glicolítico, aqueles autores sugeriram que o controle da síntese do amido nos cloroplastos deveria dar-se ao nível da ADPG-pirofosforilase. A acumulação de 3-PGA durante a fixação do CO₂ determinaria um aumento na síntese de ADP-glicose por estimulação de sua pirofosforilase e a maior concentração de ADP-glicose causaria uma velocidade maior na síntese do amido.

Dickinson e Preiss (1969) comprovaram semelhante ativação e inibição da ADPG-pirofosforilase em homogeneizados de endosperma de milho.

Para Amir *et al.* (1971), estudando a conversão sacarose-amido no milho doce, o controle da síntese do amido no endosperma do milho se daria também ao nível da ADPG-pirofosforilase, porém, a regulação da sua atividade seria devida ao PPI formado, atuando como produto final inibidor. Este controle seria possível graças à baixa atividade da pirofosfatase inorgânica no endosperma do milho em relação à sua atividade nos tecidos foliares (Simmons & Butler 1969).

No presente trabalho procurou-se observar o efeito *in vivo* de tratamentos com 3-PGA e PPI sobre os níveis de açúcar no milho normal tentando identificar, ao nível de ADPG-pirofosforilase, um provável ponto de controle na síntese do amido durante a fase de desenvolvimento dos grãos.

MATERIAL E MÉTODOS

Tratamentos e amostragem

Foram usadas trinta plantas de milho normal (IAC HMd 7974) desenvolvidas em vaso, em casa de vegetação, e polinizadas manualmente. Dez delas foram tratadas com 3-PGA (3-fosfoglicerato de bário) e outras dez com PPI (pirofosfato de sódio). As dez plantas restantes serviram de controle.

Após o secamento dos estiletes, 10 ml diários das soluções, ambas a 5 mM, foram aplicados nas espigas das

¹ Aceito para publicação em 24 de abril de 1974. Parte da tese submetida pelo 1.º autor à Universidade Federal de Viçosa, MG, como requisito parcial do Curso de Fisiologia Vegetal para obtenção do grau de *Magister Scientiae*.

² Professor Assistente do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

³ Professor Visitante, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

⁴ Abreviações usadas: 3-PGA (3-fosfoglicerato ou ácido 3-fosfoglicérico); PPI (pirofosfato inorgânico); ADPG (adenosina difosfato glicose); NDP (nucleosídeo difosfato); Pi (fosfato inorgânico, ortofosfato); UDPG (uridina difosfato glicose).

plantas correspondentes com uma seringa comum de injeção cujas agulhas tiveram suas pontas em bisel dobradas sobre o orifício para evitar entupimento. Uma agulha foi introduzida na região mediana de cada espiga, perpendicularmente ao seu eixo, até encontrar o tecido frouxo da medula da ráquis, permanecendo aí durante todo o tratamento. Após cada aplicação o orifício externo da agulha era fechado com esparadrapo.

Como as espigas tratadas, colhidas após o amadurecimento, apresentavam características diferentes nas metades superior e inferior, foram retiradas amostras separadas destas duas partes. As amostras, cerca de 40 g de grãos, foram armazenadas em congelador a -10°C , em frascos tampados, até o início das análises.

Extração e análise dos açúcares solúveis

Foi usada, com algumas modificações, a técnica de Tsai *et al.* (1970). As amostras moídas, cerca de 2 g em copos com 25 ml de Etanol 80%, foram colocadas em banho-maria a 60°C por 30 minutos. Este processo foi repetido duas vezes sendo que, após cada período, o álcool extrativo era filtrado para um balão volumétrico de 100 ml e nova quantidade (25 ml) de álcool era adicionada aos copos. Na última extração todo o material era despejado sobre o papel de filtro e o volume do balão completado lavando-se a amostra com a quantidade necessária de Etanol 80% a quente. O peso seco foi determinado pela pesagem das amostras antes da extração alcoólica, em estufa a 60°C por 38 a 40 horas.

Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Nelson (1944). O conteúdo de sacarose foi determinado fazendo-se sua hidrólise com invertase e o açúcar redutor total determinado pelo método citado. A diferença entre o açúcar redutor total e o açúcar redutor determinado anteriormente foi usada como medida do conteúdo de sacarose. Os valores foram sempre calculados em relação a uma curva padrão de glicose mais frutose a $100\ \mu\text{g/ml}$.

Ensaio da atividade de pirofosfatase

Cerca de 4 g de folhas e grãos, previamente picadas e moídas, foram homogeneizadas por 3 minutos, em banho de gelo, com 40 ml de tampão TRIS-Cl 0,1 M a pH 8,5. Os extratos foram centrifugados a 5.000 rpm por 10 minutos, a baixa temperatura, e os sobrenadantes (extratos crus) foram usados para os ensaios sem diluição e nas diluições de 1:1 e 1:3 do tampão extrator. A mistura de reação continha: 2,0 ml de tampão TRIS-Cl 0,01 M a pH 8,3; 0,5 ml de pirofosfato de sódio a 0,012 M; 0,5 ml de sulfato de magnésio a 0,025 M; 0,5 ml de extrato enzimático; volume total: 3,5 ml. No branco o extrato enzimático foi usado em igual volume após mergulho de 5 minutos em banho-maria fervente. A mistura de reação foi incubada por 12 minutos a 37°C , uma alíquota foi retirada e a análise do fosfato inorgânico (ortofosfato) realizada pelo método de Fiske e Subbarow (1925). Os ensaios foram realizados dentro do alcance linear da atividade enzimática em relação ao tempo e à concentração protéica. A análise da proteína foi feita usando o método do Biureto contra uma curva padrão de caseína a $10\ \text{mg/ml}$.

Os reagentes usados tiveram as procedências e características seguintes: pirofosfato de sódio p. a. Merck-

6591; 3-fosfoglicerato de bário NBCo.-4146; invertase de levedura, grau VI, 300 unidades/ml; Sigma Chemical Co. n.º 1-5875; caseína seg. Hammarsten Merck-2242.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeitos externos dos tratamentos

As espigas tratadas com 3-PGA não apresentaram nenhum aspecto externo mais acentuado a não ser uma leve opacidade nos grãos da base em relação aos grãos da ponta.

As espigas tratadas com PPI apresentaram germinação acentuada, principalmente na região próxima ao ponto de aplicação da solução de tratamento (Fig. 1). A metade inferior (base) da espiga apresentou grãos mais inchados e opacos enquanto na parte superior (ponta) os grãos estavam com aspecto normalmente brilhante.

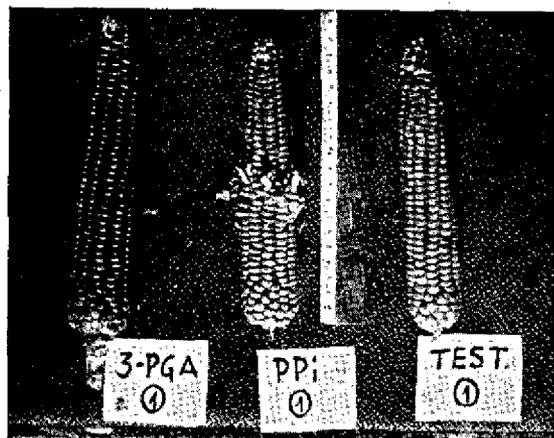


FIG. 1. Aspecto apresentado pelas espigas tratadas (3-PGA e PPI) comparadas com a do controle (Test.).

Efeitos internos dos tratamentos

O Quadro 1 expressa os níveis médios dos açúcares analisados demonstrando que as espigas tratadas apresentaram diferença nos níveis em relação ao controle. Nota-se ainda que os valores encontrados na base e na ponta das espigas diferem marcadamente, o que demonstra uma atuação mais efetiva dos tratamentos na

QUADRO 1. Níveis dos açúcares solúveis no milho normal determinados para a base e a ponta das espigas do controle e dos tratamentos. Dados em mg/g do peso seco das amostras

Tratamentos	Base da espiga			Ponta da espiga		
	Red*	Sac	Total	Red	Sac	Total
Controle	7,8	9,8	17,6	6,7	12,3	19,0
3-PGA	7,8	0,9	8,2	0,5	7,7	14,2
PPI	9,0	1,0	10,0	7,1	9,9	17,0

* Red = açúcares redutores, Sac = sacarose, Total = total em açúcares solúveis.

região da base. Os níveis dos açúcares encontrados nas pontas das espigas tratadas estão bastante próximos daqueles apresentados pelo controle. Parece, então, que não houve boa migração das substâncias aplicadas em direção às pontas das espigas.

Tratamento 3-PGA: se se tomarem por base os mecanismos esquematizados por Tsai *et al.* (1970), e se admitir que a atividade das sintetases do amido ou outras reações não sejam limitantes, conclui-se que uma ativação da ADPG-pirofosforilase deveria determinar um aumento na síntese do amido, consumindo glicose-1-fosfato e baixando o nível dos açúcares em geral. A demanda de glicose-1-fosfato iria, provavelmente, determinar também a degradação da sacarose, passando pela forma de UDP-glicose, por ação da sacarose:UDP-glicosiltransferase e da UDPG-pirofosforilase. A frutose, produzida nesta degradação, poderia também ser utilizada na síntese do amido seguindo sua conversão a glicose-1-fosfato através de uma seqüência de reações envolvendo a hexoquinase, a glicose-fosfato-isomerase e a fosfoglicomutase.

Embora o teor de amido não tenha sido determinado neste estudo, o baixo nível de sacarose obtido para a base das espigas tratadas com 3-PGA parece confirmar este mecanismo. Este resultado parece também sugerir que não há ativação da UDPG-pirofosforilase por 3-PGA, o que determinaria a manutenção de um nível mais elevado de sacarose. Hopper e Dickinson (1972) observaram que 3-PGA não manifesta, realmente, nenhum efeito sobre a atividade *in vitro* da UDPG-pirofosforilase do pólen de *Lilium longiflorum*.

Observando os dados do Quadro 1 verifica-se que o valor total dos açúcares solúveis baixou sensivelmente em relação ao nível do controle, particularmente na base da espiga. A diferença observada seria o resultado da utilização dos açúcares redutores, pela ADPG-pirofosforilase ativada, para a síntese do amido. O nível dos açúcares redutores, permanecendo próximo ao nível observado no controle, estaria indicando que grande parte da sacarose hidrolisada teria sido canalizada para a síntese do amido.

Os resultados obtidos neste tratamento parecem, então, confirmar *in vivo* os resultados conseguidos com estudos *in vitro*, isto é, que 3-PGA manifesta uma ação ativadora sobre a ADPG-pirofosforilase, fazendo-a atuar como um dreno que força a hidrólise da sacarose e baixa o nível geral dos açúcares usando-os para a síntese do amido.

Tratamento PPI: considerando o esquema de Tsai *et al.* (1970), antes citado, uma inibição da ADPG-pirofosforilase por PPI deveria determinar um acúmulo de açúcares redutores e, por desvio da rota no sentido de UDP-glicose, um provável aumento no nível da sacarose. Os resultados obtidos não concordam inteiramente com esta suposição. Embora o nível de açúcares tenha aumentado em cerca de 15% em relação ao controle, o teor de sacarose observado foi tão baixo quanto aquele resultante do tratamento com 3-PGA. No entanto, a

ocorrência não esperada da germinação no tratamento com PPI possibilitou sugerir explicações para os resultados obtidos.

Admitindo a ação inibidora do PPI sobre a ADPG-pirofosforilase, as reservas de amido deveriam ser bastante reduzidas sob este tratamento. A sacarose que, pela germinação, deveria resultar da glicose oriunda da hidrólise daquele amido, seria pouco mais do que aquela proveniente das folhas por translocação. Os açúcares redutores, por outro lado, teriam seu nível aumentado já que o caminho de sua utilização na formação do amido estaria bloqueado. Este nível, no entanto, não seria constatado com grande aumento devido à sua canalização para a formação de UDP-glicose durante a germinação.

Em concordância com isto, enquanto Keys (1963) já havia constatado um rápido aumento no nível de UDP-glicose durante os primeiros dias da germinação do trigo, Tovey e Roberts (1970) observaram, nas mesmas condições, um destacado aumento na atividade da UDPG-pirofosforilase. Tsai *et al.* (1970), por sua vez, detetaram a atividade da UDPG-pirofosforilase também em homogeneizações de endosperma de grãos de milho germinados. O aumento destacado de UDP-glicose durante a germinação dos cereais estaria relacionado com a ativa síntese de poli-holosídios estruturais e com a síntese da sacarose no escutelo (Edelman *et al.* 1959, De Fekete & Cardini 1964).

Ocorrendo, então, uma acentuada redução na formação do amido, por efeito do PPI sobre a ADPG-pirofosforilase, pode-se considerar que os órgãos sob este tratamento permaneceram num estágio inicial de desenvolvimento segundo o esquema de Tsai *et al.* (1970). Conforme estes autores, nessa fase inicial a atividade da sacarose:UDP-glicosiltransferase é muito baixa, em oposição à atividade da invertase que é bem alta. Assim, a UDP-glicose formada não seria utilizada na síntese de sacarose mas seria canalizada principalmente para a formação dos poli-holosídios estruturais nos tecidos embrionários e para o desenvolvimento posterior na germinação.

A ocorrência da germinação sob este tratamento demonstra também, de certa forma, que o PPI, nas concentrações usadas, não atua inibitoriamente sobre a UDPG-pirofosforilase como parece ocorrer com relação à ADPG-pirofosforilase.

Os resultados obtidos permitem, portanto, admitir a ação inibidora do PPI sobre a ADPG-pirofosforilase, bloqueando a formação do amido e aumentando o nível dos açúcares redutores, o que possibilita sua utilização para a germinação.

Estes argumentos parecem não contradizer os resultados obtidos por Amir *et al.* (1971) para o milho doce. No caso dessa variedade de milho o teor da sacarose é naturalmente alto até a colheita, quando então passa a diminuir pela transformação da sacarose para amido. Os autores citados observaram que o tratamento de espigas recém-collidas com PPI consegue manter o alto nível da sacarose por inibição de sua transformação a

amido através de ADP-glicose. Como naquele trabalho não houve germinação, a sacarose não teria sido consumida para a formação de estruturas nem hidrolisada pela invertase, uma vez que os grãos estavam num estágio final de desenvolvimento. Assim, o nível da sacarose permaneceu alto pela interrupção, por ação do PPI sobre a ADPG-pirofosforilase, da rota de formação do amido.

Além disso, no trabalho de Amir *et al.* (1971) observa-se, além da manutenção do nível da sacarose em espigas tratadas com PPI 48 horas antes de colhê-las, um pequeno aumento no nível dos açúcares redutores dentro de 24 horas após a colheita. Embora os autores não tenham dado importância a este resultado, ele está de acordo com a hipótese do aumento no nível dos açúcares redutores devido à interrupção da rota de formação do amido.

Atividade da pirofosfatase inorgânica (E.C. 3.6.1.1)

De acordo com Simmons e Butler (1969), confirmados por Amir *et al.* (1971), a atividade da pirofosfatase inorgânica é muito baixa no endosperma do milho enquanto nos tecidos fotossintetizadores manifesta-se bastante alta.

No presente trabalho foi efetuada também a comparação entre as atividades da pirofosfatase inorgânica em extratos crus de grãos e de folhas do milho, procurando confirmar a possibilidade da atuação, por não sofrer hidrólise completa, do PPI sobre a ADPG-pirofosforilase. O Quadro 2 expressa os resultados desta comparação. Este estudo confirmou os dados dos autores citados indicando uma atividade bem maior da pirofosfatase inorgânica nas folhas do milho em relação à atividade da mesma enzima nos grãos, a qual seria insuficiente para hidrolisar todo o PPI introduzido pelo tratamento.

QUADRO 2. Comparação entre atividades da pirofosfatase inorgânica medida nos extratos crus de folhas e grãos do milho normal

Extrato (origem)	Volume (ml)	Unidades ^a	Proteína (mg/ml)	Ativ. espec. ^b	Unid. Totais ^c
Folha	35	0,162	4,104	0,039	5,67
Grão	33	0,022	19,938	0,001	0,73

^a Uma unidade = 1,0 μ mol do substrato (PPI) hidrolisado por minuto (37°C) por ml do extrato usado.

^b Atividade específica: número de unidades por mg de proteína

^c Unidades totais: unidades x volume.

CONCLUSÕES

O 3-PGA age, *in vivo* tal como *in vitro*, ativando a ADPG-pirofosforilase no sentido da formação do amido. Esta ativação se manifesta pela acentuada diminuição no teor de sacarose e do nível dos açúcares solúveis em geral. A diferença entre os níveis de açúcar solúvel total do tratamento 3-PGA e do controle representaria o amido formado devido à ativação da ADPG-pirofosforilase.

O PPI atua, *in vivo* tal como *in vitro*, inibindo a ADPG-pirofosforilase e bloqueando a rota de formação do amido. Esta inibição se manifesta pelo aumento do nível dos açúcares redutores acompanhado pela germinação dos grãos tratados, e pela manutenção de um baixo nível de sacarose. A germinação observada neste tratamento manteria um baixo nível de sacarose pela utilização dos açúcares redutores dela derivados para a síntese dos poli-holosídios necessários à formação de estruturas.

A ADPG-pirofosforilase situa-se num ponto importante da rota de formação do amido e o controle desta síntese parece depender da atividade daquela enzima. A relação entre as concentrações de 3-PGA, formado na glicólise, e de PPI, atuando como produto final inibidor, poderia ser o principal fator de controle da atividade da ADPG-pirofosforilase e, conseqüentemente, da síntese do amido no endosperma do milho.

A baixa atividade da Pirofosfatase inorgânica observada nos grãos do milho parece permitir que o PPI reprima a velocidade de síntese do amido.

A UDPG-pirofosforilase demonstra, *in vivo*, não sofrer ativação por 3-PGA nem inibição por PPI nas concentrações usadas.

REFERÊNCIAS

- Amir, J., Wright, R.D. & Cherry, J.H. 1971. Chemical control of sucrose conversion to polysaccharides in sweet corn after harvest. *J.agric. Food Chem.* 19(5):954-957.
- De Fekete, M.A.R. & Cardini, C.E. 1964. Mechanism of glucose transfer from sucrose into the starch granule of sweet corn. *Archs Biochem. Biophys.* 104:173-184.
- Dickinson, D.B. & Preiss, J. 1969. ADP-glucose pyrophosphorylase from maize endosperm. *Archs Biochem. Biophys.* 130: 119-128.
- Edelman, J., Shibko, S.I. & Keys, A.J. 1959. The role of the scutellum of cereal seedlings in the synthesis and transport of sucrose. *J.exp.Bot.* 10:178-189.
- Fiske, C.H. & Subbarow, Y. 1965. The colorimetric determination of phosphorous. *J. biol. Chem.* 66:375-400.
- Hopper, J.E. & Dickinson, D.B. 1972. Partial purification and sugar nucleotide inhibition of UDP-glucose pyrophosphorylase from *Lilium longiflorum* pollen. *Archs Biochem. Biophys.* 148:523-535.
- Keys, A.J. 1963. Some observation on the isolation and estimation of the soluble nucleotides of wheat seedlings. *J.exp. Bot.* 14:14.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. biol. Chem.* 153: 375-380.
- Preiss, J., Ghosh, H.P. & Wittkop, P. 1967. Regulation of the biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts. *Biochem. Chloroplast* 2:131-153.
- Simmons, S. & Butler, L.G. 1969. Alkaline inorganic pyrophosphatase of maize leaves. *Biochim.biophys.Acta* 172(1):150-157.
- Tovey, K.C. & Roberts, R.M. 1970. Studies on the pyrophosphorylase of wheat. *Pl.Physiol., Lancaster*, 46:406-411.
- Tsai, C.T., Salamini, F. & Nelson, O.E. 1970. Enzymes of carbohydrate metabolism in the developing endosperm of maize. *Pl.Physiol., Lancaster*, 46:299-306.

ABSTRACT.- Flores, F.E.V.; Davies, M.D. [*Identification of an "in vivo" control point in the synthesis of starch in starchy-corn*]. Identificação *in vivo* de um ponto de controle na síntese do amido em milho normal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia* (1974) 9, 159-163 [Pt, en] Univ. Fed. do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

The effect of 3-phosphoglycerate and inorganic pyrophosphate, known activator and inhibitor from *in vitro* studies of the enzyme ADPG-pyrophosphorylase, was determined *in vivo* using starchy-corn. The results suggest that above metabolites do modify the activity of the ADPG-pyrophosphorylase, and indicate that conclusions based on *in vitro* studies do operate *in vivo*, providing further evidence that this enzymatic step is an important control point in starch biosynthesis.

Additional index words: 3-PGA (3-phosphoglycerate or 3-phosphoglyceric acid), PPI (inorganic pyrophosphate), ADPG-pyrophosphorylase (Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase), reducing sugars, soluble sugars, sucrose.