

Efeito do ácido giberélico e diferentes aminoácidos sobre as atividades da sintetase da glutamina e sintase do glutamato e sobre o crescimento de frutos de soja

RONALDO DO NASCIMENTO^{1,3} e PAULO R. MOSQUIM²

(recebido: 30 de outubro de 2002; aceito: 23 de outubro de 2003)

ABSTRACT – (Effect of the gibberellic acid and different aminoacids on the activities of glutamine synthetase and glutamate synthase, and on growth of soybean fruits). The work had as objective to evaluate the effect of different aminoacids and of the gibberellic acid (GA) on the activity of glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT) and the growth of soybean fruits. Immature fruits were cultivated with different paclobutrazol (PBZ) concentrations, inhibitor gibberellin synthesis, which it inhibited the growth of the fruits in up to 80%. In a second stage, the effect of the GA was evaluated on the growth of the soybean fruits cultivated with PBZ. The growth regulator reestablished the growth of the cultivated fruits with 0,034 mM PBZ. However, with 0,85 mM PBZ it was not obtained the same positive effect, indicating a possible level phytotoxic. Following fruits was cultivated during eight days, with glutamine, asparagine or allantoin, with or without GA, after which the enzymatic activities were determined. The enzymes of assimilation of the nitrogen went more active under presence of the allantoin. The GA inhibited the GS activity and it stimulated the of Fd-GOGAT and of NADH-GOGAT. The Fd-GOGAT activity went superior of the NADH-GOGAT, perhaps due to reduced ferredoxin in the cultivated fruits under constant illumination, advent of the photosynthetic. The results indicate that, probably, gibberellins are involved in the growth of immature fruits of soybean and in regulation enzymatic activities of the GS and GOGAT in that fruits.

Key words - aminoacids, gibberellin, growth regulator, nitrogen, paclobutrazol

RESUMO – (Efeito do ácido giberélico e diferentes aminoácidos sobre as atividades da sintetase da glutamina e sintase do glutamato e sobre o crescimento de frutos de soja). O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes aminoácidos e do ácido giberélico (GA) sobre a atividade da glutamina sintetase (GS) e da glutamato sintase (GOGAT) e o crescimento de frutos de soja. Frutos imaturos foram cultivados com diferentes concentrações de paclobutrazol (PBZ), inibidor da biossíntese de giberelinas, o qual inibiu o crescimento dos frutos em até 80%. Em seguida foi avaliado o efeito do GA sobre o crescimento dos frutos de soja cultivados com PBZ. O regulador de crescimento restabeleceu o crescimento dos frutos cultivados com 0,034 mM de PBZ. Entretanto, com 0,85 mM de PBZ não se obteve o mesmo efeito positivo, indicando um possível nível fitotóxico. Posteriormente os frutos foram cultivados durante oito dias com glutamina, asparagina ou alantoina, na presença ou não de GA, após o que determinaram-se as atividades enzimáticas. As enzimas de assimilação do nitrogênio foram mais ativas na presença da alantoina. O GA inibiu a atividade da GS e estimulou as da Fd-GOGAT e da NADH-GOGAT. A atividade da Fd-GOGAT foi superior à da NADH-GOGAT, talvez devido à ferredoxina reduzida presente nos frutos cultivados sob iluminação constante, advinda da atividade fotossintética. Os resultados obtidos permitem concluir que giberelinas, provavelmente, estão envolvidas no crescimento de frutos imaturos de soja e na regulação da atividade das enzimas GS e GOGAT nesses frutos.

Palavras-chave - aminoácidos, giberelina, nitrogênio, paclobutrazol, regulador do crescimento

Introdução

As duas principais formas de nitrogênio absorvidas pelas plantas superiores são o nitrato e o amônio. O nitrato absorvido pelas raízes, pode ser armazenado nos vacúolos, reduzido a amônio ou translocado para a parte

aérea, onde pode ser metabolizado a amônio (Glass *et al.* 2002).

As atividades coordenadas da glutamina sintetase (GS) e da glutamato sintase (GOGAT) possibilitam a assimilação do amônio liberado pela reductase do nitrato. A GS ocupa uma posição central no metabolismo do nitrogênio nas plantas, pois é responsável pela assimilação inicial do amônio. Essa enzima catalisa a incorporação do amônio em glutamato, formando glutamina. A GOGAT, por sua vez, catalisa a transferência reductiva do nitrogênio amida da glutamina para a posição α -ceto do 2-oxoglutarato, o que resulta na formação de duas moléculas de glutamato (Gregerson *et al.* 1993).

1. Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Campus universitário, 96910-900 Pelotas, RS, Brasil.
2. Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Vegetal, Campus universitário, 36571-000 Viçosa, MG, Brasil.
3. Autor para correspondência: ronascim@ufpel.tche.br

O produto da atuação do ciclo GS/GOGAT, o glutamato, pode servir como substrato para a biossíntese de vários metabólitos nitrogenados, os quais são precursores de proteínas e ácidos nucleicos (Schuller *et al.* 1986).

Devido à importância da GS e GOGAT na assimilação do nitrogênio nas plantas, Rhodes *et al.* (1975) destacam o fato de que essas enzimas são controladas por vários mecanismos regulatórios. Peat & Tobin (1996) verificaram em cevada que as atividades dessas enzimas variaram em função da fonte de nitrogênio utilizada. Chanda *et al.* (1998) obtiveram resultados com plântulas de mostarda, mostrando que o ácido giberélico (GA_3) estimulou a atividade da GS na raiz e no coleóptilo e inibiu nos cotilédones. Isso indica que a atividade das enzimas GS e GOGAT pode apresentar algum tipo de regulação hormonal.

Tendo em vista que a síntese da glutamina ocorre via reação da GS e sendo ela o substrato para a GOGAT, a GS desempenharia um papel central no metabolismo do nitrogênio. Há evidências de que a GS poderia estar sujeita a diversos tipos de controles, dentre os quais estão a repressão e ativação em resposta a diferentes aminoácidos e fitormônios (Chanda *et al.* 1998).

As giberelinas são responsáveis por várias funções fisiológicas importantes no desenvolvimento das plantas superiores (Hooley 1994, Lange 1998). Das funções mais conhecidas, destacam-se a mobilização de reserva em sementes de cereais em germinação e a promoção do alongamento do caule em algumas espécies. Dependendo da planta, as giberelinas também podem ser necessárias à expansão foliar, à indução floral, à biossíntese de antocianinas (Stephen *et al.* 1997) e ao desenvolvimento de frutos imaturos (Graebe 1987, Garcia-Martinez *et al.* 1987, Van Huizen *et al.* 1997).

Barendse *et al.* (1986) avaliaram o crescimento de frutos e sementes de *Arabidopsis* deficientes em giberelinas. Eles observaram que essa deficiência não influenciou o crescimento das sementes; no entanto, o crescimento dos frutos foi afetado. Santes *et al.* (1995) observaram que as giberelinas estão envolvidas no crescimento de frutos de ervilha.

Tendo em vista a importância das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase para o metabolismo do nitrogênio, processo fundamental para o acúmulo de proteínas em sementes de soja, e da escassez de informações sobre os mecanismos de controle da atividade dessas enzimas durante o crescimento inicial de frutos de soja, neste trabalho procurou-se avaliar o efeito do ácido giberélico e de diferentes aminoácidos

sobre a atividade da glutamina sintetase e glutamato sintase e sobre o crescimento de frutos imaturos de soja.

Material e métodos

Sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill cv. UFV 16], fornecidas pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, foram semeadas em vasos de polietileno com capacidade para três litros, contendo areia lavada. As plântulas obtidas foram mantidas em casa de vegetação sob condições naturais de temperatura, umidade relativa e luminosidade durante o período de outubro de 1997 a dezembro de 1998.

Quando as plântulas apresentavam o primeiro trifólio completamente expandido, procedeu-se a um desbaste, deixando-se apenas duas por vaso. Essas foram irrigadas, sempre que necessário, com água e, três vezes por semana, foram aplicados 250 mL de uma solução nutritiva completa de Hoagland (Hoagland & Arnon 1938). As plantas permaneceram nessas condições até que os frutos apresentassem massa fresca aproximada de 50 mg, quando foram transferidas ao laboratório visando à instalação do sistema de cultivo dos frutos de soja em condições semi-assépticas.

O cultivo *in vitro* seguiu a metodologia descrita por Mosquim & Sodek (1991). No laboratório, as plantas foram completamente desfolhadas, retirados os frutos em excesso, deixando-se apenas os frutos com o tamanho adequado ligados à base dos pecíolos. Em seguida os caules foram imersos em bandejas com água destilada sendo cortados segmentos dos caules com 60 mm de comprimento e que continham um fruto. Após rigorosa seleção quanto a homogeneidade dos explantes, os mesmos tiveram suas bases mergulhadas em frascos de vidro com capacidade para 10 mL contendo 6,5 mL dos meios de cultivo em cada frasco.

A cada 48 horas, cerca de 2 mm do segmento de caule foi cortado em sua base para desobstruir algum vaso que poderia estar bloqueado. No quarto dia de cultivo, os meios foram trocados para evitar exaustão de minerais ou substâncias orgânicas.

O meio de cultivo líquido foi preparado segundo Chandler *et al.* (1983), para os macronutrientes, exceto o nitrogênio, e Thompson *et al.* (1977), para os micronutrientes. Os íons acompanhantes do nitrogênio retirados da fórmula original foram adicionados juntamente com outros sais utilizados. Como fontes exclusivas de nitrogênio, utilizou-se glutamina ou asparagina ou alantoína, sempre na concentração final de 85,7 mM de nitrogênio e como fonte de carbono, a sacarose, na concentração de 5%. O pH dos meios de cultivo foi ajustado para 5,0. Os explantes foram mantidos sob irradiância contínua de aproximadamente 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 ± 2 °C.

Numa etapa inicial avaliaram-se o efeito do ácido giberélico e paclobutrazol [(2RS, 3RS)-1-(4-clorofenil)-4,4-

dimetil-2-(1,2,4-triazol-1-il)-pentano-3-ol], um inibidor da biossíntese de giberelinas, sobre o crescimento dos frutos. O paclobutrazol foi utilizado isoladamente nas concentrações de 0 mM; 0,034 mM; 0,170 mM; 0,340 mM; e 0,850 mM. Numa segunda etapa, foi avaliado o efeito da aplicação de ácido giberélico (GA_3) sobre o crescimento dos frutos cultivados com paclobutrazol. Utilizaram-se, então, o paclobutrazol isoladamente nas concentrações de 0,034 mM e 0,85 mM e ácido giberélico em 10^{-4} M, além das combinações entre 0,034 mM e 0,85 mM do inibidor e 10^{-4} M de GA_3 . Nesses experimentos utilizou-se a glutamina como fonte de nitrogênio. Em seguida foram utilizadas as fontes exclusivas de nitrogênio glutamina ou asparagina ou alantoína. Após oito dias de cultivo, determinaram-se o comprimento e a largura dos frutos com um paquímetro. A massa fresca total dos frutos foi determinada em uma balança analítica. Em seguida, os frutos foram transferidos para uma estufa controlada para 75 °C, onde permaneceram até atingir peso constante, para determinação da massa seca. Plantas intactas foram mantidas na casa de vegetação para obtenção de controles, tendo em vista comparações entre o comportamento dos frutos cultivados “in vitro” com frutos cultivados “in situ” nos dias da montagem (controle D0) e desmontagem (controle D8) dos experimentos.

Numa etapa posterior, verificou-se o efeito das três fontes de nitrogênio e do ácido giberélico sobre a atividade das enzimas GS e GOGAT dependente de NADH ou de ferredoxina. Para isso, explantes dos frutos foram cultivados com glutamina ou asparagina ou alantoína, como fontes exclusivas de nitrogênio, com ou sem 10^{-4} M de ácido giberélico. O período de cultivo foi de oito dias, após o qual avaliaram-se as atividades enzimáticas nos frutos sempre no mesmo horário no início da manhã.

Para determinação de todos os ensaios enzimáticos, foi preparado um extrato bruto dos frutos, macerando-os em almofariz com pistilo (previamente resfriados). O meio de extração seguiu a metodologia de Haüssler *et al.* (1994) com algumas modificações, sendo constituído de tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7,8), $MgSO_4$ (2,5 mM), KCl (25 mM), DTT (1 mM), β -mercaptoetanol (1%, v/v), EDTA (0,25 mM), Triton X-100 (0,5%) e glicerol (2%, v/v). Foram utilizados cinco mL de tampão de extração por grama de tecido dos frutos. A temperatura de extração foi mantida entre 0 e 4 °C, utilizando-se banho de gelo. O homogeneizado assim obtido foi centrifugado a 15000 g, durante quinze minutos, a 4 °C. Aliquotas do sobrenadante (50 μ L para a GS, 100 μ L para a Fd-GOGAT e 300 μ L para a NADH-GOGAT) foram imediatamente usadas para as avaliações das atividades enzimáticas.

A atividade da GS foi determinada pela formação de glutamyl-hidroxamato e quantificada com cloreto férrico acidificado. O ensaio foi realizado conforme Rhodes *et al.* (1975), modificado por Tonin (1988) e Junghans & Mosquim (1995).

A atividade da NADH-GOGAT foi quantificada por meio da mensuração do NADH oxidado formado. O ensaio foi

realizado seguindo-se o método proposto por Rhodes *et al.* (1975), modificado por Tonin (1988) e Junghans & Mosquim (1995). Para a determinação da atividade da Fd-GOGAT, metil viologênio reduzido foi usado como substrato (Haüssler *et al.* 1994).

Neste trabalho foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, em que cada explante se constituiu numa repetição. Para as determinações das massas fresca e seca, comprimento e largura, cada tratamento foi composto por seis repetições e para as atividades enzimáticas, quatro repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

O aumento na concentração de paclobutrazol no meio de cultivo acarretou uma redução expressiva no comprimento (figura 1A), na largura (figura 1B) e na produção de massa seca (figura 1C) dos frutos, em relação ao controle sem fitorregulador. A redução mais acentuada ocorreu com a massa seca, que chegou a 80%; o comprimento e largura diminuíram em 64% e 67%, respectivamente, conforme a concentração de PBZ aumentava. Uma possível explicação para esse efeito inibitório seria que o paclobutrazol tenha inibido a enzima oxidase do *ent*-caureno (Garcia-Martinez *et al.* 1987), e, conseqüentemente, as etapas oxidativas do *ent*-caureno a ácido *ent*-caurenóico teriam sido bloqueadas, o que pode ter inibido a biossíntese de giberelinas nos frutos de soja, levando a uma possível diminuição dos seus níveis endógenos e à conseqüente redução do crescimento dos frutos.

Resultados semelhantes foram também observados em frutos jovens de ervilha, por Rodrigo *et al.* (1997) e Garcia-Martinez *et al.* (1987). Foi verificado por esses autores que o GA_3 , uma das giberelinas mais ativas no crescimento dos frutos, teve seus níveis endógenos acentuadamente reduzidos pelo paclobutrazol, e, em conseqüência, o crescimento dos frutos foi drasticamente inibido.

O paclobutrazol na concentração de 0,85 mM, causou inibição no crescimento dos frutos nos primeiros dias após sua aplicação (dados não mostrados). Isso, provavelmente, ocorreu devido a sua fácil translocação até os frutos, uma vez que essa substância é facilmente transportada via xilema (Wang *et al.* 1986, Sterrett 1985).

A figura 2 mostra que a aplicação de GA_3 em frutos de soja sob efeito do paclobutrazol acarretou um crescimento igual ou superior ao controle D8. Quando os explantes foram cultivados com paclobutrazol em maior concentração, ou seja, de

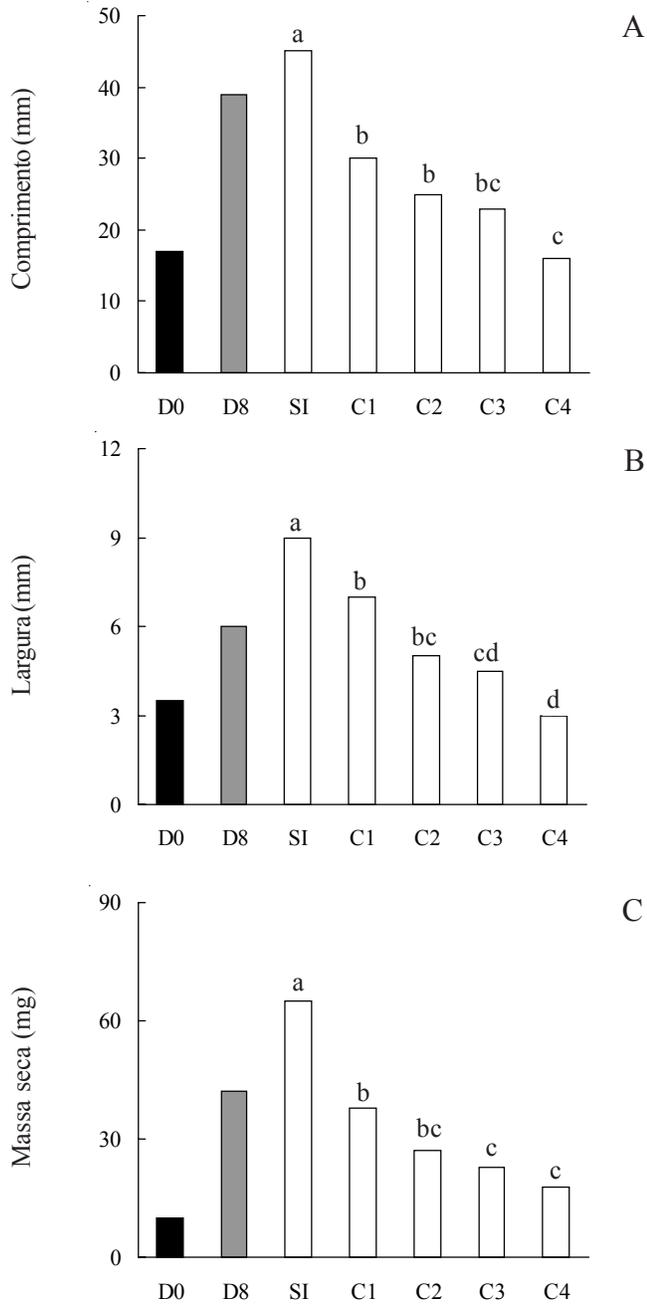


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de paclobutrazol (PBZ) sobre o comprimento (A), largura (B) e produção de massa seca (C) de frutos de soja. D0 (controle dia 0), D8 (controle dia 8), SI (sem PBZ), C1 (PBZ 0,034 mM), C2 (PBZ 0,17 mM), C3 (PBZ 0,34 mM) e C4 (PBZ 0,85 mM). Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Figure 1. Effect of different paclobutrazol (PBZ) concentrations on the length (A), width (B) and dry matter (C) in soybean fruit. D0 (control day 0), D8 (control day 8), SI (without PBZ), C1 (PBZ 0.034 mM), C2 (PBZ 0.17 mM), C3 (PBZ 0.34 mM) e C4 (PBZ 0.85 mM). Means followed by same letters are not significantly different by Tukey test ($P \leq 0.05$).

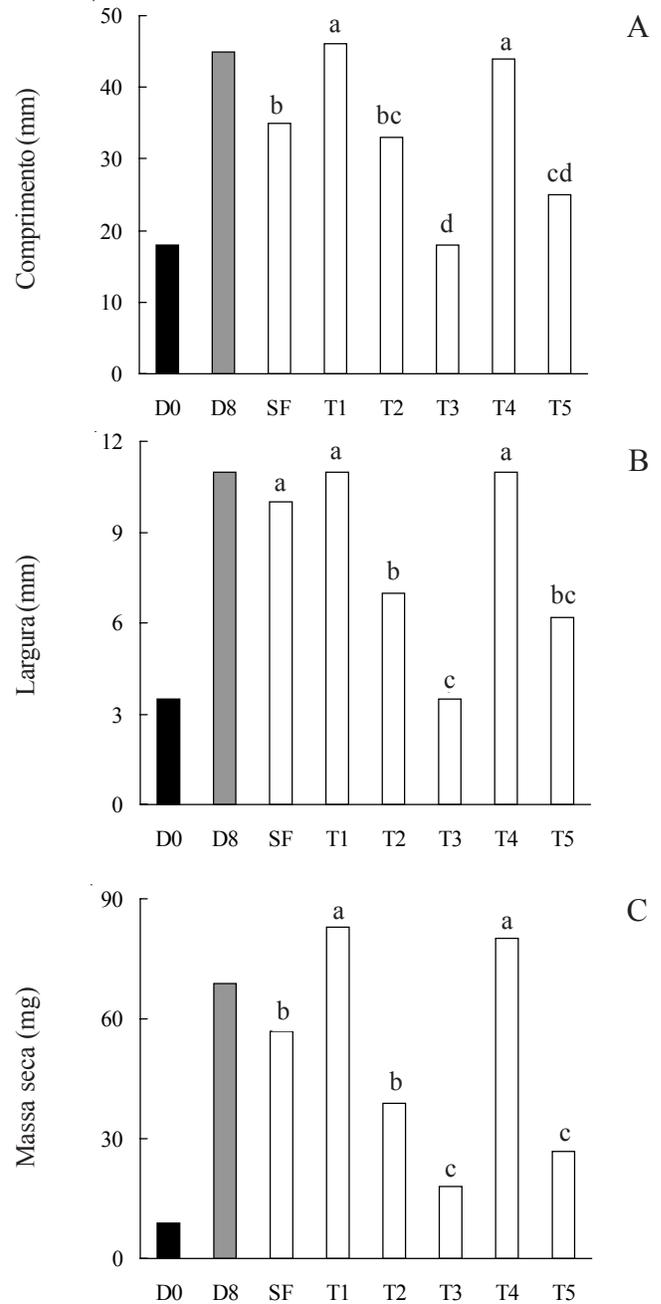


Figura 2. Efeito do paclobutrazol (PBZ) e ácido giberélico (GA_3) sobre o comprimento (A), largura (B) e massa seca (C) de frutos de soja. D0 (controle dia 0), D8 (controle dia 8), SF (sem PBZ e GA_3), T1 (GA_3 10^{-4} M), T2 (PBZ 0,034 mM), T3 (PBZ 0,85 mM), T4 (PBZ 0,034 mM + GA_3 10^{-4} M) e T5 (PBZ 0,85 mM + GA_3 10^{-4} M). Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Figure 3. Effect of the paclobutrazol (PBZ) and gibberellic acid (GA_3) concentrations on the length (A), width (B) and dry matter (C) in soybean fruit. D0 (control day 0), D8 (control day 8), SF (without PBZ and GA_3), T1 (GA_3 10^{-4} M), T2 (PBZ 0.034 mM), T3 (PBZ 0.85 mM), T4 (PBZ 0.034 mM + GA_3 10^{-4} M) and T5 (PBZ 0.85 mM + GA_3 10^{-4} M). Means followed by same letters are not significantly different by Tukey test ($P \leq 0.05$).

0,85 mM, ocorreram diminuições no comprimento (52%), na largura (60%) e no crescimento dos frutos (70%), com base no valor da massa seca, em relação ao controle sem GA₃ e paclobutrazol (figura 2). Comparando esses resultados àqueles obtidos quando os frutos foram tratados apenas com ácido giberélico, verificou-se que as reduções foram de 63%, 64%, e 80%, no comprimento, na largura e na massa seca dos frutos, respectivamente. Percebe-se, portanto que a produção de massa seca dos frutos foi mais afetada pelo paclobutrazol do que a largura e o comprimento. Uma vez que essa substância inibe a produção de giberelinas, possivelmente esse efeito pode ter sido causado pelo menor fluxo de sacarose aos frutos, pois, segundo Weaver *et al.* (1969), as giberelinas promovem um fluxo de nutrientes, dentre os quais, carboidratos, fundamentais para os frutos em crescimento. Isto indica que, possivelmente, as giberelinas endógenas produzidas nos frutos podem não ser suficientes para manter o crescimento, sendo necessário, portanto, o fornecimento de giberelinas de outras partes da planta.

Observa-se ainda na figura 2B que a adição de paclobutrazol no meio de cultivo resultou na inibição da largura dos frutos, comparando-se os tratamentos contendo 0,034 mM e 0,85 mM de paclobutrazol ao tratamento sem paclobutrazol. A inibição foi mais acentuada na presença da maior concentração de paclobutrazol. Quando se aplicou 10⁻⁴ M de GA₃ conjuntamente com 0,034 mM do inibidor da biossíntese de giberelinas, a largura dos frutos foi prontamente restaurada, equiparando-se ao tratamento controle sem o inibidor e ao tratamento com 10⁻⁴ M de GA₃ isoladamente. Isto sugere que as giberelinas estão envolvidas no crescimento de frutos imaturos de soja. A reversão não foi verificada na presença de 0,85 mM de paclobutrazol, indicando que esse pode ter sido um nível fitotóxico para os frutos. Trabalhos semelhantes desenvolvidos por Santes *et al.* (1995) e Garcia-Martinez *et al.* (1997), com frutos de ervilha em fase inicial de desenvolvimento, também demonstraram que o paclobutrazol inibiu o crescimento dos frutos, sendo esse efeito revertido pelo GA₃. Esses autores relataram que o paclobutrazol reduziu acentuadamente o nível de giberelinas nos frutos, afetando seu crescimento.

Em relação ao comprimento (figura 2A) e a produção de massa seca (figura 2C), observou-se o mesmo padrão de comportamento. Na presença de 10⁻⁴ M de GA₃ no meio de cultivo, o paclobutrazol na concentração de 0,85 mM não causou reversão. Isso ocorreu apenas em 0,034 mM de paclobutrazol e em

comparação ao tratamento com 10⁻⁴ M de GA₃ isoladamente.

A adição de glutamina, asparagina ou alantoína ao meio de cultivo promoveu aumento no comprimento dos frutos (figura 3A), em relação ao controle “in vitro” (sem nitrogênio). Entretanto, a fonte de nitrogênio não influenciou o tamanho das vagens, indicando que, para o comprimento dos frutos, no estágio de desenvolvimento utilizado, as fontes nitrogenadas empregadas foram igualmente eficientes. O mesmo padrão de comportamento foi obtido para a largura dos frutos (figura 3B), ou seja, todos os aminoácidos utilizados promoveram o crescimento em largura das vagens.

Todas as fontes de nitrogênio foram efetivas para incrementar o acúmulo de massa seca das vagens. A glutamina e a asparagina proporcionaram as maiores quantidades, seguida da alantoína (figura 3C). Apesar de não haver diferença significativa, a glutamina induziu a um incremento na massa seca dos frutos superior ao da asparagina, o qual alcançou 92%, comparando-se com o crescimento dos legumes cultivados sem nitrogênio. Esses resultados, possivelmente, refletem o comportamento da planta intacta, pois, embora a planta de soja não transporte grandes quantidades de glutamina, esta é a principal fonte de nitrogênio utilizada durante o crescimento dos frutos (Hsu *et al.* 1984). Rainbird *et al.* (1984) verificaram que o crescimento de embrião de soja cultivado “in vitro” é muito lento em meio de cultura suplementado com ureídeos, no entanto, é rápido quando a fonte de nitrogênio utilizada é a glutamina ou a asparagina. A glutamina é a fonte de nitrogênio mais eficiente para o acúmulo de massa seca em cotilédones imaturos de soja, seguida da asparagina e alantoína (Haga & Sodek 1987). Junghans & Mosquim (1995) também verificaram incrementos na massa seca de sementes de soja, empregando asparagina, glutamina e alantoína como fontes de nitrogênio. Em outras espécies, como trigo, na ausência de uma fonte nitrogenada, o acúmulo de massa seca é drasticamente reduzido, podendo inclusive ser nulo (Barlow *et al.* 1983).

A atividade da GS foi sempre superior às atividades da NADH-GOGAT e Fd-GOGAT, independentemente da fonte de nitrogênio e da presença do ácido giberélico (tabela 1). Isso permite sugerir que, no estágio de desenvolvimento utilizado, os frutos estavam incorporando amônio em compostos orgânicos, visto que a GS é considerada a via principal de assimilação desse íon. Segundo Junghans & Mosquim (1995), os quais também verificaram elevada atividade da GS em frutos

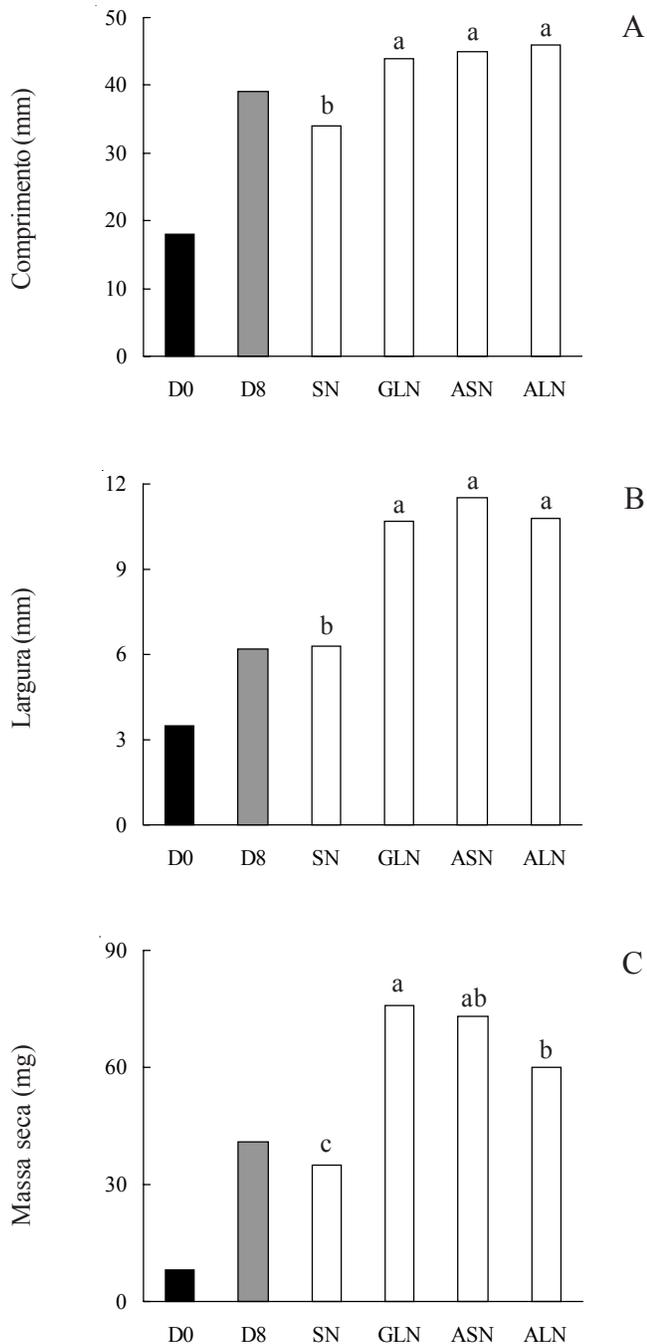


Figura 3. Efeito da glutamina (GLN), asparagina (ASN) e alantoina (ALN) sobre o comprimento (A), a largura (B) e a massa seca (C) de frutos de soja. D0 (controle dia 0), D8 (controle dia 8) e SN (sem nitrogênio). Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Figure 3. Effect of the glutamine (GLN), asparagine (ASN) and allantoin (ALN) on the length (A), width (B) and dry matter (C) in soybean fruit. D0 (control day 0), D8 (control day 8) and SN (without nitrogen). Means followed by same letters are not significantly different by Tukey test ($P \leq 0.05$).

de soja, isso seria decorrente da incorporação inicial do amônio proveniente da degradação da asparagina e alantoina, por meio da ação das enzimas asparaginase e alantoinase, respectivamente. As atividades dessas enzimas foram detectadas em frutos de soja por Gomes & Sodek (1984).

A alantoina induziu as maiores atividades para as três enzimas avaliadas (tabela 1). Isso, provavelmente, ocorreu em função da maior liberação de amônio, pois a alantoina possui quatro átomos de nitrogênio, ao passo que a glutamina e asparagina, apenas dois. Amônio é liberado durante o catabolismo da alantoina, entrando na via de assimilação do nitrogênio, por meio do sistema GS/GOGAT. Verifica-se, portanto, que o ureídeo alantoina foi mais eficiente do que a glutamina e asparagina para a atuação da GS. O produto da atividade dessa enzima, a glutamina, é utilizado como substrato da GOGAT. Assim, as atividades da GS e da GOGAT foram maiores na presença da alantoina nos frutos de soja em fase inicial de desenvolvimento.

O ácido giberélico inibiu a atividade da GS na presença de quaisquer das fontes de nitrogênio orgânicas utilizadas. Isso permite sugerir que, em vagens no início do crescimento, a GS pode ter sua atividade modulada negativamente por aquele regulador de crescimento, na concentração utilizada (10^{-4} M) ou esta concentração pode ter causado a inibição. Alguns experimentos demonstram que os fitormônios influenciam o metabolismo do nitrogênio através de alterações na atividade das enzimas relacionadas, como a nitrato redutase, nitrito redutase, GS e GOGAT. Goupil *et al.* (1997) verificaram que a atividade da nitrato redutase foi maior em meio contendo 10^{-7} M de ácido abscísico. Concentrações superiores inibiram a atividade da enzima.

A atividade da Fd-GOGAT e NADH-GOGAT foi estimulada por GA_3 . Provavelmente, essa giberelina regula a atividade dessas enzimas, estimulando-as. A atividade da Fd-GOGAT foi acentuadamente maior do que da NADH-GOGAT. Nos frutos crescendo sob iluminação ocorre atividade fotossintética, fonte de ferredoxina reduzida, a qual serve como doador de elétrons para a atividade da Fd-GOGAT. Isso, provavelmente, permitiu a maior atividade enzimática da Fd-GOGAT quando em comparação com a atividade da NADH-GOGAT.

Conclui-se, portanto, que giberelinas são, provavelmente, fundamentais para o crescimento de frutos imaturos de soja e estão envolvidas na regulação das atividades das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase nesses frutos.

Tabela 1. Efeitos da glutamina, asparagina e alantoína, quando aplicadas em conjunto com ácido giberélico (+GA) ou na ausência dele (-GA), sobre a atividade da sintetase da glutamina (GS), sintase do glutamato dependente de ferredoxina (Fd-GOGAT) e sintase do glutamato dependente de NADH (NADH-GOGAT). Médias seguidas de uma mesma letra em cada coluna (minúscula) e em cada linha (maiúscula) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Table 1. Effects of the glutamine, asparagine and allantoin, with (+GA) or without (-GA) gibberellic acid, on the activities of glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase dependent of the ferredoxin (Fd-GOGAT) and glutamate synthase dependent of the NADH (NADH-GOGAT). Means followed by the same letter for each column (small letters) and for each row (capital letters) are not significantly different by Tukey test ($P \leq 0.05$).

	GS		Fd-GOGAT		NADH-GOGAT	
	($\mu\text{mol GHA} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}$)		($\mu\text{mol Glu} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}$)		($\mu\text{mol NAD}^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}$)	
	-GA	+GA	-GA	+GA	-GA	+GA
Glutamina	156 Ab	76 Bb	26,5 Bb	38,8 Ab	0,05 Bb	0,08 Ab
Asparagina	108 Ac	71 Bb	22,5 Ac	24,3 Ac	0,04 Bc	0,10 Ab
Alantoína	161 Aa	127 Ba	36,5 Ba	63,5 Aa	0,11 Ba	0,22 Aa

Referências bibliográficas

- BARENDSE, G.W., KEPZYNSKI, J., KARSEN, C.M. & KOORNNEFF, M. 1986. The role of endogenous gibberellins during fruit and seed development: studies on gibberellin-deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 67:315-319.
- BARLOW, E.W.R., DONOVAN, G.R. & LEE, J.W. 1983. Water relations and composition of wheat ears grown in liquid culture: effect of carbon and nitrogen. *Australian Journal of Plant Physiology* 10:99-108.
- CHANDA, S.V., SOOD, C.R., REDDY, V.S. & SINGH, Y.D. 1998. Influence of plant growth regulators on some enzymes of nitrogen assimilation in mustard seedlings. *Journal of Plant Nutrition* 21:1765-1777.
- CHANDLER, P.M., HIGGINS, T.J.V., RANDALL, P.J. & SPENCER, D. 1983. Regulation of legumin levels in developing pea seeds under conditions of sulfur deficiency. *Plant Physiology* 71:47-54.
- GARCIA-MARTINEZ, J.L., LOPEZ-DIAZ, I., SANCHEZ-BELTRAN, M.J., PHILLIPS, A.L., WARD, D.A., GASKIN, P. & HEDDEN, P. 1997. Isolation and transcript analysis of gibberellin 20-oxidase genes in pea and bean in relation to fruit development. *Plant Molecular Biology* 33:1073-1084.
- GARCIA-MARTINEZ, J.L., SPONSEL, V.M. & GASKIN, P. 1987. Gibberellins in developing fruits of *Pisum sativum* cv. Alaska: studies on their role in pod growth and seed development. *Planta* 170:130-137.
- GLASS, A.D.M., BRITTO, D.T., KAISER, B.N., KINGHORN, J.R., KRONZUCKER, H.J., KUMAR, A., OKAMOTO, M., RAWAT, S., SIDDIQI, M.Y., UNKLES, S.E. & VIDMAR, J.J. 2002. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* 53:855-864.
- GOMES, M.A.F. & SODEK, L. 1984. Allantoinase and asparaginase activities in maturing fruits of nodulated and non-nodulated soybeans. *Physiologia Plantarum* 62:105-109.
- GRAEBE, J.E. 1987. Gibberellin biosynthesis and control. *Annual Review of Plant Physiology* 38:419-465.
- GREGERSON, R.G., MILLER, S.S. & TWARY, S.N. 1993. Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. *Plant Cell* 5:215-226.
- HAGA, K.I. & SODEK, L. 1987. Utilization of nitrogen sources by immature soybean. *Annals of Botany* 59:597-601.
- HAÜSSLER, R.E., BLACKWELL, R.D. & LEA, P.J. 1994. Control of photosynthesis in barley leaves with reduced activities of glutamine synthetase or glutamate synthase. I. Plant characteristics and changes in nitrate, ammonium and amino acids. *Planta* 194:406-417.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. *Circular* 347. University of California College of Agriculture, Berkeley.
- HOOLEY, R. 1994. Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Molecular Biology* 26:1529-1555.
- HSU, F.C., BENNET, A.B. & SPANSWICK, R.M. 1984. Concentrations of sucrose and nitrogenous compounds in the apoplast of developing soybean seed coats and embryos. *Plant Physiology* 75:181-186.
- JUNGHANS, T.G. & MOSQUIM, P.R. 1995. Atividade da sintetase da glutamina e sintase do glutamato em explantes de frutos de soja sob diferentes fontes de nitrogênio. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 71:67-74.
- LANGE, T. 1998. Molecular biology of gibberellin synthesis. *Planta* 204:409-419.
- MOSQUIM, P.R. & SODEK, L. 1991. Culture of soybean fruit explants: growth conditions and efficiency of nitrogen sources for reserve protein synthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27:71-76.
- PEAT, L.J. & TOBIN, A.K. 1996. The effect of nitrogen nutrition on the cellular localization of glutamine synthetase isoforms in barley roots. *Plant Physiology* 111:1109-1117.

- RAINBIRD, R.M., THORNE, J.H., HARDY, R.W.F. 1984. Role of amides, aminoacids, and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. *Plant Physiology* 74:329-334.
- RHODES, D., RENDON, G.A., STEWART, G.R. 1975. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. *Planta* 125:201-211.
- RODRIGO, M.J., GARCIA-MARTINEZ, J.L., SANTES, C.M., GASKIN, P. & HEDDEN, P. 1997. The role of gibberellins A₁ and A₃ in fruit growth of *Pisum sativum* L. and the identification of gibberellins A₄ and A₇ in young seeds. *Planta* 201:446-455.
- SANTES, C.M., HEDDEN, P., GASKIN, P. & GARCIA-MARTINEZ, J.L. 1995. Gibberellins and related compounds in young fruits of pea and their relationship to fruit-set. *Phytochemistry* 40:1347-1355.
- SCHRADER, L.E. & THOMAS, R.J. 1981. Nitrate uptake, reduction and transport in the whole plant. *In* Nitrogen and carbon metabolism (J.D. Bewley, ed.). Plenum Press, New York, p.49-93.
- SCHULLER, K.A., DAY, D.A. & GIBSON, A.H. 1986. Enzymes of ammonia assimilation and ureide biosynthesis in soybean nodules: effect of nitrate. *Plant Physiology* 80:646-650.
- STEPHEN, M., SWAIN, J.B.R. & KAMIYA, Y. 1997. Gibberellins are required embryo growth and seed development in pea. *The Plant Journal* 12:1329-1338.
- STERRET, J.P. 1985. Paclobutrazol: a promising growth inhibitor for injection into woody plants. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 110:4-8.
- THOMPSON, J.F., MADISON, J.T. & MUENSTER, A.M.E. 1977. In vitro culture of immature cotyledons of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Annals of Botany* 41:29-39.
- TONIN, G.S. 1988. Influência da fonte de nitrogênio na atividade de enzimas envolvidas no processo de assimilação de amidas e ureídeos em cotilédones imaturos de soja mantidos em cultura. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- VANHUIZEN, R., OZGA, J.A. & REINECKE, D.M. 1997. Seed and hormonal regulation of gibberellins 20-oxidase expression in pea pericarp. *Plant Physiology* 115:123-128.
- WANG, S.Y., SUN, T. & FAUST, M. 1986. Translocation of paclobutrazol, a gibberellin biosynthesis inhibitor, in apple seedling. *Plant Physiology* 82:11-14.
- WEAVER, R.J., SHINDY, W. & KLIEWER, M.W. 1969. Growth regulator induced movement of photosynthetic products into fruits of Black grapes. *Plant Physiology* 44:183-188.