

**ATIVIDADE ESPECÍFICA DAS ENZIMAS DESIDROGENASE  
DE GLUTAMATO, SINTETASE DE GLUTAMINA E SINTASE  
DE GLUTAMATO EM EIXOS EMBRIONÁRIOS DE FEIJOEIRO  
(*Phaseolus vulgaris* L. cv. CARIOCA SH 80) "IN VITRO" EM  
PRESENÇA DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.**

**ENIO TIAGO DE OLIVEIRA**  
**Biólogo**

**Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

**PIRACICABA**  
**Estado de São Paulo - Brasil**  
**Janeiro - 1995**

**ATIVIDADE ESPECÍFICA DAS ENZIMAS DESIDROGENASE  
DE GLUTAMATO, SINTETASE DE GLUTAMINA E SINTASE  
DE GLUTAMATO EM EIXOS EMBRIONÁRIOS DE FEIJOEIRO  
(*Phaseolus vulgaris* L. cv. CARIOCA SH 80) "IN VITRO" EM  
PRESENÇA DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.**

**ENIO TIAGO DE OLIVEIRA**

**Aprovada em 30.03.1995**

**Comissão Julgadora:**

**Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo  
Prof. Dr. Luiz Antonio Gallo  
Prof. Dr. Celso Rossi**

**ESALQ/USP  
ESALQ/USP  
UNESP/Botucatu**

**Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO  
Orientador**



**A minha esposa Joana  
Aos meus filhos Marcele e Tiago**

**Dedico**

**Aos meus pais Jones e Olivia  
Aos meus irmãos Nailda, Alaide, Eliene,  
Dinarte, Ana, Neuda, Wildes e Weldner,  
pelo amplo sentido da palavra FAMÍLIA.**

**Aos meus sogros Francisco e Mathilde**

**Ofereço**

## **AGRADECIMENTOS**

**Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo, pela orientação científica, apoio e encorajamento.**

**Ao Departamento de Química da ESALQ na pessoa do Prof. Dr. José Carlos Alcarde, atual chefe desse Departamento, pela oportunidade dada à realização do Mestrado e, especialmente aos Professores Dr. Luiz Eduardo Gutierrez e Dr. Antonio Roque Dechen.**

**Aos Professores Dr<sup>a</sup> Helaine Carrer, Dr. Luiz Antonio Gallo, Dr. Murilo Melo e Dr<sup>a</sup> Vera Lucia Moretti Romani, pelo apoio, estímulo e amizade.**

**A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Maria de Stefano Piedade pelas orientações nas análises estatísticas.**

**Aos funcionários do Centro de Biotecnologia Agrícola - CEBTEC, Antonio Francisco de Campos Amaral, João Chaddad Junior, Maria Solizete Granziol Silva e Romeu Ap. Rocha, pelos auxílios e companheirismo.**

**As estagiárias Angela de Fátima Furlan, Patricia Pompermayer, Daniela Macedo, Daniela Defávare e Renata de Carvalho Kuerche pelos auxílios técnicos.**

**Ao Instituto Agronômico de Campinas (IAC), na pessoa do**

**Dr. Luiz Fernandes Rasesa** pelo fornecimento de sementes básicas de feijoeiro.

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

A todos aqueles que contribuíram para a execução deste trabalho.

## SUMÁRIO

ITEM	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Características da Desidrogenase de Glutamato (GDH).....	4
2.2. Características da Sintetase de Glutamina (GS)	11
2.3. Características da Sintase de Glutamato (GOGAT).....	19
2.4. Nutrição nitrogenada e as enzimas GDH, GS e GOGAT.....	24
2.4.1. Os efeitos das fontes de nitrogênio sobre a GDH, GS e GOGAT em plantas cultivadas "in vitro".....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Cultivo de eixos embrionários.....	33
3.1.1. Desinfecção dos eixos embrionários.....	33
3.1.2. Meios de cultura.....	34
3.2. Análise do material cultivado.....	38
3.2.1. Determinação do incremento de massa de matéria fresca (IMMF).....	38

3.2.2. Determinação da porcentagem de matéria seca (%MS).....	38
3.2.3. Determinação do teor de nitrogênio total	39
3.2.4. Preparo dos extratos.....	39
3.2.5. Determinação do teor de proteínas solúveis totais.....	40
3.2.6. Determinação da atividade da Desidrogenase de Glutamato (GDH).....	41
3.2.7. Determinação da atividade da Sintase de Glutamato (GOGAT).....	42
3.2.8. Determinação da atividade da Sintetase de Glutamina (GS).....	43
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>44</b>
4.1. Desenvolvimento da cultura.....	45
4.2. %MS, IMMF, %N-total, teores de proteínas solúveis totais, atividade específica da GDH, GS e GOGAT, no tempo zero de cultivo.....	48
4.3. Porcentagem de matéria seca (%MS).....	57
4.4. Incremento de massa de matéria fresca (IMMF).	58
4.5. Teores de Nitrogênio total .....	59
4.6. Teores de proteínas solúveis totais.....	61
4.7. Atividade específica da Desidrogenase de Glutamato (GDH).....	62
4.8. Atividade específica da Sintetase de Glutamina (GS).....	66
4.9. Atividade específica da Sintase de Glutamato (GOGAT).....	69

	ix
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>PÁGINA</b>
<b>1 - Aspectos do desenvolvimento dos eixos embrionários em cada tratamento aos cinco, dez e quinze dias de cultivo.....</b>	<b>47</b>
<b>2 - Porcentagem de matéria seca (%MS) nos eixos embrionários em cada tratamento utilizado com zero cinco, dez e quinze dias de cultivo.....</b>	<b>50</b>
<b>3 - Incremento de massa de matéria fresca (IMMF) nos eixos embrionários em cada tratamento utilizado com zero, cinco, dez e quinze dias de cultivo.....</b>	<b>51</b>
<b>4 - Porcentagem de nitrogênio total na matéria seca nos eixos embrionários em cada tratamento utilizado com zero, cinco, dez e quinze dias de cultivo.....</b>	<b>52</b>
<b>5 - Teores de proteínas solúveis totais nos eixos embrionários em cada tratamento utilizado com zero, cinco dez e quinze dias de cultivo.....</b>	<b>53</b>
<b>6 - Atividade específica da Desidrogenase de Glutamato (GDH) nos eixos embrionários em cada tratamento utilizado com zero, cinco, dez e quinze dias de cultivo.....</b>	<b>54</b>
<b>7 - Atividade específica da Sintetase de Glutamina (GS) nos eixos embrionários em cada tratamento utilizado com zero, cinco, dez e quinze dias de cultivo.....</b>	<b>55</b>
<b>8 - Atividade específica da Sintase de Glutamato (GOGAT) nos eixos embrionários em cada tratamento utilizado com zero, cinco, dez e quinze dias de cultivo.....</b>	<b>56</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
ADP	Adenosina di-fosfato
AMP	Adenosina mono-fosfato
ATP	Adenosina tri-fosfato
CTP	Citosina tri-fosfato
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
fd-GOGAT	GOGAT ferredoxina dependente
GDH	Desidrogenase de glutamato
Gln	Glutamina
GOGAT	Sintase de glutamato
GS	Sintetase de glutamina
GTP	Guanosina tri-fosfato
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IMMF	Incremento de massa de matéria fresca
KDa	Kilodaltons
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
%MS	Porcentagem de massa de matéria seca
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MSO	Metionina sulfoximina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
Pi	Fosfato inorgânico
TCA	Ácido tri-cloro acético
TRIS	Tri (hídrosi) amino metano

**ATIVIDADE ESPECÍFICA DAS ENZIMAS DESIDROGENASE DE GLUTAMATO, SINTETASE DE GLUTAMINA E SINTASE DE GLUTAMATO EM EIXOS EMBRIONÁRIOS DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L. cv. CARIOCA SH 80) "IN VITRO" EM PRESENÇA DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO**

**Autor: Enio Tiago de Oliveira**

**Orientador: Otto Jesu Crocomo**

**RESUMO**

O desenvolvimento de eixos embrionários de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Carioca SH 80) "in vitro", nutridos com diferentes fontes de nitrogênio, foi acompanhado bioquimicamente através de determinações da atividade das enzimas Desidrogenase de Glutamato (GDH), Sintetase de Glutamina (GS) e Sintase de Glutamato (GOGAT), e fisiologicamente medindo-se as massas de matéria fresca e seca.

Para tanto, os eixos embrionários foram cultivados em meio MS modificado em relação à composição nitrogenada e submetidos aos

tratamentos: 1) amônia mais nitrato, 2) nitrato mais glutamina, 3) amônia mais glutamina, 4) glutamina, 5) nitrato isoladamente, e como testemunha, foi utilizado o tratamento (6) sem adição de nitrogênio. Todas as modificações foram proporcionais à formulação original de MS.

As determinações analíticas foram realizadas nos seguintes períodos: zero, cinco, dez e quinze dias de cultivo, e os melhores resultados em termos de desenvolvimento dos eixos embrionários foram proporcionados pelos tratamentos que receberam nitrogênio na forma de nitrato, seja isoladamente ou combinado com amônia ou glutamina. Esses tratamentos favoreceram também os mais altos níveis de atividade das enzimas GS e GOGAT.

Eixos embrionários intactos (tempo zero) apresentaram altos teores de proteínas solúveis em relação aos eixos embrionários submetidos ao cultivo nos diferentes tratamentos. A atividade específica das enzimas GDH, GS e GOGAT também foram relativamente altas nesse órgão.

Os mais altos níveis de atividade da GDH foram proporcionados pelos tratamentos com glutamina isoladamente, glutamina mais amônia e pelo tratamento sem nitrogênio. Esses resultados coincidiram com o não desenvolvimento dos eixos embrionários "in vitro" caracterizando uma possível deficiência de nitrogênio, e indicando uma provável atividade catabólica da GDH determinada pela exigência em nitrogênio para o desenvolvimento dos mesmos.

Os teores de nitrogênio total no material cultivado sofreram acentuados decréscimos, principalmente nos períodos iniciais de cultivo, no tratamento com ausência de nitrogênio e naquele que recebeu exclusivamente nitrato. Nos demais tratamentos os teores de nitrogênio permaneceram praticamente constantes ao longo dos quinze dias de cultivo.

A porcentagem de matéria seca decresceu acentuadamente em todos os tratamentos nos primeiros cinco dias de cultivo. Tais decréscimos foram justificados pelos processos de embebição e reidratação dos eixos embrionários. O aumento de massa de matéria seca ocorreu nos períodos finais de cultivo, sendo maiores nos tratamentos que receberam somente glutamina ou glutamina mais amônia.

O incremento de massa de matéria fresca correlacionou-se positivamente com o padrão de crescimento da cultura, mostrando os maiores valores nos tratamentos que receberam nitrato mais amônia, nitrato mais glutamina e naquele que recebeu somente nitrato.

**SPECIFIC ACTIVITY OF THE ENZYMES GLUTAMATE DEHYDRIGENASE,  
GLUTAMINE SYNTHETASE AND GLUTAMATE SYNTHASE IN BEAN  
(*Phaseolus vulgaris* L. cv. CARIOCA SH 80) EMBRYO AXIS "IN VITRO"  
IN PRESENCE OF DIFFERENT NITROGEN SOURCES.**

Author: Enio Tiago de Oliveira

Adviser: Otto Jesu Crocomo

**SUMMARY**

The "in vitro" development of bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Carioca SH 80) embryo axis, in the presence of different nitrogen sources, has been monitored biochemically through the activities of the enzymes Glutamate Dehydrogenase (GDH), Glutamine Synthetase (GS) and Glutamate Synthase (GOGAT), soluble protein and total nitrogen, and physiologically measuring the dry and fresh matter.

The embryo axis were maintained in a modified MS medium under the following treatments: 1) ammonia + nitrate; 2) nitrate + glutamine; 3) ammonia + glutamine; 4) glutamine; 5) nitrate; 6) without nitrogen.

The time course assays were conducted at 0, 5, 10 and 15 days after the start of experiments. The best results pertained to the development of the embryo axis were obtained in presence of nitrate alone or in combination with ammonia or glutamine. In these treatments highest levels of GS and GOGAT were detected.

The intact axis (0 time) showed higher levels of soluble proteins than those ones submitted to the different treatments. High specific activities of GDH, GS and GOGAT were also detected in these embryos.

The high levels of GDH were observed in the presence of either glutamine alone, glutamine + ammonia or in the absence of nitrogen. These results could be related to the poor development of the embryo axis in culture, possibly due to a nitrogen deficiency in the medium, pointing towards a probably catabolic activity of GDH determined by nitrogen requirement for the development of the embryos.

The total nitrogen content of the cultivated material decreased mainly in the initial periods of the culture, either in the absence of nitrogen or in the presence of nitrate. On the other hand, in the other treatments the nitrogen content remained practically the same during the growth period of the embryo axis.

The dry matter decreased in all treatments during the initial 5-day period of growth, due to both imbibition and rehydration of the embryo

axis. However, in the ending of period in culture, the dry matter content increased mainly in the presence of glutamine alone or glutamine plus ammonia.

The highest values of the fresh weight were observed in the treatment receiving nitrate plus ammonia or plus glutamine, and when only nitrate was present.

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura de embriões é uma técnica bastante utilizada em estudos básicos de metabolismo em bioquímica e fisiologia de plantas, oferecendo, por exemplo, suporte aos mais amplos estudos das necessidades nutricionais dos embriões. É também utilizada na quebra de dormência e germinação de sementes, e como abordagem biotecnológica no cultivo de híbridos interespecíficos.

Nos estudos sobre o metabolismo básico, o cultivo de embriões "in vitro" é feito em condições nutricionais e físicas totalmente manipuláveis. Neste caso, pode-se estudar outros fatores, como o requerimento mineral e orgânico, a temperatura, a luminosidade, o fotoperiodismo, bem como as respostas do metabolismo a cada um desses fatores.

Um aspecto bastante interessante da cultura de embrião trata do estudo da regulação da atividade de determinadas enzimas nas várias condições nutricionais, como por exemplo, as diferentes fontes de nitrogênio que podem ser oferecidas aos embriões cultivados "in vitro".

Entre as fontes de nitrogênio mais utilizadas em meios de cultura de plantas, destacam-se a nítrica e amoniacal nas formas de sais inorgânicos bem como as formas de N-orgânico amídico e amínico.

Em muitos trabalhos utilizando cultura de tecidos, observa-se que, enquanto o nitrato sustenta uma taxa de crescimento para os mais diversos tecidos e órgãos em diferentes espécies, para outras, já não tem o mesmo efeito.

Por outro lado, a forma amoniacal inorgânica, quando utilizada sozinha, causa sérios efeitos de toxidez aos tecidos em cultivo.

Além dessas formas inorgânicas, muitas espécies exigem um complemento nitrogenado na forma orgânica, sendo a glutamina uma das formas mais efetivas e amplamente utilizadas.

A assimilação do nitrogênio pelas plantas ocorre no seu estado reduzido, ou seja, na forma amoniacal que pode originar-se a partir da absorção da própria amônia ou de nitrato e nitrito, posteriormente reduzidos pela ação das enzimas nitrato e nitrito redutase. Ela pode originar-se também a partir do catabolismo e da quebra ou interconversões entre compostos aaminados. Finalmente, esta amônia colocada em disponibilidade, é então assimilada pela via desidrogenase glutâmica (via GDH) e via sintetase de glutamina/sintase de glutamato (via GS/GOGAT).

Considerando que o sucesso da cultura "in vitro" nos seus mais amplos aspectos, está diretamente ligado aos mecanismos assimilatórios de nitrogênio e que pouco se conhece sobre tal mecanismo nas condições de cultivo "in vitro", este trabalho se propôs ao estudo da atividade das enzimas GDH, GS e GOGAT nos primeiros estágios de desenvolvimento de eixos embrionários de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. c.v. Carioca SH 80)

**nutridos com diferentes combinações de sais inorgânicos de nitrato e de amônia e glutamina como fonte de nitrogênio orgânico.**

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Características da Desidrogenase de Glutamato (GDH)

A enzima Desidrogenase de Glutamato (GDH) (L-Glutamato: NAD(P)H oxidoreductase) (EC 1.4.1.2) está localizada nas mitocôndrias (RITENOUR et al., 1967; MIFLIN, 1970), onde ocorre frouxamente associada às membranas (YAMAYA et al., 1984). Essa enzima foi encontrada em várias isoformas e catalisa a aminação de  $\alpha$ -cetoglutarato produzindo glutamato utilizando como co-fator NADH ou NADPH. Catalisa também a reação inversa, desaminação, utilizando para tanto, os co-fatores oxidados  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$ , como mostrado pela seguinte equação:



A Desidrogenase de Glutamato foi por muitos anos considerada como a principal via de assimilação do nitrogênio (VIDE Crocomo, 1979). Entretanto, a partir dos anos 70, resultados de pesquisas realizadas principalmente com microorganismos, indicaram que não era a principal via de assimilação de nitrogênio e que tal papel caberia também a via GS/GOGAT. Ficou implícito então a possibilidade de competição das duas vias pela mesma função. Posteriormente essa idéia de competição foi sendo descartada pelos pesquisadores (MIFLIN & LEA, 1977; STWART et al.,

1980; MIFLIN et al., 1981) concluindo que, devido à localização da enzima, compartimentalizada nas mitocôndrias, e com  $K_M$  relativamente alto, dificilmente a GDH competiria com a GS na assimilação amoniacal.

Na busca da importância do papel da GDH, os pesquisadores observaram que durante o processo fotorespiratório, a glicina é convertida em serina com liberação de amônia, em reações catalisadas pelas enzimas glicina descarboxilase e serina hidroximetil transferase, localizadas nas membranas mitocondriais e acopladas, portanto, à formação de NADH.

Segundo BERGMAN & ERICSON (1983), essas reações ocorrem no mesmo pH ótimo para a assimilação amoniacal, levando à conclusão de que a GDH possa ter algum papel na reassimilação amoniacal.

Considerando ainda que o nitrogênio fotorespiratório não está fechado num processo cíclico, e que ocorre gasto de glutamato, glutamina, serina ou glicina para outros processos como síntese proteica ou exportação para outras regiões da planta, e somando também dados obtidos com  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $^{15}\text{N}$ -Glicina, mostrando ocorrência de síntese de glutamato na mitocôndria, vários autores (YAMAYA et al., 1984, YAMAYA & OAKS, 1987) concluíram que a GDH atuaria na reassimilação de parte da amônia produzida na fotorespiração.

Por outro lado, HARTMANN & HEMKE (1980) observaram que muito pouco da amônia produzida na fotorespiração é assimilada pela mitocôndria, sendo a maior parte transferida para o citossol onde é reassimilada pela via GS/GOGAT.

Considerando que mais de 95% de toda a assimilação amoniacal ocorre através da via GS/GOGAT, e ao mesmo tempo, os altos níveis de GDH observados na mesma planta, com atividade regulada pela disponibilidade de carboidratos solúveis, LEA et al. (1992) concluíram sobre um possível papel catabólico para a GDH, papel este, também observado no fungo *Apodachlya brachynema* por PRICE & GLEASON (1972).

Conclusões semelhantes foram tiradas por ROBINSON et al. (1992) com o cultivo de células de cenoura em suspensão. Os autores observaram que a atividade da GDH foi desreprimida pela falta de sacarose no meio e que o aumento da atividade ocorria concomitantemente com o catabolismo proteico, excreção de amônia e acúmulo de aminoácidos metabolicamente ativos. Com adição de sacarose ocorreu um rápido decréscimo da atividade da GDH, absorção de amônia e decréscimo da concentração celular de aminoácidos. A ativação da GDH foi correlacionada positivamente com o nível celular de glutamato, concluindo, assim, sobre uma possível função catabólica da enzima, a qual, sob condições de estresse de carbono, utilizaria esqueletos carbônicos a partir do Ciclo de Krebs.

CHOU & SPLITTSTOESSER (1972) observaram em pepino (*Curcubita moschata* Pior.) a ocorrência de NADH e NADPH-GDH, nas frações solúvel e na decantada, sendo a maior parte da atividade observada na fração solúvel, tanto de NADH como de NADPH-GDH. As enzimas foram classificadas como glutamato-NAD oxidoreductase-desaminativa (EC

1.4.1.3). Ambas as enzimas foram estáveis ao calor com valor do pH ótimo para aaminação redutiva igual a 8,0; e foram inibidas por altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , ou  $\alpha$ -cetogluturato. A GDH da fração solúvel, depois de fracionada com sulfato de amônio, foi mais sensível à inibição por  $\text{NH}_4^+$  que foi revertida ou ativada por  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$  e  $\text{Cu}^{++}$ . A enzima foi inibida também por etilenodiamina tetra-acetato (EDTA) e por p-hidroximetil mercúrio benzoato, com reversão por  $\text{Zn}^{++}$  ou  $\text{Mg}^{++}$ , e por glutamina respectivamente.

O peso molecular da enzima foi determinado com valor de 250.000 Da, e a separação por eletroforese mostrou que durante a germinação da semente as isoenzimas da fração solúvel aumentam de 1 para 7 isoenzimas, enquanto a fração decantada apresentou apenas uma isoforma.

A GDH foi purificada a partir de "seedlings" de *Vigna unguiculata* com dois dias de germinação por FAWOLE & BOULTER (1977). A enzima mostrou-se como uma banda proteica difusa em gel de poliacrilamida com subunidades com peso molecular em torno de 51000 Da, e atividade com NADH, NADPH e  $\text{NAD}^+$ , e valores pHs ótimos de 8,0; 10,0 e 6,0 respectivamente. Nesse trabalho os autores observaram alta especificidade para L-Glutamato e  $\alpha$ -cetogluturato mostrando pouca ou nenhuma atividade com outros amino ou ceto-ácidos. O  $k_m$  para NADH,  $\text{NAD}^+$ ,  $\alpha$ -cetogluturato, amônia e L-glutamato foi 0,059 mM; 0,285 mM; 1,79 mM; 28,6 mM e 16,7 mM respectivamente.

Segundo LAURIÈRE & DAUSSANT (1983), o aumento da atividade da GDH em folhas destacadas de milho, incubadas durante 72 horas em solução de amônia 15 mM, deveu-se a uma síntese "de novo" de uma isoenzima da GDH. Esse processo foi induzido também pela ausência de luz e pela senescência. Resultados semelhantes foram obtidos em raízes de arroz por KANAMORI & TAKAHASHI (1972).

VARGAS & JIMÉNEZ (1984) estudaram as atividades de NADH e NAD-GDH em calos cultivados "in vitro", raízes e folhas de milho cultivadas em casa de vegetação com diferentes fontes de nitrogênio em diferentes tempos de cultivo. Nos calos a atividade da GDH foi inibida por glutamato, amônia e uréia, apresentando ainda diferentes relações entre NADH e NAD-GDH para as diferentes fontes nitrogenadas. Nas raízes, amônia e glutamina produziram aumentos da atividade da NADH-GDH, enquanto que os mesmos metabólitos foram inibidores nas folhas. Esses resultados sugeriram a presença de isoenzimas, ou "conformers", específicos para cada tecido, cujas atividades variam dependendo do suprimento nutricional do tecido e de seu estágio de diferenciação.

St-LEGER et al. (1992) cultivando protoplastos de folhas de canola em meio de M&S completo e sem nitrogênio, no escuro, observaram uma atividade da NADH-GDH inicialmente baixa, aumentando progressivamente durante a cultura. Resultados com eletroforese mostraram que as altas atividades específicas de NAD-GDH (desaminativa) das folhas correlacionaram-se com isoenzimas anodais, enquanto que a NADH-GDH

(aminativa) de protoplastos das folhas correlacionaram-se com isoenzimas catodais. Observaram ainda que os aumentos de atividade da NADH-GDH dos protoplastos deveu-se à ocorrência de uma isoenzima GDH<sub>7</sub>, não detectada nas folhas.

Já em nódulos infectados de *Lupinus luteus* cv. ventus, LEHMANN et al. (1990) observaram a ocorrência de 9 isoenzimas da GDH em 3 diferentes frações precipitadas com sulfato de amônio (30-40; 40-50; e 50-60%). A fração 30-40% mostrou 4 das 9 isoenzimas, a fração 40-50% mostrou as 9 e a fração 50-60% mostrou 6. As GDHs das 3 frações mostraram 2 valores de  $K_M$  para amônia, o primeiro em torno de 17 a 20 mM em altas concentrações de amônia (5 a 200 mM), e o segundo em torno de 0,25 a 1,4 mM em concentrações baixas.

Além dos nutricionais, outros fatores importantes como luminosidade, aspectos sazonais e estádios fisiológicos da planta podem atuar sobre a atividade ou síntese "de novo" da GDH.

DAS et al. (1989) observaram aumentos de 5 a 6 vezes na atividade da GDH em "seedlings" de milho com 5 dias de germinação com irradiação (5 minutos) de luz vermelha. Este efeito foi anulado com a subsequente irradiação de vermelho longo. Essa fotorreversibilidade mostrou um efeito regulatório da forma ativa dos fitocromos sobre a enzima.

Quanto aos aspectos sazonais, SECHEY et al. (1991) observaram pouca atividade da GDH em raízes de *Cichorium intybus* durante o inverno, aumentando nos meses de verão.

Em grão de bico, o maior nível de atividade ocorreu na fase de formação das vagens. Nos nódulos, a atividade máxima ocorreu na fase de florescimento (PANDEY & BABU, 1988).

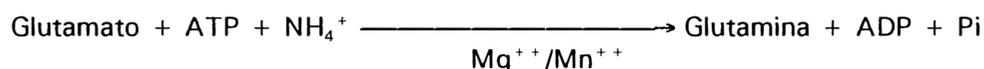
CAMAERTS & JACOBS (1985), estudando padrões isoenzimáticos em plântulas de *Arapdopsis thaliana*, observaram que a atividade de NADH e NAD-GDH aumentaram com o desenvolvimento da planta, e a falta de luz nas folhas determinaram aumento de atividade da NADH-GDH. Nas raízes, a atividade de ambas as GDHs foi estimulada por amônia, enquanto que a assimilação de nitrogênio nas folhas foi menos importante, mostrando que o aumento da atividade da GDH resultou da síntese "de novo" da enzima. Esses autores concluíram também que a NADH-GDH está envolvida na desintoxicação provocada por altos níveis de nitrogênio, enquanto que a NAD-GDH é responsável principalmente pelo suprimento energético da célula durante o processo de assimilação ativa.

A atividade da GDH está intimamente ligada à via das pentoses fosfato. DROVET et al. (1989) relacionaram a atividade desta via com a atividade da GDH e o ciclo de crescimento em folhas de *Juglans nigra X J. régia*. A atividade da via das pentoses aumentou até o período de dormência das gemas, enquanto isso, a atividade da GDH permaneceu baixa. Na fase de brotação a atividade da via das pentoses aumentou e a GDH diminui até os primeiros 15 dias de crescimento.

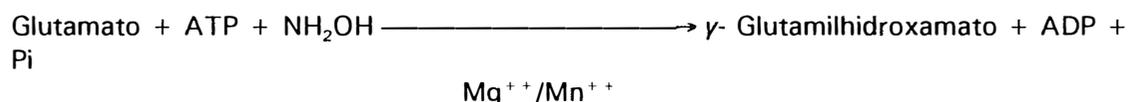
## 2.2. Características da Sintetase de Glutamina (GS)

A Sintetase de Glutamina (GS) (EC 6.3.1.2) utiliza glutamato, ATP e amônia com conseqüente produção de glutamina, ADP e Pi (Reação 1). Além da atividade sintetase, a GS funciona também biossinteticamente produzindo  $\gamma$ -glutamilhdroxamato a partir de glutamato, ATP e hidroxilamina (Reação 2). Funciona ainda como transferase produzindo  $\gamma$ -glutamilhdroxamato a partir de glutamina e hidroxilamina (Reação 3) (FARN DEN & ROBERTSON, 1980).

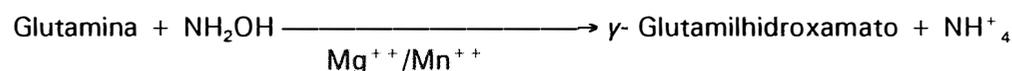
Reação 1:



Reação 2:



Reação 3:



A enzima é considerada como principal rota de assimilação de amônia em plantas. (MIFLIN & LEA, 1980; McNALLY et al., 1983; HIREL et al., 1984;). Ela tem sido isolada e identificada mostrando ocorrer em diferentes isoformas, com características como localização, estabilidade ao calor, valor pH ótimo e  $K_M$  para seus substratos, peculiares.

Quanto às isoformas e localizações, no citossol de raízes tem sido

identificada a GSr em inúmeras plantas como arroz (HIREL & GADAL, 1980). Em nódulos tem sido identificada as isoformas  $GS_{n-1}$  e  $GS_{n-2}$ , como em feijão (ROBERT & WONG, 1986). Na parte aérea, como folhas, tem sido identificada a isoforma GS, em ervilha (WALLSGROVE et al., 1979), trigo (TOBIN et al., 1985), milho e sorgo (YAMAYA & OAKS, 1987), e numa vasta gama de plantas, excetuando uma ou outra como tomate (CANOVAS et al., 1986; BOTELLA et al., 1988), aspargos e espinafre (ERICSON, 1985), que contém uma isoforma diferente, a  $GS_2$ .

Essa última isoforma identificada, a  $GS_2$ , encontra-se associada aos cloroplastos, como observado em arroz (RANKUMAR et al., 1981), em tabaco (HIREL et al., 1984), em *Chlorella* (SUMAR et al., 1984), em espinafre (ERICSON, 1985), em tomate (CANOVAS et al., 1986; BOTELLA et al., 1988), e na maioria dos organismos fotossintetizantes, superiores e inferiores.

Em relação às características peculiares a cada isoforma da GS RANKUMAR et al. (1981), trabalhando com arroz, observaram propriedades similares entre GSr e  $GS_1$ , com atividade biossintética similar (18  $\mu\text{mol Pi/mg proteína/min}$ ), e de transferase (1324  $\mu\text{M}$  para GSr e 1156  $\mu\text{Mol } \gamma\text{-glutamilhdroxamato/mg proteína/min}$ ). Os valores de  $K_M$  também foram próximos: 2,17 mM para glutamato; 4,5 e 5,0 mMol para  $Mg^{++}$ ; 286  $\mu\text{M}$  para ATP, 210 e 135  $\mu\text{M}$  para  $NH_4^+$  e 3,8 e 5,3  $\mu\text{M}$  para ADP. Em contraste, a isoforma  $GS_2$  apresentou valores de  $K_M$  bem mais altos: 8,3 mM glutamato para 15 mM para  $Mg^{++}$ ; 684  $\mu\text{M}$  para  $NH_4^+$  e 33  $\mu\text{M}$  para

ADP.

As mesmas relações entre GSr, GS<sub>1</sub> e GS<sub>2</sub>; em arroz, foram observadas por HIREL & GADAL (1980), porém os valores de K<sub>M</sub> para glutamato apresentaram-se diferentes, sendo 2 mM para GS<sub>1</sub> e 20 mM para GS<sub>2</sub>. Observaram ainda labilidade ao calor, valor pH ótimo em torno de 8 e inibição por glucosamina 6-fosfato como a principal característica da GS<sub>2</sub>. A GS<sub>1</sub> apresentou estabilidade ao calor, valor pH ótimo em torno de 7,5, não sofrendo nenhum efeito de inibição por glucosamina 6-fosfato. A GSr apresentou propriedades cinéticas e regulatórias semelhantes à GS<sub>1</sub>.

Nos tecidos fotossintetizantes, as atividades da GS<sub>1</sub> e GS<sub>2</sub> estão distribuídas com diferenças proporcionais entre citossol e cloroplastos (RATHNAM & EDWARDS, 1976). Resultados obtidos por HIREL & GADAL (1982), em folhas de sorgo, mostraram uma atividade maior para GS<sub>1</sub> (67%) em relação à GS<sub>2</sub> (33%).

Outros resultados obtidos em ervilha por WALLSGROVE et al. (1979), mostraram que 60% de toda a atividade da GS correspondia a GS<sub>2</sub>. Em cotilédones verdes de girassol, CABELLO et al. (1991) observaram que a atividade total da GS correspondeu a 21% para GS<sub>1</sub> e 79% para GS<sub>2</sub>. Já em folhas, a diferença foi ainda mais marcante, 5% para GS<sub>1</sub>, e 95% para GS<sub>2</sub>. Por outro lado, HIREL et al. (1982) observaram valores de atividade da GS<sub>2</sub> cinco vezes maior em folhas maduras que em tecidos estiolados concluindo que essa diferença de aumentos de atividade deveu-se à síntese "de novo" da GS<sub>2</sub>, mecanismo este, ativado pela luz.

Estruturalmente, a GS é composta predominantemente de oito subunidades polipeptídicas arranjadas octamericamente. Cada subunidade, com peso molecular em torno de 47 KDa, resulta num peso molecular total em torno de 380 KDa (CULLIMORE et al., 1983).

HIREL et al. (1984), purificaram e identificaram GS<sub>2</sub> a partir de cloroplastos de tabaco usando dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida em HPLC. Observaram a ocorrência de uma subunidade polipeptídica com peso molecular de 45 KDa. Os resultados desse trabalho sugeriram uma composição proteica de 4 subunidades diferentes cuja síntese poderia ser controlada por genes diferentes com eventuais modificações pós-transducionais e/ou pós-transcricionais.

ERICSON (1985) purificou GS<sub>2</sub> a partir de cloroplastos de espinafre identificando uma proteína com peso molecular de 360 KDa, sendo esta, composta de oito subunidades de 44 KDa.

Em *Chrorella kessleri*, SUMAR et al. (1984) observaram o mesmo peso molecular para GS<sub>1</sub> e GS<sub>2</sub> em torno de 350 KDa. Observaram também a predominância de GS<sub>1</sub> (60% a 80%) em relação à GS<sub>2</sub>, bem como uma maior estabilidade ao calor, a 30°C por 30 minutos, da GS<sub>1</sub>, em relação à GS<sub>2</sub>.

Em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), LARA et al. (1984) observaram que GS foliar é composta de seis polipeptídeos. A GS<sub>1</sub> (fração citossólica) contém dois polipeptídeos de 43 KDa, enquanto que a GS<sub>2</sub> (fração cloroplastídica) é formada de quatro polipeptídeos de 45 KDa. A GS<sub>1</sub>

(raiz) como a  $GS_1$  é constituída de dois polipeptídeos de 43 KDa. A  $GS_n$  (nódulos) também é constituída de dois polipeptídeos de 43 KDa, sendo que um deles corresponderia a um daqueles da  $GS_1$  e o outro poderia ser específico para a fixação nodular de  $N_2$ . Esses Autores observaram ainda que a  $GS_r$  e  $GS_1$  são formadas por dois tipos de polipeptídeos denominados  $\alpha$  e  $\beta$ . A  $GS_2$  é formada por quatro tipos: a, b, c, d; e são específicos de folhas maduras. A  $GS_{n-1}$  e  $GS_{n-2}$  são formadas por polipeptídeos  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo o polipeptídeo  $\beta$ , específico de GS nodular, e predominante na  $GS_{n-1}$ .

A ocorrência de diferentes isoformas da GS nas diferentes espécies, bem como suas diferentes citolocalizações, sugerem um controle genético através de diferentes genes (GEBHART et al., 1986).

SWARUP et al. (1990) observaram, em cotilédones verdes de *P. vulgaris*, a ocorrência de quatro GS codificadas por quatro genes diferentes:  $\alpha$ -gln,  $\beta$ -gln,  $\gamma$ -gln e  $\delta$ -gln, e o método de proteção pela mRNA<sub>ase</sub>, usado para detectar a abundância de GS mRNAs, revelou que os quatro genes da GS são expressos diferencialmente nos cotilédones durante a germinação.

Membros individuais da família multigênica, que codificam polipeptídeos da GS, mostraram expressão diferenciada "in vitro", cada um codificando um polipeptídeo diferente, de acordo com sua compartimentalização subcelular. Clones de cDNA codificam  $GS_1$  cloroplastídica ou citossólica em ervilha "in vivo"; o produto da transdução é codificado por três diferentes clones de cDNA, que correspondem a polipeptídeos de  $GS_1$ ,  $GS_n$  e  $GS_2$  presentes "in vivo". O gene pGS185

codifica um precursor para polipeptídeos da GS<sub>2</sub> e o produto de sua transdução é importado pelo cloroplasto e processado em polipeptídeo correspondente em tamanho (44 KDa) à polipeptídeos da GS<sub>2</sub>. As formas citossólicas da GS são codificadas por genes homólogos, mas mRNAs diferentes. Os genes nucleares homólogos para as isoformas cloroplastídicas e citossólicas mostraram diferentes variações de expressão "in vivo", e a análise sequencial de seus nucleotídeos sugeriram ancestrais comuns (TINGEY et al., 1987).

Em *E. coli*, há uma única forma de GS (WOOLFOLK & STADTMAN, 1964). Nesse mesmo organismo, (PAHEL et al., 1979) observaram que o gene *glnA* responsável pela síntese de GS, possui um gene *glnG* responsável pela sua regulação, que se dá ao nível de transcrição. KUSTU et al., 1979, observaram que o produto do gene regulador *glnF* é essencial para a síntese da enzima em salmonela, demonstrando que o produto de um segundo gene regulador *glnR*, também é necessário.

Ambos os produtos destes dois genes possuem importância na ativação da síntese de duas proteínas de transporte periplasmático, uma glutamina-proteína e uma arginina-lisina-ornitina-proteína, possuindo efeito pleiotrópicos.

EDWARDS et al. (1989) observaram que a luz afeta seletivamente a expressão de um gene nuclear para GS<sub>2</sub>. Em cloroplastos de ervilha o nível de mRNAGS<sub>2</sub> também é afetado pela qualidade da luz e

controlado por fitocromos, bem como pelo metabolismo do cloroplasto, onde a atividade da GS está em função do nível de amônia liberada pela fotorrespiração.

MARSOLIER & HEREL (1993) observaram que dois genes ( $GS_{15}$  e  $GS_{21}$ ) são ativamente transcritos em soja. A expressão do  $GS_{15}$  é regulada pela disponibilidade de amônia nas raízes e outros órgãos, enquanto que o  $GS_{21}$  é expresso nos nódulos. Os resultados sugeriram que dois possíveis mecanismos podem controlar a expressão diferencial dos genes  $GS_{15}$  e  $GS_{21}$ , um mecanismo metabólico e o outro determinado pelo próprio desenvolvimento da planta.

Segundo WOOLFOLK & STADTMAN (1964) a atividade da GS, medida em extrato cru pela formação de  $\gamma$ -glutamihidroxamato, pode ser inibida por AMP, GTP, CTP, Alanina, Glicina e Triptofano, nas concentrações de 0,002 a 0,005 M. O modelo de inibição seria possivelmente o de inibição multipla pelo produto final acumulado.

A GS é inibida também de modo competitivo por L-metionina sulfoximina (MSO). Em cevada, FENTEN et al. (1983) observaram que MSO inibe totalmente a atividade da GS nas raízes, com pouco efeito na GS foliar. Após a adição de MSO, observou-se um acúmulo de amônia no meio. Os níveis de alanina, treonina e serina também aumentaram.

Em girassol, WEISSMAN (1976) concluiu que a GS não é regulada pelo mecanismo de adenilação-deadenilação nem pelo mecanismo de inibição, uma vez que ocorre estímulo da atividade da GS

quando as plantas decotiledonizadas, crescendo em meio com nitrato, são transferidas para um meio com amônia. O mecanismo responsável parece ser controlado pela carga energética celular e modulado pela concentração do(s) produto(s) final(is).

Entretanto, em *Rhodospirillum*, observou-se que a GS é controlada pelo mecanismo de adenilação-deadenilação (YOCK et al., 1983 e NORDLUND et al., 1985).

Em *Lemma minor* L., a atividade da GS foi reduzida drasticamente quando amônia ou glutamina foram adicionadas no meio de cultivo. A inibição foi correlacionada negativamente com a concentração intracelular de glutamina, sugerindo uma inibição pelo produto final, pelo "pool" endógeno de glutamina (RHODES et al., 1975).

YUAN e HOU (1987) observaram que a atividade biossintética de GS<sub>1</sub> e GS<sub>2</sub>, em folhas de arroz, pode ser inibida por concentrações saturantes de aminoácidos e nucleotídeos. Entre os mais potentes são citados glicina, alanina, ácido aspártico, serina, AMP e ADP. Quando a concentração desses inibidores foi elevada a níveis saturantes, observou-se um decréscimo parcial na atividade das enzimas. O efeito combinado entre quinze possíveis pares desses inibidores mostrou que seis combinações exerceram inibição cumulativa e nove pares exerceram inibição antagônica da GS<sub>1</sub>. Por outro lado, quatorze pares exerceram inibição cumulativa e um par exerceu inibição antagônica sobre a GS<sub>2</sub>. Os resultados indicaram que as isoformas GS<sub>1</sub> e GS<sub>2</sub>, possuem sítios de ligação diferentes para cada um

dos seis inibidores, e que tais sítios na superfície de ambas as enzimas não são idênticos.

CANOVAS et al. (1991) observaram atividades de GS em embriões de *Pinus pinaster*, cujos níveis aumentaram marcadamente em cotilédones durante a germinação, na ausência ou presença de luz. Através de cromatografia de troca iônica identificou-se apenas uma isoforma de GS com polipeptídeos de 43 KDa, tanto em raízes como em acículas. Os autores não observaram nenhuma influência da luz neste sistema (GS-pinus), o que se justifica, talvez, pela ocorrência de apenas a isoforma da GS citossólica (GS<sub>1</sub>).

### 2.3. Características da Sintase de Glutamato (GOGAT)

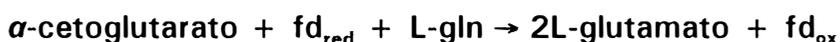
A Sintase de Glutamato, glutamina-2-oxoglutarato amino transferase (GOGAT) catalisa o segundo passo das reações assimilatórias do nitrogênio através da via GS/GOGAT. A reação de transaminação consiste na transferência do nitrogênio amídico da L-glutamina para o 2-oxoglutarato formando 2 moléculas de L-glutamato e bactérias (MILLER & STADTMAN, 1972), em algas (LEA & MIFLIN, 1975), na fixação nodular de nitrogênio em leguminosas (BOLAND & BENNY, 1977) e em plantas superiores de modo geral (MIFLIN & LEA, 1976).

Atualmente foram identificadas diferentes GOGATs, com diversas

localizações dentro das plantas e, principalmente, com utilização de elétrons de diferentes doadores. Sendo assim, a fd-GOGAT - GOGAT ferredoxina dependente (EC 1.4.7.1)-utiliza a ferredoxina como doador de elétrons. A NADH-GOGAT, GOGAT NADH dependente (EC 1.4.1.14) utiliza elétrons de NADH, e por último a NADPH-GOGAT, NADPH-GOGAT dependente (EC 1.4.1.13)-que utiliza elétrons de NADPH.

As reações catalisadas por essas enzimas são as seguintes:

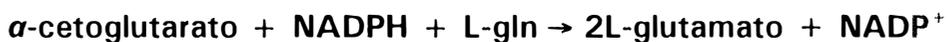
#### Reação 1



#### Reação 2



#### Reação 3



A GOGAT nas plantas é encontrada nos mais diferentes tecidos, ocorrendo exclusivamente nos cloroplastos de células fotossintetizantes ou nos plastídeos de células não fotossintetizantes como nas raízes.

A enzima foi observada nos cloroplastos de células do mesófilo e da bainha vascular em milho (HAREL et al., 1977), no estroma dos cloroplastos de células do mesófilo, xilema, parênquima e epiderme de

tomate (BOTELLA et al., 1988), nos plastídeos de raízes de milho, arroz, feijão, ervilha (SUZUKI et al., 1981), e cloroplastos de clamidomonas (FISCHER & KLEIN, 1988).

SUZUKI et al. (1982) observaram que fd-GOGAT, purificadas de folhas verdes, folhas estioladas e de raízes de arroz, reage com antiferridoxina GOGAT imunoglobulina G. Em contraste, NADH-GOGAT e NADPH-GOGAT, purificada a partir de tecidos estiolados e raízes não apresentaram reação. Em adição, fd-GOGAT foi separada e distinguida das NADH e NADPH-GOGATs por cromatografia de afinidade a ferridoxina em gel de sepharose, concluindo que a GOGAT das raízes é uma proteína diferente da fd-GOGAT das folhas verdes ou estioladas.

CHEN & CULLIMORE (1988) observaram em nódulos de feijão, a ocorrência de duas isoformas diferentes de NADH-GOGAT: NADH-GOGAT I e II. Essas duas isoformas, separadas por cromatografia de troca iônica, mostraram-se como proteínas monoméricas com diferentes pesos moleculares,  $K_M$  e valores pHs ótimo diferentes. O peso molecular das NADH-GOGATs I e II foi de 200.000 Da e 210.000 Da, respectivamente. O  $K_M$  para L-glutamina, 2-oxoglutarato e NADH foi de 770  $\mu\text{M}$ ; 2  $\mu\text{M}$ ; 14  $\mu\text{M}$  para NADH-GOGAT I, e 240  $\mu\text{M}$ ; 87  $\mu\text{M}$ ; e 5,2  $\mu\text{M}$  para NADH-GOGAT II. O valor pH ótimo para a primeira enzima foi igual a 8,0 e para a segunda igual a 8,5.

MURILO & JIMÉNEZ (1985) estudaram em *Bouvardia Ternifolia* SCHELECHT., a ocorrência de fd-GOGAT e NADH-GOGAT em calos

clorofilados e folhas jovens obtidas a partir da diferenciação dos calos. A cultura foi conduzida "in vitro" em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com modificações em relação ao suprimento de nitrogênio nas formas nítrica e amoniacal. A NADH-GOGAT foi observada nos plastídeos ou cloroplastos dos três tecidos, enquanto que fd-GOGAT foi observada somente nos cloroplastos dos tecidos clorofilados. Os processos de esverdeamento provocaram aumentos de atividade específica da fd-GOGAT. As enzimas responderam diferentemente às diversas fontes nitrogenadas, sugerindo que são reguladas diferentemente.

WALLSGROVE et al. (1979) observaram ocorrência da GOGAT exclusivamente nos cloroplastos em *Pisum sativum* L.. Nessa mesma cultura, BEEVERS & STOREY (1976) observaram, em cotilédones em desenvolvimento, uma atividade específica da NADH-GOGAT maior que a atividade da NADPH-GOGAT. Por outro lado, segundo MATOH & TAKAHASHI (1982) as atividades da fd-GOGAT e NADH-GOGAT na parte aérea variam com os diferentes estádios de desenvolvimento da planta. Com cinco dias de cultivo, a relação de atividade das duas enzimas foi de 72% para NADH-GOGAT e 28% para fd-GOGAT. Aos vinte e oito dias de cultivo, a relação foi de 3% para NADH-GOGAT e 97% para fd-GOGAT.

Resultados semelhantes na mesma cultura foram observados posteriormente por WALLSGROVE et al. (1982), onde a atividade da fd-GOGAT aumentou rapidamente com o processo de esverdeamento de plântulas estioladas. Já em folhas crescidas sob o regime de luz, a atividade

da fd-GOGAT foi 30 a 40 vezes maior que a atividade da NADPH-GOGAT.

Resultados diferentes foram observados em nódulos de raízes de feijão onde a atividade específica da NADH-GOGAT foi três vezes maior que a atividade da fd-GOGAT, sendo que a atividade da NADH-GOGAT das raízes é bem menor que a atividade da mesma enzima nos nódulos (CHEN & CULLIMORE, 1988).

BECKER et al. (1993) observaram que o aumento da atividade da fd-GOGAT em plântulas de tomate expostas à luz ocorre mais devido ao aumento da quantidade do que da ativação da enzima pré-existente. Neste caso, os fitocromos estariam envolvidos na regulação de fd-GOGAT mRNA pela luz vermelha.

A atividade da GOGAT pode ser afetada também pelo estágio de desenvolvimento da planta e por aspectos sazonais.

HAYAKAWA et al. (1993) observaram que o nível de NADH-GOGAT em panículas de arroz aumentou 4 a 6 vezes nos primeiros quinze dias depois do florescimento. Níveis máximos da enzima foram observados justamente no início de aumento de matéria seca e acúmulo de proteínas do tecido.

PIETILA et al. (1989) observaram que a atividade da GOGAT em *Pinus pinaster* foi maior no início da primavera e fim do outono.

#### **2.4. Nutrição nitrogenada e as enzimas GDH, GS e GOGAT**

Além da amônia disponível no solo e aquela produzida pela fixação simbiótica, principalmente nas leguminosas, a fonte de amônia para as raízes ocorre principalmente através da redução do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) à amônia, a qual por sua vez é destinada à conversão para amidas e ureídeos que são incorporados em proteínas da raiz ou são transportados para a parte aérea.

O suprimento de amônia nas folhas através da redução do nitrato é bem menor do que aquele potencialmente produzido pela fotorrespiração (OAKS, 1985), pelo menos nas plantas com metabolismo  $\text{C}_3$ .

Em folhas de aveia, durante o processo de esverdeamento de plântulas estioladas, YU & WOO (1991) observaram que as atividades de GS e GOGAT aumentaram o suficiente para sustentar a assimilação de  $\text{NH}_3$  produzido pela fotorrespiração, concluindo assim, que a via GS/GOGAT, constitui-se na principal, se não a única rota para assimilação de  $\text{NH}_3$  fotorrespiratória.

Quanto à absorção nitrogenada, a assimilação amoniacal em

tomate correspondeu a 80% de toda amônia absorvida. Por outro lado a assimilação de N-nítrico correspondeu a 115% do nitrato absorvido, resultado este justificado pela possível assimilação de nitrato endógeno. A absorção de amônia foi maior que a de nitrato, exceto quando concentrações relativamente altas de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  foram utilizadas.

WEISSMAN (1972) observou que nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônia ( $\text{NH}_4^+$ ) são igualmente efetivos no suporte de crescimento em soja (*Glycine max* var. *Bansei*) e girassol (*Helianthus annus* L. var. *Mammoth Russian*) jovens. Em raízes de ambas as espécies, a atividade de GDH foi muito maior na presença de amônia em relação a nitrato. Observou-se que as formas ativas dessa enzima em presença de amônia ou nitrato são NADH e NADPH dependentes. Em raízes de soja a amônia é ativamente incorporada em amidas sendo que a maior parte permanece nesse órgão. Nas raízes de girassol a formação de amidas é menos intensa, mas a maior parte, juntamente com amônia, é transportada para a parte aérea. Em relação a GS, sua atividade foi 20 a 40 vezes maior na parte aérea do que nas raízes.

Em *Anabaena* sp. linhagem CA foi observada alta atividade específica da GS em células crescidas em presença de  $\text{N}_2$  atmosférico ou  $\text{KNO}_3$  (13 mM) Quando  $\text{NH}_4\text{Cl}$  foi utilizado como fonte de nitrogênio a atividade reduziu aproximadamente 40% (STACEY et al., 1977).

Em *Cianidium caldarium*, RIGANO et al. (1981) observaram que condições limitantes de nitrogênio induzem os níveis de GS quando  $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NO}_3^-$  são utilizados como fonte exclusiva de nitrogênio. Condições de

excesso de  $\text{NH}_4^+$  reprimem a GS, enquanto que em condições de excesso de  $\text{NO}_3^-$  a atividade da GS permanece em valores intermediários.

HANDA et al. (1985) cultivando plântulas de milho em presença de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , e coletando amostras nos 3, 8, 13, 18 e 23 dias de cultivo depois da germinação, observaram aumento da taxa de crescimento da plântula a cada estágio de avaliação. Por outro lado, as atividades de GS e GOGAT permaneceram inalteradas, modificando-se apenas a partir do 18º dia, indicando que a assimilação de nitrogênio nos primeiros dias de crescimento seria consequência da atividade da GDH.

Em folhas de *Vigna mungo* L. HEPPEL., cultivado em diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ou  $\text{NH}_4^+$  (1,0; 2,0; 4,5; 10,0 e 20,0 mM), foi detectada baixa atividade da GS (SINGH et al., 1986). Contudo, as atividades da GOGAT e GDH foram mais altas quando as plantas foram cultivadas nos níveis mais baixos (1,0; 2,0; 4,5 mM).

Em raízes de milho, ANGHINONI et al. (1988), observaram que a atividade da GS aumentou com o aumento do nível de  $\text{NH}_4^+$  no solo até o nível de 3 mM. Quanto à GDH, sua atividade aumentou até o nível de 1,5 mM de  $\text{NH}_4^+$ , permanecendo constante a partir de então. Observaram ainda, uma correlação direta entre atividade da GS, absorção amoniacal e crescimento.

Na mesma cultura, MAGALHÃES & HUBER (1989) observaram maior atividade da GS e GDH nas raízes. Quando o valor pH do meio foi corrigido pela adição de  $\text{CaCO}_3$  ocorreu um aumento da atividade da GS

foliar, enquanto que nas raízes a atividade, tanto de GS quanto de GDH, decresceu. Os autores concluíram que a queda do valor pH, consequente da absorção de  $\text{NH}_4^+$ , estimula a atividade de GS. LUXOVA (1988) observou que esse aumento de atividade da GS ocorre principalmente nas regiões de crescimento das raízes.

Também em milho, WATANABE et al. (1985) observaram que a atividade da GOGAT aumentou logaritmicamente com aumentos da concentração de  $\text{NO}_3^-$ . A atividade da GS pouco variou, e a atividade da GDH decresceu exponencialmente. Houve correlação altamente positiva entre atividade da GS e GOGAT e produção de biomassa, e negativa para a atividade da GDH.

GONZALEZ-BRAVO & MAESO (1987), observaram um aumento de atividade da GDH paralelamente ao aumento da síntese proteica em cotilédones de *Citrullus vulgaris* cultivados em presença de  $\text{NH}_4^+$ .

ARNOZIS et al (1988), observaram um crescimento paralelo ao aumento de atividade da GS em raízes de cinco espécies diferentes: *Beta vulgaris*, *Helianthus annuus*, *Zea mays*, *Triticum aestivum* e *Lycopersicum esculentum* cultivadas na presença de  $\text{NH}_4^+$ .

Em raízes e folhas de *Plantago ssp.* cultivado em presença de amônia, observou-se aumento de atividade da GDH. Quando as plantas foram cultivadas em presença de  $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$  e transferidas para um meio com amônia, ocorreu um aumento na atividade da GS. A concentração proteica não foi afetada pela troca das fontes nitrogenadas (BLACQUIERE

et al., 1988).

Em milho, TA & CHANH (1991), observaram um decréscimo na atividade da GS quando as plantas foram transferidas de condições deficientes para condições ricas em nitrogênio. Quando as plantas foram novamente transferidas para condições isentas de nitrogênio ocorreram aumentos na atividade da enzima. Somando-se a outros resultados, os autores concluíram que a glutamina é a principal forma de nitrogênio translocável em milho, sendo a GS, a principal enzima responsável pela translocação de nitrogênio da planta para a espiga.

SANTOS & SALEMA (1992) estudaram as atividades da GDH, GS e GOGAT em *Kalanchoe laterita* ENGL., uma crassulácea com metabolismo ácido. As plantas foram cultivadas em solução de HOAGLAND & ARNON, (1950) sem nitrogênio, com 1/5 e 1/10 da quantidade original, e com a solução completa. As atividades da GS e da fd-GOGAT foram similares, aumentando com o aumento da disponibilidade de nitrogênio. A atividade da NADH-GOGAT flutuou durante o dia, o mesmo ocorrendo com as NADH e NADPH-GOGAT, cujas atividades não variaram com os níveis de nitrogênio, embora sendo baixas nas soluções com 1/10 do nutriente. Os resultados mostraram que a atividade de todas as enzimas analisadas variaram, exceto a NADH-GDH mitocondrial.

A atividade das enzimas GDH, GS e GOGAT pode variar com a combinação da disponibilidade de nitrogênio no meio bem como com o estágio de desenvolvimento da planta. Sendo assim, KUBIK-DOBOSZ (1991)

estudou a atividade da GDH, GS e GOGAT nos ramos, folhas e raízes de *Pisum arvense* L. aos sete e quatorze dias de cultura, na presença de amônia ou nitrato. A atividade da GS foi maior nas folhas (20%) e bem maior na presença de amônia do que em presença de nitrato (27-74%). NADH-GDH teve maior atividade nas raízes com aumento marcante nas folhas de plantas com 14 dias de cultivo na presença de amônia. A fd-GOGAT teve alta atividade nas folhas e ramos. Contudo, na presença de amônia, a atividade nas raízes foi bastante aumentada.

Finalizando, HOELZLE et al. (1992) observaram aumentos significativos na atividade da GS em três espécies diferentes : *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* e *Pisum sativum*, não noduladas, e nutridas com 10 mM de  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Análises de "western blot" mostraram um nível substancial de GS em extratos de raízes com atividade mínima, sugerindo que essa forma nativa pode estar presente em plantas cultivadas em condições isentas de nitrogênio.

#### 2.4.1. Os efeitos das fontes de nitrogênio sobre a GDH, GS e GOGAT em plantas cultivadas "in vitro".

As fontes nitrogenadas exógenas dos meios de cultura artificiais, ocorrem na maioria das formulações estabelecidas, através de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )

e amônia ( $\text{NH}_3$ ), na forma de sais inorgânicos. Em outro grande número de formulações foram experimentadas fontes orgânicas, basicamente nas formas de amidas e aminas, dentre as quais, as mais utilizadas e com respostas positivas se enquadram os aminoácidos arginina, asparagina, ácido aspártico, alanina, prolina, ácido glutâmico e, principalmente, a amida glutamina.

Essas variadas fontes utilizadas em combinações e concentrações específicas, induzem as mais variadas respostas morfogênicas ou organogênicas, que por sua vez são dependentes das condições de cultivo, explantes utilizados, espécies, variedades e muitos outros fatores (GEORGE et al., 1988; CALDAS et al., 1990). Contudo, poucos trabalhos têm explorado o efeito dessas substâncias sobre o comportamento das enzimas como aquelas ligadas ao metabolismo básico do nitrogênio.

CHIU & SHARGOOL (1979) cultivaram células de soja em suspensão em meio  $B_5$  de Gamborg (GAMBORG et al., 1968), modificado em relação as concentrações e fontes de nitrogênio (0,2 a 100 mM de  $\text{KNO}_3$ , 0,2 a 100 mM de glutamina ou 0,2 a 100 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Amostras para análise foram colhidas com 24, 48 e 96 horas de cultivo. Observou-se que o crescimento das células ficou confinado a baixas concentrações de nitrato, amônia ou glutamina. As atividades da GS e GOGAT variaram em concordância ao padrão de crescimento das células, ou seja, um ótimo crescimento da cultura foi acompanhado por altas atividades dessas enzimas. Em contraste, a atividade específica da GDH não

variou significativamente em relação às respostas de crescimento da cultura, impostas pelas diferentes concentrações das diferentes fontes nitrogenadas.

JIMÉNEZ & FERNÁNDEZ (1983) cultivaram calos obtidos a partir de folhas (L-calos) e de raízes (R-calos) de *Bouvardia ternifolia schlecht* em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com diferentes fontes nitrogenadas. A formulação original do meio MS, com 20 mM de  $\text{NH}_4^+ \text{NO}_3^-$  mais 20 mM de  $\text{KNO}_3$ , foi utilizada como um dos tratamentos.

Em presença de glutamina 5 mM, os diferentes calos mostraram um retardamento no crescimento. Em asparagina 5 mM, o crescimento de R-calos foi bastante afetado, e o crescimento de L-calos foi semelhante ao ótimo crescimento obtido com a formulação original de MS. Em presença de  $\text{NO}_3^-$  20 mM houve um bom crescimento. O teor de proteínas nesses tratamentos correlacionou-se com o padrão de crescimento dos calos.

Amônia (10 mM) mais citrato (5 mM), glutamato (10 mM),  $\text{KNO}_3$  (20 mM) ou  $\text{KNO}_3$  (20 mM) mais  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mM) apresentaram baixo crescimento e baixo teor proteico.

A atividade específica da GS não foi detectada em nenhum calo cultivado em presença de amônia como única fonte de nitrogênio. Contudo, quando a amônia foi associada com qualquer dos intermediários do Ciclo de Krebs (succinato, malato ou citrato), os níveis de atividade voltaram aos níveis observados nos calos cultivados na formulação original do meio MS.

A atividade da GOGAT foi a mais drasticamente afetada pelas

diferentes fontes de nitrogênio. Na presença exclusiva de amônia, a atividade da enzima desapareceu em ambos L-calos e R-calos. Em amônia mais succinato observou-se alguma atividade somente em R-calos. Em presença de glutamina, a atividade decresceu em R-calos e aumentou em L-calos. O inverso foi observado em presença de nitrato, onde em L-calos houve alta atividade, e baixa atividade em R-calos.

Em relação à atividade da GDH, cada tecido mostrou um padrão de atividade. Na presença exclusiva de amônia, a atividade não foi afetada como foi verificado em L-calos. Em presença de intermediários do Ciclo de Krebs mais amônia observou-se significativa redução da atividade da enzima em ambos os calos. Nitrato mais glutamina ou asparagina não modificou a atividade da enzima em R-calos, reduzindo-a bastante em L-calos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Cultivo de Eixos Embrionários**

##### **3.1.1. Desinfecção dos eixos embrionários**

Sementes de feijoeiro, *Phaseolus vulgaris* L., cultivar carioca SH 80-lote 315/93 - com um padrão de desidratação comercial com umidade em torno de 10%, sementes estas fornecidas pela Seção de Leguminosas do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC. As sementes foram selecionadas manualmente e delas foram isolados os eixos embrionários.

Em câmara asséptica de fluxo laminar, os eixos embrionários foram desinfectados preliminarmente por cinco maneiras diferentes.

1 - Álcool 75% v/v por 1 minuto e enxaguados três vezes com água desionizada esterilizada.

2 - Álcool 75% v/v por 5 minutos e enxaguados três vezes com água desionizada esterilizada.

3 - Hipoclorito de sódio 20% v/v preparado a partir do produto comercial Q.Boa, por 1 minuto e enxaguados três vezes com água desionizada esterilizada.

4 - Hipoclorito de sódio 20% v/v, preparado a partir do produto comercial Q.Boa, por 5 minutos e enxaguados três vezes com água desionizada esterilizada.

5 - Hipoclorito de sódio 20% v/v, preparado a partir do produto comercial Q.Boa, por 5 minutos e enxaguados, uma vez com água desionizada esterilizada, uma vez com HCl 0,01 N e mais três vezes com água desionizada esterilizada.

Após avaliação dos primeiros resultados optou-se pela primeira metodologia que utiliza álcool 75% v/v por 1 minuto, e esta foi usada para a elaboração dos experimentos.

### **3.1.2. Meios de cultura**

No preparo dos meios de cultura utilizou-se a formulação de MURASHIGE & SKOOG (1962) (MS) variando-se as fontes nitrogenadas.

O experimento consistiu de seis tratamentos diferentes onde as fontes nitrogenadas da fórmula de MS, 20,6 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e 18,8 mM de  $\text{KNO}_3$  foram substituídas em iguais proporções de nitrogênio, da seguinte forma:

$T_1$  -  $\text{NH}_4^+$  +  $\text{NO}_3^-$ : 20,6 milimoles de N-amoniacoal mais 39,4 milimoles de N-nítrico foram mantidos de acordo com a formulação original de MURASHIGE & SKOOG (1962).

T<sub>2</sub> - NO<sub>3</sub> + Gln: 20,6 milimoles de N-amoniacoal foram substituidos por 20,6 milimoles de N-glutamínico.

T<sub>3</sub> - NH<sub>4</sub> + Gln: 39,4 milimoles de N-nítrico foram substituidos por 39,4 milimoles de N-glutamínico. Os 18,2 milimoles de potássio da fórmula KNO<sub>3</sub> foram supridos na forma de KCl.

T<sub>4</sub> - Gln : 60 milimoles de nitrogênio - 20,6 milimoles de N-amoniacoal mais 39,4 milimoles de N-nítrico foram substituidos por N-glutamínico.

T<sub>5</sub> - NO<sub>3</sub> : 60 milimoles de nitrogênio da formulação do meio foram supridos por 60 milimoles de N-nítrico.

T<sub>6</sub> - N-isento : Não houve adição de nitrogênio.

O balanço nutricional, principalmente a compensação de potássio nos tratamentos que não receberam N-nítrico (A) e a formulação original de MS para os outros nutrientes (B e C), são mostrados a seguir:

#### A - Modificações na composição de nitrogênio

	TRATAMENTOS - mMOLES NITROGÊNIO/LITRO					
	1	2	3	4	5	6
	- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	- NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +Gln	- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> +Gln	- Gln	- NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	- N-isento
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20,6	20,6	-	-	-	-
KNO <sub>3</sub>	-	18,8	-	-	18,8	-
Glutamina	-	-	20,6	39,4	60,0	-
NH <sub>4</sub> Cl	-	-	20,6	-	-	-
KCl	-	-	18,8	-	18,8	18,8
NaNO <sub>3</sub>	-	20,6	-	-	41,2	-
TOTAL	60,0	60,0	60,0	60,0	60,0	0,00

\*Adição de 18,8 mM de K<sup>+</sup> na forma de KCl corrigindo as formulações que não receberam KNO<sub>3</sub>,

**B - Complementação nutricional inorgânica da formulação de MS comuns a todos os tratamentos (mMoles/l)**

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,25
KI	0,005
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,100
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,100
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,030
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,001
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0001
$\text{CoCl}_2$	0,0001
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	0,100
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,100

**C - Concentração orgânica da formulação de MS comuns a todos os tratamentos (mg/l)**

Tiamina	0,1
Piridoxina	0,5
Ácido Nicotínico	0,5
Mio-Inositol	100
Sacarose	30000

Os meios de cultura, depois de adicionados todos os nutrientes, tiveram seu valor pH ajustado para 5,7 e foram semi-solidificados com 2,3 g/l de gel-rite-gellagum, da SCHEIYZERHALL, N.J.

Depois de totalmente prontos, os meios foram distribuídos em frascos de vidro com capacidade aproximadamente de 300 ml com 60 ml em cada frasco. Foram tampados com papel alumínio, espessura extra-cozinha profissional, e esterilizados em autoclave horizontal, FABBE modelo 104, por 20 minutos a 120°C e 1 ATM de pressão.

Em cada frasco foram inoculados seis eixos embrionários, devidamente desinfetados, incubados em sala de crescimento com temperatura de 25°C  $\pm$  5, luminosidade aproximada de 1500 lux propiciada por lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia e fotoperiodismo de 14/10 horas (claro/escuro).

O material foi colhido e analisado no 5º, 10º e 15º dia de cultivo, sendo analisados também parcelas de eixos embrionários antes da inoculação, constituindo estes, o tempo zero de cultivo.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados e estatisticamente analisado como parcelas sub-divididas.

Nas análises do material cultivado foram determinados o teor de proteínas solúveis totais, as atividades específicas das enzimas GDH, GS e GOGAT, porcentagem de matéria seca e o incremento de massa de matéria fresca.

## **3.2. Análise do Material Cultivado**

### **3.2.1. Determinação do incremento de massa de matéria fresca (IMMF)**

O incremento de massa de matéria fresca (IMMF) no material cultivado, nos quatro tempos de cultivo, foi feito baseado na massa de matéria fresca dos eixos embrionários intactos, correspondentes ao tempo zero de cultivo. Para tanto, o material cultivado em cada tratamento, em cada tempo de cultivo, foi colhido sempre no período da manhã, limpo para retirada de resíduos do meio de cultura, pesado e subtraído o peso fresco inicial do eixo embrionário evidenciando assim o IMMF em miligramas.

Partes da matéria fresca foram destinadas às determinações de massa de matéria seca, teores proteicos e atividades enzimáticas.

### **3.2.2. Determinação da porcentagem de matéria seca (% MS)**

Quantidades conhecidas de matéria fresca foram secadas em estufa FANEM modelo 001-M/1, a 50°C por 48 horas. O peso seco final foi

subtraído a partir do peso fresco inicial, considerado 100%, evidenciando assim a %MS.

Parte da matéria seca obtida foi destinada à determinação de nitrogênio total.

### **3.2.3. Determinação do teor de nitrogênio total**

A determinação do nitrogênio total foi feita pelo processo de KJELDAHL, que determina o nitrogênio amoniacal total dos vegetais. Para tanto, amostras de 100 mg de matéria seca foi digerida por 7 ml da seguinte solução digestora:

175 ml de água destilada

3,6 g de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

4,0 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

48,5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

200 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado

O teor de nitrogênio das amostras foi expresso em porcentagem de N/grama de matéria seca.

### **3.2.4. Preparo dos extratos**

De cada tratamento, nos quatro tempos de cultivo, com plântulas

em diferentes estádios de desenvolvimento, foi retirado 1 g de material fresco e homogeneizado por 2 minutos em almofariz acondicionado em recipiente com gelo moído. Cada grama de material foi inicialmente homogeneizado em 2 ml de tampão e transferidos para tubos de centrífuga. Os resíduos de extrato foram recuperados com mais 3 ml de tampão finalizando com a proporção de 5 ml de tampão para 1 g de matéria fresca.

O tampão utilizado foi TRIS-HCl 50 mM, pH 7,5 acrescentado de  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM e EDTA 1 mM.

O material homogeneizado foi centrifugado, primeiramente a 10.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi novamente centrifugado por mais 5 minutos e utilizado como extrato nas análises bioquímicas. A centrifugação foi conduzida a 0°C em centrífuga refrigerada SORVAL modelo RC5C com rotor SM-24.

Ao final, o extrato foi mantido em banho com gelo e imediatamente utilizado para determinação do teor proteico e atividades enzimáticas.

### **3.2.5. Determinação do teor de proteínas solúveis totais.**

A determinação do teor de proteínas foi feita pelo método de BRADFORD (1976), e foi realizada nos extratos preparados com tampão TRIS. Para tanto, utilizou-se 0,1 ml do extrato diluído cinco vezes

acrescentado de 5 ml do reagente de BRADFORD, resultando numa mistura colorida, que foi lida a 595 nm em espectrofotômetro HITACHI Modelo U-3210.

O reagente de BRADFORD foi preparado com 100 mg de COMASSIE BRILLIANT BLUE G-250 dissolvidos em 50 ml de etanol 95%, 100 ml de  $H_3PO_4$  85%. O volume da mistura foi aferido para 1 litro e filtrado duas vezes em filtros de papel qualitativo da marca REAGEN.

O teor de proteínas das amostras foi calculado a partir de uma curva padrão feita com albumina de soro bovino (BSA) (sigma) e expresso em mg/g de matéria fresca.

### **3.2.6. Determinação da atividade da Desidrogenase de Glutamato (GDH)**

A atividade específica da Desidrogenase de Glutamato foi medida pelo método de JOY (1971).

A reação enzimática foi conduzida sob agitação contínua em banho maria a 30°C e formada por: 0,5 ml de tampão TRIS-HCl 200 mM, pH 8,3; 0,5 ml de  $NH_4Cl$  200 mM pH 7,2; 0,5 ml de  $\alpha$ -cetogluturato 30 mM pH 6,5; 0,1 ml de  $\beta$ -NADH 7,5 mM; 0,3 ml de extrato e água desionizada totalizando um volume de 2 ml.

A reação foi iniciada com a adição de  $\beta$ -NADH e a atividade foi

calculada a partir do decréscimo de absorvância, a 340 nm em espectrofotômetro HITACHI modelo U-3210.

A atividade específica foi expressa em  $\mu$ Moles de NADH consumido por hora por miligrama de proteína ( $\mu$ M NADH/h/mg proteína).

### **3.2.7. Determinação da atividade da Sintase do Glutamato (GOGAT).**

A atividade específica da Sintase de Glutamato foi medida pelo método de BEEVERS & STOREY (1976).

A reação enzimática foi conduzida sob agitação contínua em banho maria a 30°C e continha 0,5 ml de tampão TRIS-HCl 50 mM pH 7,5; 0,5 ml de  $\alpha$ -cetogluturato 30 mM; 0,5 ml de glutamina 30 mM; 0,1 ml de  $\beta$ -NADH 7,5 mM; 0,3 ml de extrato e água desionizada totalizando um volume de 2 ml.

A reação foi iniciada com a adição de  $\beta$ -NADH e a velocidade foi calculada a partir do decréscimo de absorvância a 340 nm em espectrofotômetro HITACHI modelo U-3210.

A atividade específica foi expressa em  $\mu$ M de NADH consumido por hora por miligrama de proteína ( $\mu$ M NADH/h/mg proteína).

### **3.2.8. Determinação da atividade da Sintetase de Glutamina (GS).**

A atividade específica da Sintetase de Glutamina foi medida pelo método de ELLIOT (1953). O método explora a atividade biossintética da enzima formando  $\gamma$ -glutamilhdroxamato.

A reação foi conduzida sob agitação contínua em banho maria a 30°C e continha 0,5 ml de tampão TRIS-HCl 200 mM, pH 7,5, 0,2 ml de ATP 50 mM, pH 7,0; 0,5 ml de glutamato de sódio 500 mM; 0,1 ml de MgSO<sub>4</sub> 1M, 0,1 ml de cisteína 100 mM; 0,3 ml de hidroxilamina 100 mM, pH 7,0; 0,3 ml de extrato; totalizando um volume de 2 ml.

A reação foi interrompida pela adição de 2 ml de reagente de cloreto férrico - FeCl<sub>3</sub>(10%)/TCA(24%)/HCl(6N), 1:1:1 - formando um complexo marrom-amarelado com precipitados. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 3000 g e no sobrenadante foi feita a leitura colorimétrica para detectar a formação de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato.

A leitura foi feita a 540 nm em espectrofotômetro HITACHI modelo U-3210. O cálculo da atividade enzimática foi feito a partir da comparação da leitura com uma curva padrão previamente preparada e expresso em  $\mu$ Moles de  $\gamma$ -glutamilhdroxamato produzido por hora por miligrama de proteínas ( $\mu$ M de  $\gamma$ - glutamilhdroxamato/h/mg proteínas).

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O comportamento das médias de três repetições das variáveis teores de proteínas solúveis totais; atividade específica da GDH, GS e GOGAT; porcentagem de nitrogênio total (% total); porcentagem de matéria seca (%MS) e incremento de massa de matéria fresca (IMMF); foram determinados nos eixos embrionários aos zero, cinco, dez e quinze dias de cultivo. As médias foram analisadas estatisticamente e submetidas ao teste de TUKEY ao nível de 5% de significância.

Considerando que nas determinações realizadas no tempo zero foram utilizadas as mesmas amostras, ou seja, eixos embrionários intactos, secos, isolados de sementes também secas, os valores das variáveis testadas nesse tempo serão apresentadas separadamente das respostas obtidas no quinto, décimo e décimo quinto dia de cultivo.

Por ser importante na avaliação de outras variáveis, o crescimento da cultura nos diferentes tratamentos foi analisado visualmente e registrado fotograficamente.

#### 4.1. Desenvolvimento da cultura

Uma visão geral do desenvolvimento dos eixos embrionários submetidos aos diferentes tratamentos, nos diferentes tempos de cultivo, é mostrada na Figura 1. Observa-se pela figura que os melhores desenvolvimentos ocorreram nos tratamentos que receberam nitrato exclusivamente ou combinado com amônia ou com glutamina. Por outro lado, o tratamento que não recebeu nitrogênio e aqueles que receberam nas formas de glutamina exclusivamente ou combinado com amônia apresentaram desenvolvimento praticamente desprezível.

Esses resultados contradizem observações feitas por HU & FERREIRA (1990) que sugerem a glutamina como uma substância bastante efetiva no estímulo ao crescimento de embriões "in vitro".

Contudo, essa contradição de resultados se justifica possivelmente pelas condições nas quais foi desenvolvido esse trabalho, principalmente no que diz respeito à espécie utilizada (*Phaseolus vulgaris*), à concentração de glutamina usada (10 mM), e principalmente à preparação dos meios de cultura, onde toda solução nutritiva foi submetida à autoclavagem.

GEORGE et al. (1988), também considera a glutamina como um dos aminoácidos mais efetivos no estímulo ao crescimento e efetivamente mais utilizado em culturas "in vitro". No entanto, o Autor ressalta a necessidade de esterilização dessa substância separadamente dos outros

nutrientes através de filtração e não autoclavagem, pois, temperaturas acima de 100 °C a glutamina é convertida em ácido pirrolidino carboxílico.

Sendo assim, o pouco desenvolvimento nos tratamentos que receberam amônia e/ou glutamina pode ser justificado pela deficiência de nitrogênio no meio de cultura, consequência da termodegradação da glutamina, e talvez também pela volatilização da amônia, ambos proporcionados pela temperatura de 120 °C por 20 minutos durante a autoclavagem.



FIGURA 1 - Aspectos do desenvolvimento dos eixos embrionários em cada tratamento aos cinco, dez e quinze dias.

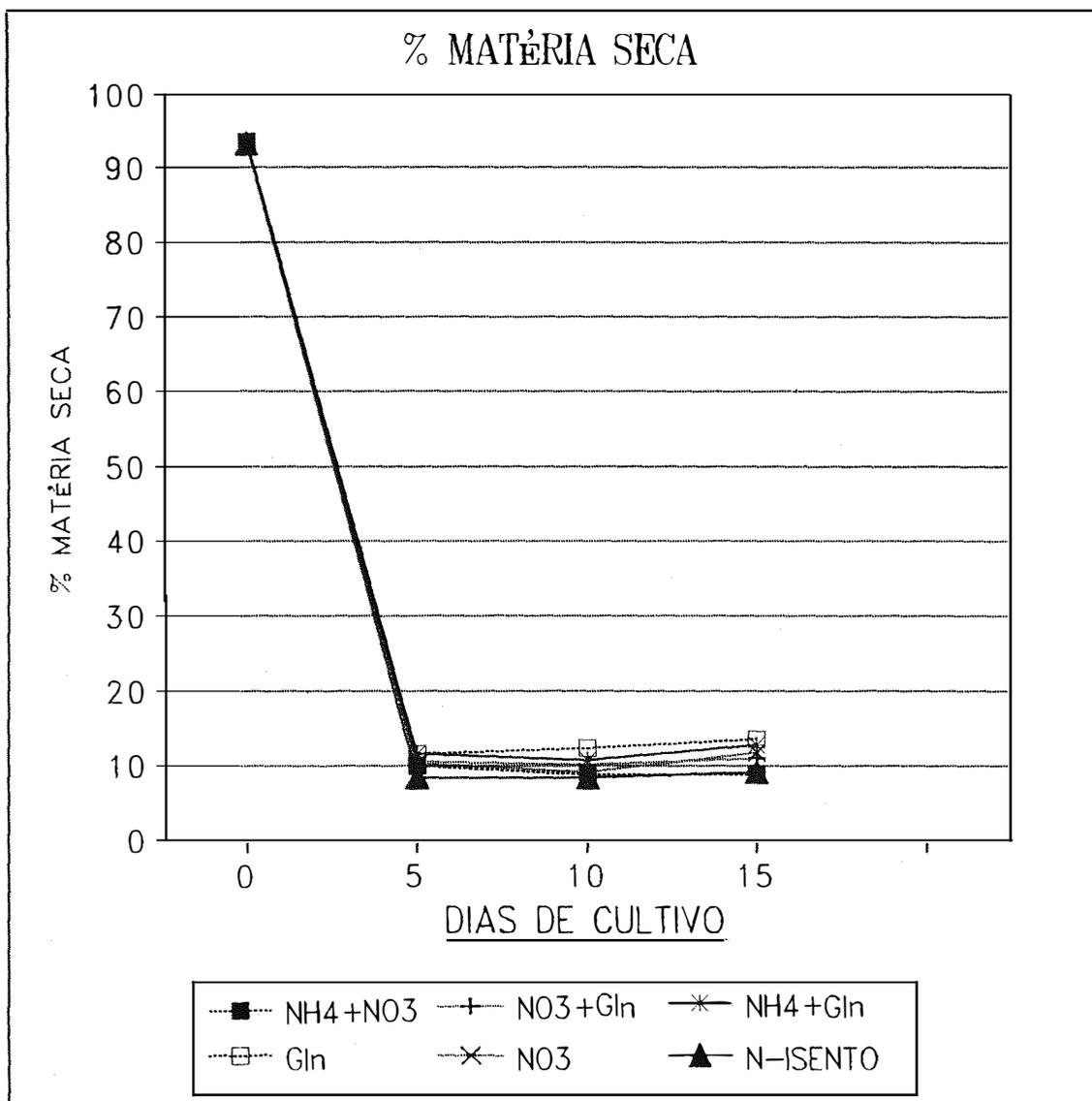
#### **4.2. %MS, IMMF, %N-total, teores de proteínas solúveis totais, atividade específica da GDH, GS e GOGAT no tempo zero de cultivo.**

Nos eixos embrionários correspondentes ao tempo zero de cultivo, quando foram utilizados eixos embrionários intactos, observa-se percentuais relativamente mais altos de matéria seca (Figura 2). Por outro lado, no IMMF (Figura 3) observa-se o inverso, ou seja, valores relativamente baixos.

Os valores inversos dessas duas variáveis, onde a %MS apresenta um valor inicial em torno de 92%, mostrando que o órgão analisado se constitui basicamente de matéria seca, e que o IMMF parte de um valor quase nulo. Esses fatos podem ser justificados pelos processos de embebição e reidratação dos eixos embrionários, ocorrência esta, comentada e exemplificada por BRYANT (1989), que observou um aumento de peso fresco em torno de 200 vezes em eixos embrionários de ervilha durante as primeiras quarenta horas de germinação. Quanto à %MS, considerando as condições de desidratação, tanto dos eixos embrionários como das sementes, os referidos órgãos inoculados nos meios de cultura, considerados semi-sólidos, ocorre uma embebição inicial relativamente volumosa. Essa condição determina aumento na relação água/matéria seca, decrescendo conseqüentemente à %MS, o que favorece acentuadamente o IMMF.

Quanto aos teores de nitrogênio total (Figura 4) e proteínas solúveis totais (Figura 5), observa-se que os mais altos teores destas duas variáveis ocorreram no tempo zero de cultivo. Observa-se ainda que as atividades específicas das enzimas GDH, GS e GOGAT (Figuras 6, 7 e 8) apresentaram-se com valores intermediários em relação aos outros tempos de cultivo. Essas observações deixam claro a existência dessas enzimas em eixos embrionários intactos, isolados de sementes secas de feijoeiro que, segundo BRYANT (1989), se encontram em estado desidratado, quiescente e com metabolismo quase nulo, e que no eixo embrionário também ocorre armazenamento de substâncias de reservas, as quais sustentarão o embrião no início de germinação.

Nessas condições, quando os eixos embrionários foram submetidos às determinações analíticas, a GS apresentou uma atividade ligeiramente maior que a GDH, que por sua vez foi quase três vezes mais alta que a atividade da GOGAT. Essas atividades relativamente altas das três enzimas foram expressas graças, presumivelmente, às condições que lhes foram dadas, ou seja, condições aquosas com a presença de todas as substâncias necessárias.



**FIGURA 2 -** Porcentagem de matéria seca (%MS) nos eixos embrionários em cada tratamento utilizado com zero, cinco, dez e quinze dias de cultivo.

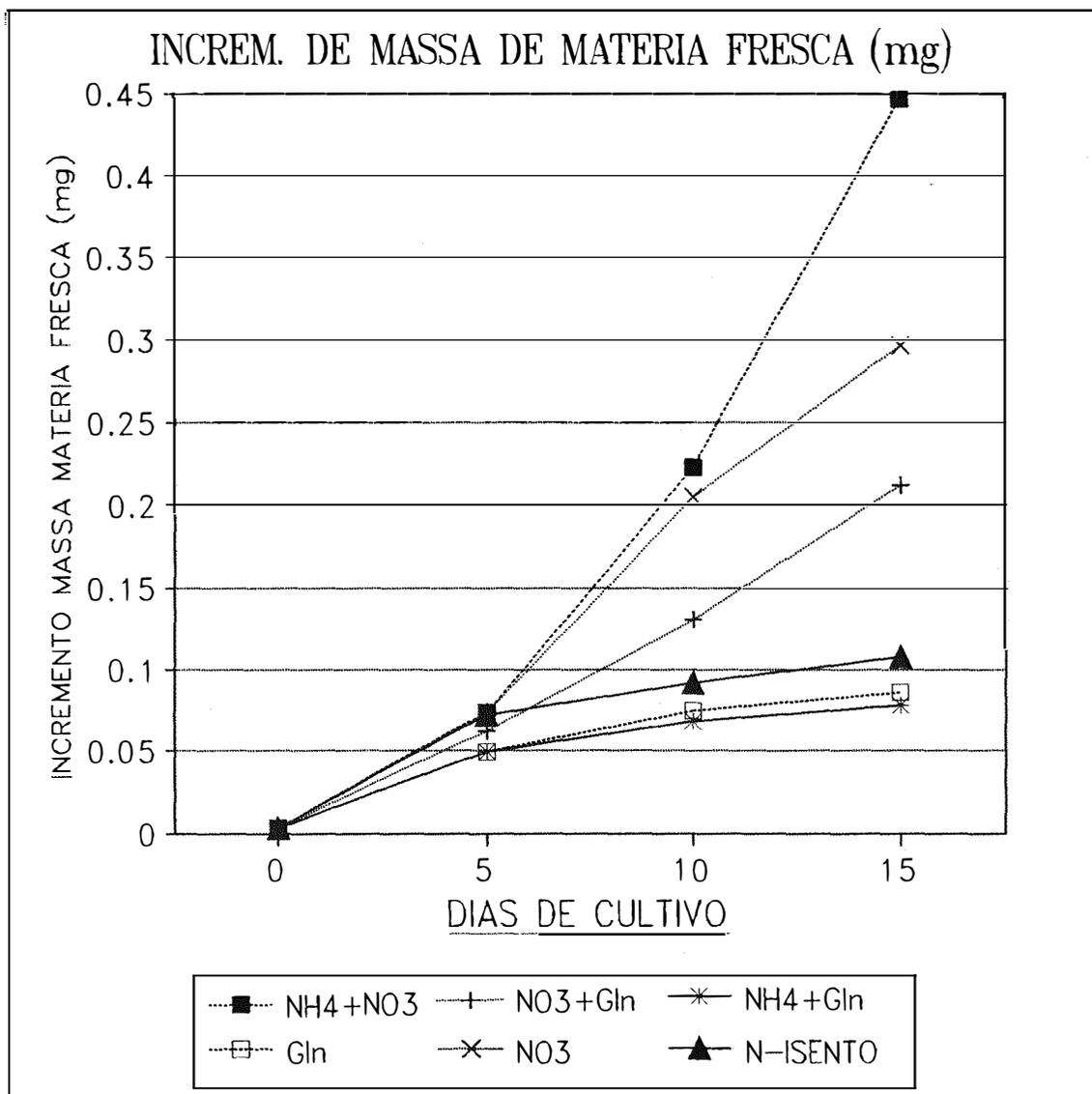
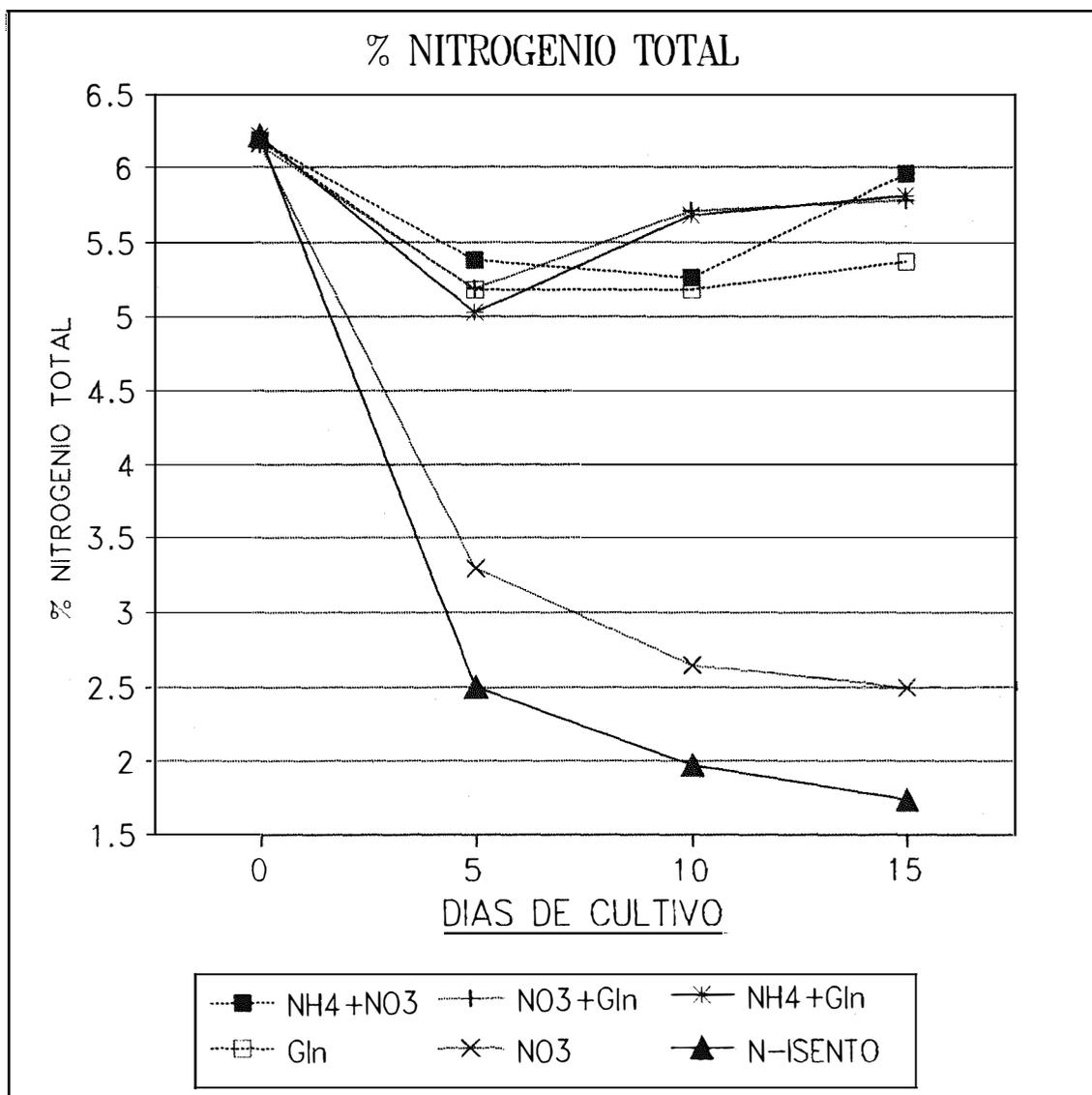
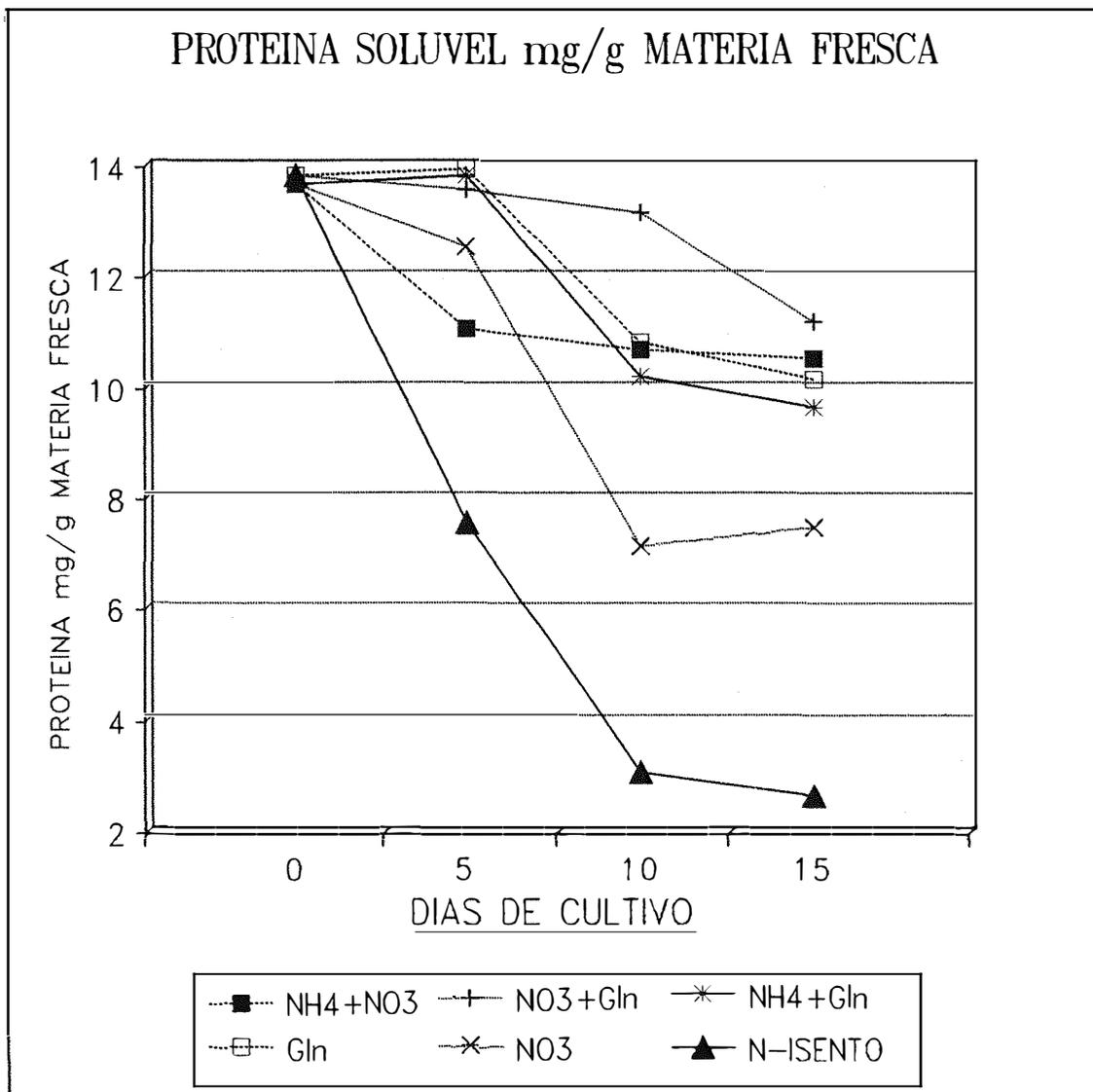


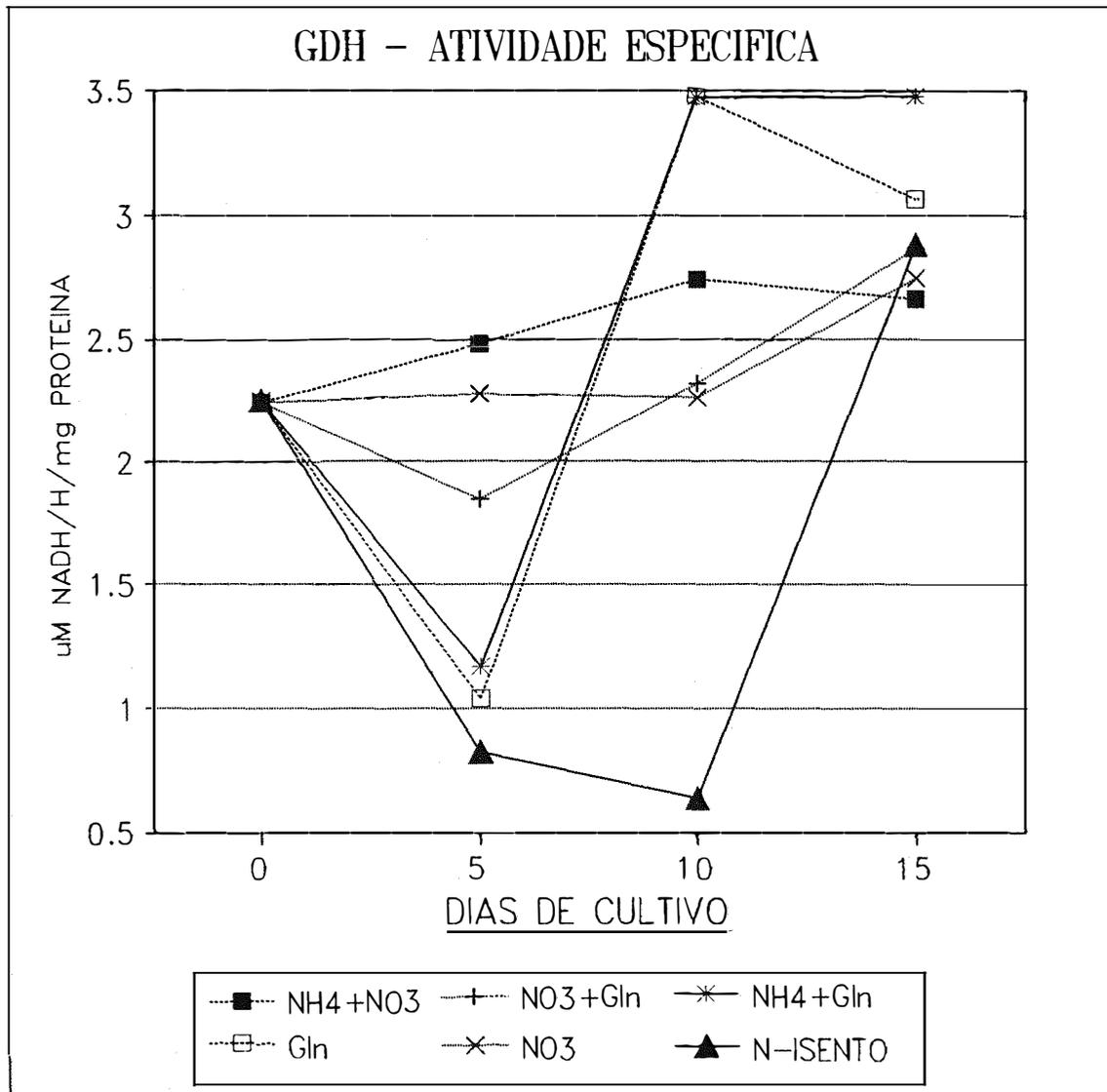
FIGURA 3 - Incremento de massa de matéria fresca (IMMF) nos eixos embrionários em cada tratamento utilizado com zero, cinco, dez e quinze dias de cultivo.



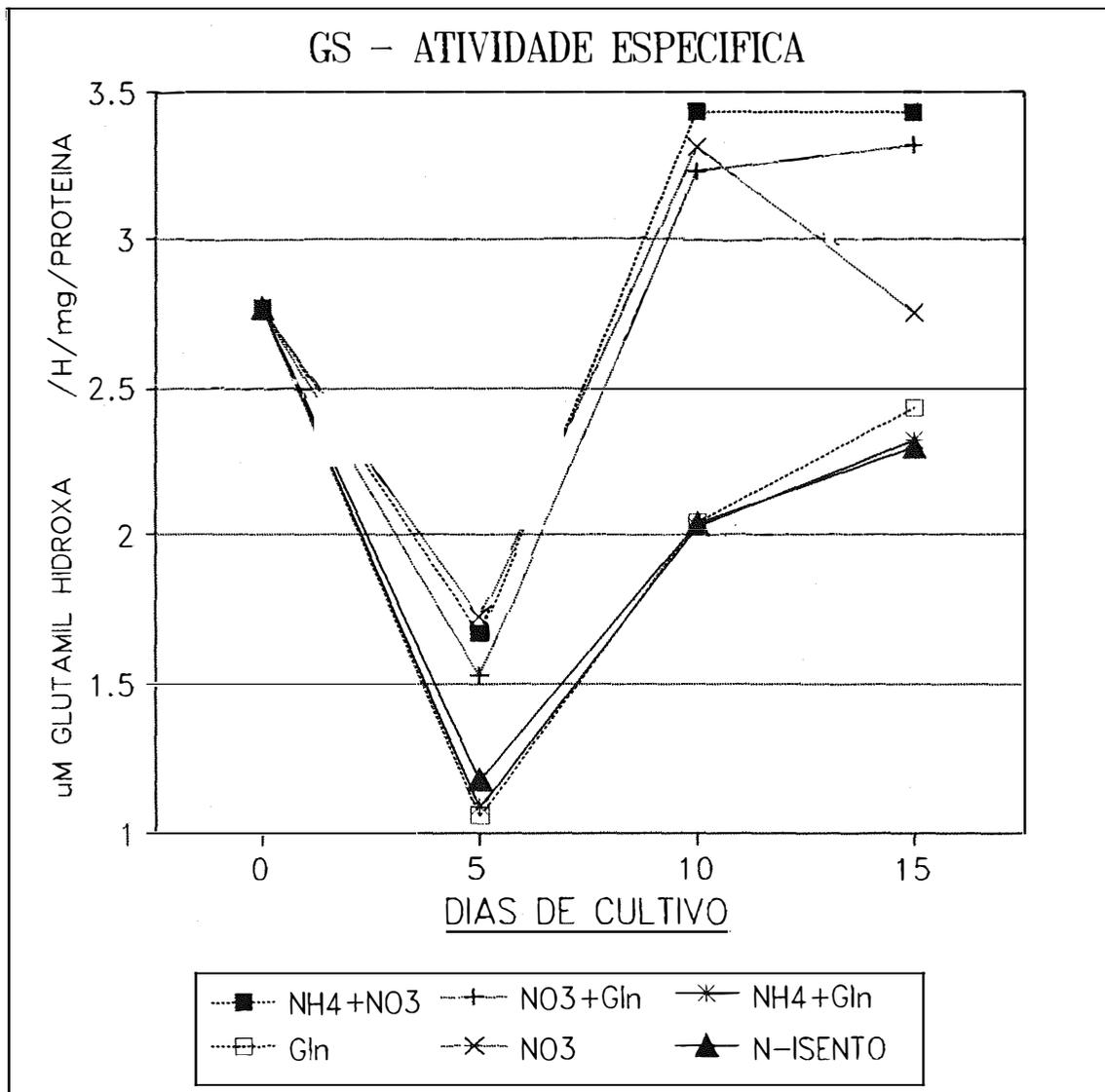
**FIGURA 4 - Porcentagem de nitrogênio total na matéria seca (%N-total) nos eixos embrionários, em cada tratamento utilizado com zero, cinco, dez e quinze dias de cultivo.**



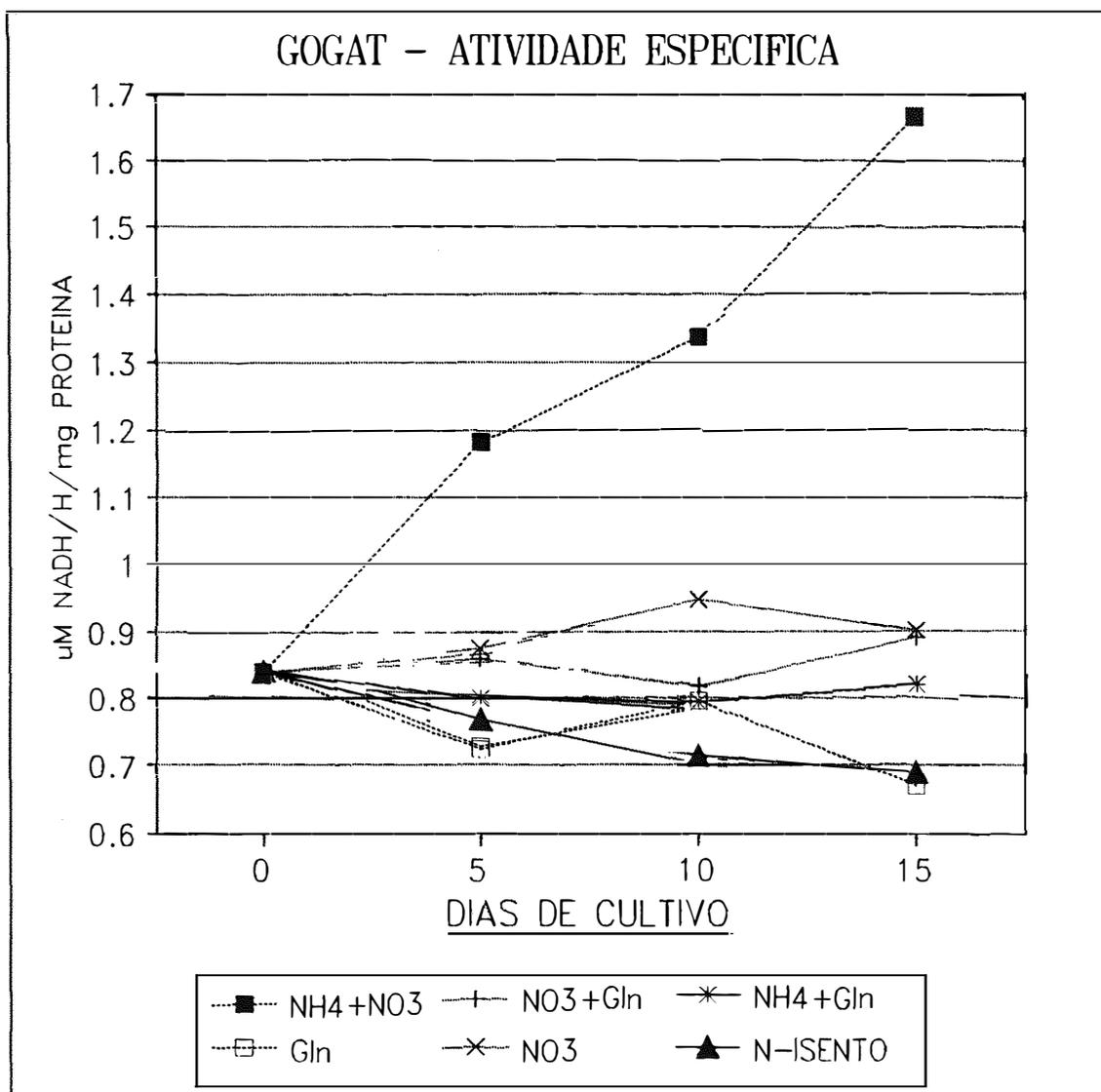
**FIGURA 5 - Teores de proteínas solúveis totais nos eixos embrionários em cada tratamento utilizado com zero, cinco, dez e quinze dias de cultivo.**



**FIGURA 6 - Atividade específica da Desidrogenase de Glutamato (GDH) nos eixos embrionários em cada tratamento utilizado com zero, cinco, dez e quinze dias de cultivo.**



**FIGURA 7 -** Atividade específica da Sintetase de Glutamina (GS) nos eixos embrionários em cada tratamento utilizado com zero, cinco, dez e quinze dias de cultivo.



**FIGURA 8 -** Atividade específica da Sintase de Glutamato (GOGAT) nos eixos embrionários em cada tratamento utilizado com zero, cinco, dez e quinze dias de cultivo.

### **4.3. Porcentagem de matéria seca (%MS)**

A variação da porcentagem de matéria seca em cada tratamento nos quatro tempos de cultivo, mostrada na Figura 2, observa-se no quinto dia de cultivo que os valores percentuais de matéria seca apresentaram diferenças, apesar de relativamente baixa, mas significativa entre alguns tratamentos. Sendo assim, o tratamento sem nitrogênio mostrou o mais baixo percentual, acompanhado pelo tratamento que recebeu nitrogênio na forma de nitrato mais amônia, que por sua vez foi diferente dos tratamentos que receberam nitrogênio na forma de amônia mais glutamina ou na forma exclusiva de glutamina.

No décimo e no décimo quinto dia de cultivo, as diferenças permaneceram semelhantes às do quinto dia. Nesses períodos, os maiores valores de %MS ocorreram nos tratamentos que receberam somente glutamina ou glutamina mais amônia, deixando evidente que nessa cultura, nessas condições de cultivo e principalmente nesse estágio de desenvolvimento, que a glutamina determina um maior acúmulo de matéria seca. Entretanto, mais uma vez deve-se considerar a relação entre %MS e o padrão de crescimento da cultura em cada tratamento. Assim como na evolução da porcentagem de nitrogênio total, a %MS pode ser associada ao padrão de crescimento onde nos tratamentos com glutamina exclusivamente, ou combinada com amônia, o pouco crescimento não diluiu e não produziu, deixando concentrada a %MS.

#### **4.4. Incremento de massa de matéria fresca (IMMF)**

O incremento de massa de matéria fresca em cada tratamento, nos quatro tempos de cultivo é mostrado na Figura 3, onde no quinto dia de cultivo observa-se um IMMF significativo e semelhante para todos os tratamentos. Contudo, esse incremento ocorreu principalmente em consequência dos processos iniciais de embebição e reidratação dos eixos embrionários já discutidos no item 4.2.

No décimo dia de cultivo já fica clara a interferência dos tratamentos no IMMF. Sendo assim, observa-se um acentuado incremento nos tratamentos que, de alguma forma, receberam nitrogênio nítrico. O tratamento que recebeu amônia mais nitrato mostrou o melhor resultado no IMMF, acompanhado, mas com diferença significativa, pelo tratamento que recebeu exclusivamente nitrato. Na sequência, também com diferença significativa, vem o tratamento que recebeu nitrato mais glutamina.

Finalmente, com pouca variação depois do período inicial de embebição, estão os tratamentos que não receberam nitrogênio nítrico, ou sejam, o tratamento sem nitrogênio, o tratamento que recebeu somente glutamina e aquele que recebeu amônia mais glutamina.

Fica claro portanto, a existência de uma relação entre IMMF e o padrão de desenvolvimento da cultura (Figura 1) onde, nos tratamentos com bom crescimento e desenvolvimento de raízes, observa-se os maiores níveis de IMMF.

#### **4.5. Teores de nitrogênio total**

Os teores de nitrogênio total em cada tratamento utilizado, nos diferentes tempos de cultivo, são mostrados na Figura 4.

Na ausência de nitrogênio e no tratamento que recebeu nitrogênio na forma exclusiva de nitrato, observa-se em tais tratamentos, decréscimos semelhantes e significativo em relação aos demais. Os decréscimos foram acentuados inicialmente no quinto dia, sendo menos acentuados no décimo e décimo quinto dia de cultivo.

Nos tratamentos que receberam nitrogênio nas formas de amônia mais nitrato, nitrato mais glutamina, amônia mais glutamina, ou na forma exclusiva de glutamina, observa-se um ligeiro decréscimo de teores no quinto dia de cultivo, permanecendo mais ou menos estáveis no décimo e décimo quinto dia de cultivo. Contudo, observam-se ligeiros acréscimos no décimo dia nos tratamentos que receberam nitrato mais glutamina ou amônia mais glutamina. Tal acréscimo, no tratamento que recebeu amônia mais nitrato, ocorreu somente no décimo quinto dia de cultivo.

Comparando-se a evolução da porcentagem de nitrogênio total nos eixos embrionários ao longo do tempo, representada na Figura 4, quando comparada com o padrão de crescimento (Figura 1) nota-se que os maiores decréscimos ocorreram tanto no tratamento com ausência de nitrogênio, o que é obvio, quanto no tratamento que recebeu somente

nitrato. Neste caso, apesar da planta apresentar um bom crescimento sustentado pelo nitrato, observa-se pela Figura 1, claros sintomas de deficiência de nitrogênio, justificando a baixa porcentagem de nitrogênio.

A pequena variação da porcentagem de nitrogênio nos tratamentos que receberam amônia mais nitrato, nitrato mais glutamina, amônia mais glutamina e glutamina exclusivamente, cujos valores permaneceram relativamente alto e estáveis, podem também ser associados ao padrão de crescimento da cultura em cada tratamento. Sendo assim, a estabilidade do nível de N total nos tratamentos que receberam glutamina exclusivamente ou combinada com amônia pode ser explicada pelo não desenvolvimento da cultura nesses tratamentos, não ocorrendo conseqüentemente demanda ou diluição dos resíduos de nitrogênio restante destas culturas. Por outro lado, nos tratamentos que receberam amônia mais nitrato ou nitrato mais glutamina, os valores permaneceram também relativamente altos e estáveis. Uma possível explicação seria a demanda de nitrogênio simultânea à absorção, visto que nesses tratamentos ocorreu bom crescimento vegetativo principalmente das raízes, não apresentando, ao contrário do tratamento que recebeu somente nitrato, nenhum sintoma visual de deficiência de nitrogênio.

É interessante observar que a evolução dos teores de nitrogênio dos tratamentos utilizados (Figura 4) comportaram-se semelhantemente, obviamente, aos teores de proteínas solúveis totais mostrados na Figura 5.

#### **4.6. Teores de proteínas solúveis totais**

Os teores de proteínas solúveis totais mensurados em miligramas de proteína por grama de matéria fresca em cada tratamento, nos quatro tempos de cultivo são mostrados na Figura 5, onde, no quinto dia de cultivo observa-se decréscimos de teores, com diferentes ordens de grandeza no tratamento com isenção de nitrogênio e no tratamento com amônia mais nitrato. O maior decréscimo observado ocorreu, obviamente no tratamento com isenção de nitrogênio, mostrando decréscimos acentuados e estatisticamente significativos no quinto e no décimo dia de cultivo, permanecendo estável no décimo quinto dia.

O tratamento que recebeu amônia mais nitrato, que mostrou decréscimo significativo no teor de proteínas do tempo zero para o quinto dia, permaneceu estável no décimo e décimo quinto dia de cultivo.

O tratamento que recebeu nitrogênio na forma exclusiva de nitrato, mostrou decréscimo significativo somente no décimo dia de cultivo, permanecendo estável no décimo quinto dia.

Os tratamentos que receberam glutamina exclusivamente e aquele que recebeu amônia mais glutamina, sofreram decréscimos significativos no décimo dia de cultivo. Tal decréscimo, no tratamento que recebeu nitrato mais glutamina, ocorreu somente no décimo quinto dia de cultivo, quando os três tratamentos em questão apresentaram valores

semelhantes.

Apesar de BLACQUIERE et al. (1988) observarem que  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  isoladamente ou  $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$  não afetarem a concentração de proteína em *Plantago sp*, KRALOVA & DRAZDAK (1989) observaram que a síntese proteica em trigo nutrido com nitrato foi retardado talvez pelo baixo nível de açúcares nas raízes. Observaram ainda teores de proteínas mais elevados quando as plantas foram nutridas com amônia em relação a nitrato.

De modo geral, apesar de se considerar a degradação de glutamina e a volatilização de amônia pelos processos de autolavagem, já discutidos anteriormente, os resíduos desses compostos sustentaram razoáveis níveis de proteínas na cultura. Por outro lado, esses teores razoáveis que persistiram ao longo do tempo pode se justificar pela não ocorrência de demanda de proteína, visto que as plantas, quando tratadas com glutamina pouco desenvolveram.

#### **4.7. Atividade específica da Desidrogenase de Glutamato (GDH)**

A Figura 6 mostra o comportamento da atividade específica da GDH nos eixos embrionários submetidos às diferentes fontes de nitrogênio, nos diferentes tempos de cultivo. Pode-se observar que nos eixos embrionários cultivados em meios em ausência total de nitrogênio, observa-se no quinto dia de cultivo, um decréscimo acentuado e significativo da

atividade da enzima em relação aos tratamentos que receberam nitrogênio seja nas formas de nitrato mais amônia, seja na forma exclusiva de nitrato ou ainda nas formas de nitrato mais glutamina. No décimo dia de cultivo a atividade da enzima no tratamento sem nitrogênio, continuou com ligeiro decréscimo, aumentando acentuadamente no décimo quinto dia de cultivo, atingindo então um nível de atividade semelhante a todos os outros tratamentos.

Nos eixos embrionários nutridos com amônia mais glutamina ou somente com glutamina observa-se no quinto dia de cultivo, um comportamento na atividade da GDH bastante semelhante ao tratamento sem nitrogênio, inclusive com as mesmas diferenças estatísticas em relação aos demais tratamentos. Porém, no décimo dia de cultivo observa-se um pico máximo nesses dois tratamentos, com atividade mais alta e diferença significativa em relação a todos os outros tratamentos, em todos os tempos de cultivo. Já no décimo dia de cultivo, os níveis de atividade da enzima, correspondente aos dois tratamentos, permaneceram estáveis.

O tratamento que recebeu nitrato mais glutamina mostra um ligeiro decréscimo de atividade no quinto dia, aumentando linearmente no décimo e décimo quinto dia de cultivo.

No tratamento que recebeu nitrogênio nas formas de nitrato mais glutamina, depois de um decréscimo no quinto dia, observa-se um ligeiro crescimento linear da atividade da enzima no décimo e décimo quinto dia de cultivo.

Finalmente, no tratamento que recebeu nitrogênio na forma exclusiva de nitrato, observa-se um comportamento estável na atividade enzimática com ligeiro acréscimo no décimo quinto dia de cultivo.

Para os eixos embrionários pouco desenvolvidos, apesar de um aumento retardado na atividade da GDH em relação ao crescimento da cultura, observou-se uma correlação, de certa forma inversa, com a atividade da enzima, ou seja, pouco desenvolvimento da cultura e maiores atividades da enzima, isto para os eixos embrionários pouco desenvolvidos.

Esse comportamento da atividade específica da GDH nos tratamentos que não receberam nitrato e pouco desenvolveram, decrescendo no início e aumentando substancialmente nos períodos finais de cultivo, poderia estar associado a aspectos senescentes impostos pelas condições de deficiência de nitrogênio. Ao que parece, para se desenvolverem, os eixos embrionários exauriram as reservas embrionárias disponíveis, já discutidas anteriormente. Sendo assim, os compostos nitrogenados passaram a ser degradados por um conjunto hidrolítico como proteólises por exemplo, na tentativa de suprir as demandas prioritárias de nitrogênio. Essas suposições encontram suporte também nos resultados obtidos por BEEVERS & SPLITTSTTOESSER (1967) em eixos embrionários de ervilha, onde observaram apreciáveis atividades de proteases nos períodos iniciais de cultivo. Portanto, sob esse ângulo, esse comportamento da GDH poderia talvez se justificar pela sua atividade catabólica defendida por muitos autores como PRICE & GLEASON (1972),

JOY (1988), LEA et al. (1992) e ROBINSON et al. (1992). Essas idéias encontram reforços também nos resultados obtidos por FAOWLE & BOULTER (1977) em *Vigna unguiculata*, onde observaram alta especificidade da GDH para o L-glutamato com  $K_M$  de 16,7 mM.

Por outro lado LAURIÈRE & DAUSSANT (1983) observaram que o aumento da atividade da GDH em folhas destacadas de milho incubadas em amônia 15mM, deveu-se ao aumento do nível da enzima devido à síntese "de novo", processo este, também induzido pela ausência de luz e pela senescência.

Outro aspecto interessante na relação desenvolvimento e atividade da GDH é observado quando se atenta para o desenvolvimento de raízes nos tratamentos que receberam nitrato e apresentaram um bom desenvolvimento. Sendo assim, a estabilidade do nível de atividade relativamente alta, nos tratamentos que receberam nitrato, se justifica pela ocorrência de raízes na cultura, nas quais a atividade tem sido observada ser maior em relação às folhas, o que está de pleno acordo com os resultados observados em milho por WEISSMAN (1972), o qual detectou maior atividade de GDH nas raízes, principalmente em plantas nutridas com nitrato.

#### **4.8. Atividade específica da Sintetase de Glutamina (GS)**

O comportamento da atividade da GS, em cada tratamento utilizado no quinto, décimo e décimo quinto dia de cultivo é mostrado na Figura 7, onde, no quinto dia de cultivo observa-se padrões diferentes de decréscimos para dois grupos de três tratamentos que, apesar de não apresentarem diferenças estatísticas, tais decréscimos foram menos acentuados no grupo que reuniu os tratamentos que receberam somente nitrato, amônia mais nitrato e nitrato mais glutamina, e mais acentuado no grupo que reúne os tratamentos que receberam somente glutamina, amônia mais glutamina e aquele em isenção de nitrogênio.

Já no décimo dia de cultivo os mesmos dois grupos de três tratamentos apresentaram características peculiares, desta vez com padrões acentuados de aumentos de atividade específica, quando praticamente duplicou seus valores. O aumento de atividade do grupo que reuniu os tratamentos somente com nitrato, com amônia mais nitrato e nitrato mais glutamina, foi mais acentuado, inclusive com diferenças significativas em relação ao segundo grupo, que reuniu os tratamentos somente com glutamina, amônia mais glutamina e aquele tratamento com isenção total de nitrogênio.

No décimo quinto dia de cultivo, daquele grupo de três tratamentos que apresentaram acréscimos de atividade no tempo anterior (dez dias de cultivo), apenas o tratamento que recebeu somente nitrato

sofreu decréscimos de atividade com diferença significativa. Os outros dois tratamentos do mesmo grupo, aqueles que receberam amônia mais nitrato e nitrato mais glutamina, permaneceram com valores estáveis nesse período. Quanto ao segundo grupo, aquele que apresentou acréscimos menos acentuados anteriormente, seus tratamentos, que receberam somente glutamina, amônia mais glutamina e aquele com isenção de nitrogênio, apresentaram ligeiros acréscimos nos seus valores.

Portanto, a partir do quinto dia de cultivo, observa-se que os maiores níveis de atividade da GS ocorreram nos tratamentos que receberam nitrato, seja nessa forma exclusiva ou combinado com amônia ou glutamina. Esses níveis mais altos de atividade coincide também com o padrão de crescimento da cultura mostrado na Figura 1, onde observa-se nesses tratamentos, um bom desenvolvimento tanto da parte aérea, quanto do sistema radicular.

Esses resultados estão de pleno acordo com a maioria dos resultados obtidos por diferentes pesquisadores em diferentes culturas. ANGHINONI & BARBER (1988) detectaram uma correlação direta entre a atividade da GS com crescimento em milho cultivado em diferentes concentrações de amônia. A atividade da enzima não foi afetada nos primeiros dias de cultivo, e sim a partir do décimo oitavo dia. Portanto, o aumento de atividade induzido pela amônia pode ter sido consequência do aumento de atividade nas raízes, formadas nos estádios mais avançados de desenvolvimento.

Maiores níveis de atividade da GS em raízes foram observados por outros Autores. LUXOVA (1988) detectou um alto nível de atividade em raízes de milho, resultados também encontrados em raízes de *Plantago sp.* em presença de amônia por BLACQUIÈRE et al. (1988) quando a atividade na parte aérea não foi afetada pelas diferentes fontes de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ ). WEISSMAN (1972) também observou atividade muito maior em raízes de soja em relação às folhas, contudo, diferentemente dos outros autores, os maiores níveis de atividade foi determinado pelo nitrato e não pela amônia, o mesmo acontecendo em células de soja cultivadas em suspensão por CHIU & SHARGOOL (1979).

Quanto à glutamina, JOY (1988) observou que o suprimento de amônia causou aumentos acentuados dessa amida em ervilha. Em soja WEISSMAN (1972) detectou um menor nível de atividade da GS em presença de amônia em relação a nitrato. O Autor atribui esse resultado ao aumento de glutamina no tecido com possível inibição da GS, resultados corroborados por CHIU & CHARGOOL (1979) em soja.

Pelos resultados do presente trabalho, apesar de menos acentuados, observam-se níveis consideráveis de atividade da GS nos tratamentos que receberam glutamina, descartando neste caso, uma possível inibição da enzima por altos níveis endógenos de glutamina, o que não ocorreria pela baixa concentração disponível utilizada, considerando ainda que a maior parte deste composto, juntamente com amônia, podem ter sido degradados ou volatilizados, respectivamente, durante a

autoclavagem.

#### **4.9. Atividade específica da Sintase de Glutamato (GOGAT)**

Na Figura 8 pode ser observado que o tratamento mais afetado foi aquele que recebeu nitrogênio nas formas de amônia mais nitrato. A atividade enzimática nesse tratamento sofreu acréscimos acentuados e estatisticamente significativos no quinto, décimo e décimo quinto dias de cultivo.

Por outro lado, os maiores decréscimos observados ocorreram no tratamento sem nitrogênio e naquele que recebeu exclusivamente glutamina. Excetuando um ligeiro acréscimo no tratamento que recebeu glutamina no décimo dia de cultivo, os decréscimos nos dois tratamentos foram contínuos e atingiram valores mínimos em relação a todos os outros no décimo quinto dia.

A atividade enzimática, nos tratamentos que receberam nitrato exclusivamente e amônia mais glutamina, permaneceu estável no quinto dia. No décimo dia observou-se um ligeiro acréscimo no tratamento que recebeu nitrato, e um ligeiro decréscimo no tratamento que recebeu nitrato mais glutamina. No décimo quinto dia os dois tratamentos atingiram valores finais, intermediários e semelhantes. Quanto ao tratamento que recebeu amônia mais glutamina, este permaneceu estável nas quatro épocas

analisadas.

Esses resultados obtidos estão de comum acordo com outros autores, mesmo em outras condições de cultivo e culturas diferentes. Em "seedlings" de milho nutridos com amônia e analisados aos 3, 5, 8, 13, 18 e 23 dias cultivo, HANDA et al. (1985) observaram que a atividade da GOGAT não alterou nos primeiros dias de cultivo aumentando a partir do décimo oitavo dia.

Segundo SINGH et al. (1986) observaram que  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  induziu aumento na atividade da GOGAT em *Vigna mungo* L., e HECHT et al. (1988) observaram em mostarda atividade de NADH-GOGAT principalmente nos períodos iniciais de desenvolvimento da cultura, antes da plastidogênese, depois do qual, passou a aparecer a atividade da fd-GOGAT. Observaram também aumentos de atividade nas plantas cultivadas na presença de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ou  $\text{KNO}_3$ , sendo que  $\text{NaNO}_3$ , causou o mesmo efeito que  $\text{KNO}_3$ .  $\text{NH}_4\text{Cl}$  exclusivamente não causou nenhum efeito sobre a NADH-GOGAT. Este efeito de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  foi observado também por JIMÉNES & FERNÁNDEZ (1983) em calos de *Bouvardia ternifolia*. Quando calos obtidos a partir de explantes radiculares nutridos exclusivamente com glutamina a atividade da GOGAT foi inibida.

## **5. CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

**1 - Eixos embrionários intactos, isolados de sementes secas de feijoeiro, quando comparados àqueles submetidos ao cultivo em presença de diferentes fontes de nitrogênio, apresentaram altos teores de proteínas solúveis, apresentando também alta atividade específica das enzimas desidrogenase de glutamato (GDH), sintetase de glutamina (GS) e sintase de glutamato (GOGAT).**

**2 - Entre as diferentes fontes de nitrogênio utilizadas, a forma nítrica, isoladamente ou combinada com amônia ou glutamina, revelou-se como a melhor fonte de nitrogênio para o desenvolvimento dos eixos embrionários cultivados "in vitro". Nesses tratamentos foram detectados os maiores níveis de atividade específica das enzimas GS e GOGAT.**

**3 - A atividade específica da GDH nos eixos embrionários nutridos com glutamina, isoladamente ou combinada com amônia, comportou-se semelhantemente aos eixos embrionários cultivados nos meios sem adição de nitrogênio exógeno. Nesses tratamentos a atividade da enzima decresceu acentuadamente nos primeiros cinco dias, observando-se elevada atividade aos quinze dias de cultivo. Diferentemente do que**

ocorreu na presença de nitrato, nesses tratamentos não houve desenvolvimento dos eixos embrionários. Esses fatos dão subsídios à conclusão de uma possível deficiência de nitrogênio no meio de cultura, devido a termodegradação da glutamina e volatilização da amônia que teriam ocorrido durante a preparação (autoclavagem) dos meios de cultura.

4 - Considerando a provável deficiência de nitrogênio nos tratamentos que não receberam nitrato, e devido a ela, a GDH estaria atuando catabolicamente utilizando substâncias de reserva e produzindo metabólitos necessários ao desenvolvimento dos eixos embrionários de feijoeiro.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGHINONI, I.; MAGALHÃES, J.R.; BARBER, S.A. Enzyme activity nitrogen uptake and corn growth as effected by ammonium concentration in soil solution. **Journal of Plant Nutrition**, New York, **11** (2):131-144, 1988.

ARNOZIS, P.A.; NELEMANS, J.A.; FINDENEGG, G.R. Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in plants grown with either  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  as inorganic nitrogen source. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, **132** (1):23-27, 1988.

BECKER, T.W.; NEF-CAMPA, C.; ZEHNACKER, C.; HIREL, B. Implication of the phytochrome in light regulation of the tomato gene(s) encoding ferredoxin dependent glutamate synthase. **Plant Physiology and Biochemistry**, Montrouge, **31** (5): 725-729, 1993.

BEEVERS, L. & SPLITTSTOESSER, W.E. Protein and nucleic acid metabolism in germinating peas. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, **19** (61):698-711, 1967.

BEEVERS, L. & STOREY, R. Glutamate synthetase in developing cotyledons of *Pisum sativum*. **Plant Physiology**, Rockville, **57**: 862-866, 1976.

BERGMAN, A. & ERICSON, I. Effects of pH, NADH, succinate and malate on the oxidation of glycine in spinach leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 59: 421-427, 1983.

BOLAND, M.J. & BENNY, A.G. Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules-purification and properties of NADH dependent glutamate synthase from lupin nodules. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, 79: 355-362, 1977.

BLACQUIÈRE, T.; VOORTMAN, E.; STULEN, I. Ammonium and nitrate nutrition in *Plantago lanceolata* L. and *Plantago major ssp. major*. *Plant and Soil*, The Hague, 106: 23:23-34, 1988.

BOTELLA, J. R.; VERBELEN, J. P.; VALPUESTA, V. Immunocytolocalization of ferredoxin-GOGAT in the cells of green leaves and cotyledons of *Lycopersicum esculentum*. *Plant Physiology*, Rockville, 87: 255-257, 1988.

BOUCAUD, J. & BIGOT, J. Changes in the activities of nitrogen assimilation enzymes of *Lolium perene* L. *Plant and Soil*, The Hague, 114 (1):121-125,1989.

- BRADFORD, M.M.** A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, **72**: 248-254, 1976.
- BRYANT, J.A.** **Fisiologia da semente**. São Paulo, E.P.V. v. 31, 86 p. 1989. (Temas de biologia).
- CABELLO, P.; HABA, P-de-LA.; MALDONADO, J.M. De-La-HABBA, P.** Isoforms of glutamine synthetase in cotyledons, leaves and roots of sunflower plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, **137** (3): 378-380, 1991.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P. FERREIRA, M. E.** Meios nutritivos. In: **TORRES, A.C. & CALDAS, L.S.**, coord. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas**, ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, Brasília, 1990, 433 p.
- CAMMAERTS, D. & JACOBS, M.** A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Berlin, **163**:717-726, 1985.

CÁNOVAS, F.M.; AVILA, C.; BOTELLA, J.R.; VALPUESTA, V.,; CASTRO, I.N. Effect of light-dark transition on glutamine synthetase activity in tomato leaves. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 66: 648-652, 1986.

CÁNOVAS, F.M.; CANTON, F.R.; GALARDO, F.; GARCIA-GUTIERREZ, A; VICENTE, A.D.; DE-VICENTE, A. Accumulation of glutamine synthetase during early. *Planta*, Berlin, 185 (3): 372-378, 1991.

CHEN, F-L. & CULLIMORE, J.V. Two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. purification properties and activity changes during nodule development, *Plant Physiology*, Rockville, 88: 1411-1417, 1988.

CHIU, J.Y. & SHARGOOL, P.D. Importance of glutamate synthase in glutamate synthesis by soybean cell suspension cultures. *Plant Physiology*, Rockville, 63:409-415, 1979.

CHOU, K.H. & SPLITTSTOESSER, W. Glutamate dehydrogenase from pumpkin cotyledons-characterization and isoenzymes. *Plant Physiology*, Rockville, 49:550-554, 1972.

CROCOMO, O.J. Assimilação do nitrogênio pelas plantas. In: FERRI, M. G. ed. *Fisiologia vegetal*. EDUSP, 1979. cap. 4, p. 179-207.

CULLIMORE, J.V.; LARA, M.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from plant fraction of *Phaseolus* root nodules. *Planta*, Berlin, 157: 245-253, 1983.

DAS, R.; SHARMA, A.K.; SOPORY, S.K. Regulation of NADH-Glutamate dehydrogenase activity by phytochrome, calcium and calmodulin in *Zea mays*. *Plant and Cell Physiology*, Tokyo, 30 (3): 317-323, 1989.

DROVET, A.; WEISWALD, N.; JAY, ALLEMAND, C.; CORNV, D. Pentose phosphate pathway and glutamate dehydrogenase activities in adult and rejuvenated hybrid walnut trees. *Plant Physiology and Biochemistry*, Montrouge, 27 (2): 259-267, 1989.

EDWARDS, J.W. & CORUZZI, G.M. Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *The Plant Cell*, Baltimore, 1: 241-248, 1989.

ELLIOTT, W.H. Isolation of glutamine synthetase and glutamotransferase from green peas. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 201: 661-672, 1953.

ERICSON, M.C. Purification and properties of glutamine synthetase from spinach leaves. *Plant Physiology*, Rockville, **79**: 923-927, 1985.

FARNDEN, K.J.F. & ROBERTSON, J.G. Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. In: BERGENSEN, F.J. ed., *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. New York, John Willey & Sons, 1980. p.265-314.

FAWOLE, M.O. & BOULTER, D. Purification and properties of glutamate dehydrogenase from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Planta*, Berlin, **134**: 97-102, 1977.

FERRI, M.G. ed. *Fisiologia vegetal*. São Paulo, EDUSP, 1979. cap. 4, p. 179-207.

FENTEM, A.P.; LEA, P.J.; STEWART, G.R. Action of inhibitors of ammonia assimilation on amino acid metabolism in *Hordeum vulgare* L.(cv Golden Promise). *Plant Physiology*, Rockville, **71**: 502-506, 1983.

FISCHER, P. & KLEIN, U. Localization of nitrogen-assimilating enzymes in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, Rockville, **88**: 947-952, 1988.

- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. **Experiment Cell Research**, New York, 50: 151-158, 1968.
- GEBHARDT, C.; OLIVER, J.E.; FORDE, B.G.; SAARELAINEN, R.; MIFLIN, B.J. Primary structure and differential expression of glutamine synthetase genes in nodules, roots and leaves of *Phaseolus vulgaris*. **The EMBO Journal**, Oxford, 5 (7): 1429-1435, 1986.
- GEORGE, E.F.; PUTTOCK, D.J.M.; GEORGE, H.J. Constituents of culture media in: *Plant culture media, Commentary and analyses*. West Yorkshire, British Library, , 1988. v. 2, 420 p.
- GONZALEZ-BRAVO, M.P. & MAESO, M. Effect of nitrate and ammonium on NADH-dependent glutamate dehydrogenase activity of detached roots and cotyledons of *Citrullus vulgaris* L. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, 127 (3/4): 331-337, 1987.
- HANDA, S.; HUBER, D.M.; WAREEN, H.L. TSAI, C.Y. Nitrogen nutrition and N assimilation in maize seedlings. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, 65: 87-93, 1985.

HAREL, E.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. The localization of enzymes of nitrogen assimilation in maize leaves and their activities during greening. *Planta*, Berlin, 134: 195-200, 1977.

HAYAKAWA, T.; YAMAYA, T.; MAE, T. OJIMA, T. Changes in content of two glutamate synthase proteins in spikelets of rice (*Oryza sativa*) plants during ripening. *Plant Physiology*, Rockville, 101 (4):1257-1262, 1993.

HARTMANN, T. & EHMKE, A. Role of mitochondrial glutamate dehydrogenase in the reassimilation of ammonia produced by glycine enzymes of *Lolium perenne* L. *Plant and Soil*, The Hague, 114 (1):121-125, 1980.

HECHT, V.; OELMÜLLER, R.; SCHMIDT, S.; MOHR, H. Action of light, nitrate and ammonium on the levels of NADH and ferredoxin-dependent glutamate synthases in the cotyledons of mustard seedlings. *Planta*, Berlin, 175: 130-138, 1988.

HIREL, B. & GADAL, P. Glutamine synthetase in rice - a comparative study of the enzymes from roots and leaves. *Plant Physiology*, Rockville, 66: 619-623, 1980.

- HIREL, B. & GADAL, P. Glutamine synthetase isoforms in leaves of a C<sub>4</sub> plant: *Sorghum vulgare*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, **54**: 69-74, 1982.
- HIREL, B.; VIDAL, J.; GADAL, P. Evidence for a cytosolic-dependent light induction of chloroplastic glutamine synthetase during greening of etiolated rice leaves. **Planta**, Berlin, **155**: 17-23, 1982.
- HIREL, B.; WEATHERLEY, C.; CRETIN, C.; BERGOUNIOUX, C.; GADAL, P. Multiple subunit composition of chloroplastic glutamine synthetase of *Nicotiana tabacum* L. **Plant Physiology**, Rockville, **74**: 448-450, 1984.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**, Berkeley, **347**: 1-39, 1950.
- HOELZLE, I.; FINER, J.J.; McMULLEN, M.D.; STREETER, J.G. Induction of glutamine synthetase activity in nonnodulated roots of glycine max, *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*. **Plant Physiology**, Rockville, **100** (1): 525-528, 1992.
- HU, Y.C. & FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S., Coord. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas, ABCTP/EMBRAPA-CNPH, Brasília, 1990, 433 p.

- JIMÉNEZ, E.S. & FERNÁNDEZ, L. Biochemical parameters to assess cell differentiation of *Bouvardia ternifolia* Schelecht callus. *Planta*, Berlin, **158**: 377-383, 1983.
- JOY, K.W. Glutamate dehydrogenase changes in *Lemna minor* not due to enzyme induction. *Plant Physiology*, Rockville, **47**: 1002-1007, 1971.
- JOY, K.W. Ammonia, glutamine, and asparagine: a carbon-nitrogen interface. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, **66**: 2103-2109, 1988.
- KANAMORI, T., KONISHI S.; TAKAHASHI, E. Inducible formation of glutamate dehydrogenase in rice plant roots by the addition of ammonia to the media. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **26**: 1-6, 1972.
- KENDALL, A.C.; WALLSGROVE, R. M.; HALL, N.P.; TURNER, J.C.; LEA, P.J. Carbon and nitrogen metabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Planta*, Berlin, **168**: 316-323, 1986.
- KRALOVA, M. & DRAZDAK, K. Assimilation of  $\text{NH}_4^+$  and/or NO from soil solution by spring wheat seedlings. *Scientia Agriculturae Bhoemoslovaca*, Prague, **21** (3):191-198, 1989.

KUBIK-DOBOSZ, G. The rules of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and three forms of glutamate synthase in nitrogen assimilation in various organs of *Pisum arvense* L. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae, Warszawa, 60 (34): 295-302, 1991.**

KUSTU, S.; BURTON, D.; GARCIA, E.; McCARTER, L.; McFARLAND, N. Nitrogen control in salmonella: Regulation by the glnR and glnF gene products. **Proceedings of National Academy of Sciences, Uttar Pradesh, 76 (9):4576-4580, 1979.**

LARA, M.; PORTA, H.; PADILLA, J.; FOLCH, J. & SANCHEZ, F. Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiology, Rockville, 76: 1019-1023, 1984.**

LAURIÉRE, C. & DAUSSANT, J. Identification of the ammonium-dependent isoenzyme of glutamate dehydrogenase as the form induced by senescence or darkness stress in the first leaf of wheat. **Physiologia Plantarum, Copenhagen, 58: 59-92, 1983.**

LEA, P.J.; BLACKWELL, R.D.; JOY, K.W. Ammonia assimilation in higher plants. In: MENGEL, K. & PILBEAM, D.J. **Nitrogen metabolism of plants., Oxford, Clarendon, 1992. p. 153-186.**

- LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. The occurrence of glutamate synthase in algae. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, New York, **64**: 856-862, 1975.
- LEHMANN, T.; POLCYN, T.; RATAJCZAK, L. Glutamate dehydrogenase isoenzymes in yellow lupine root nodules-III. Affinity for ammonia. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, **12** (3): 259-263, 1990.
- LUXOVA, M. The participation of the primary maize root on the assimilation of  $\text{NH}_4^+$  IONS. **Plant and Soil**, The Hague, **111** ((2):187-189, 1988.
- MAGALHÃES, J.R. & HUBER, D.M. Maize growth and ammonium assimilation enzyme activity in response to nitrogen forms and pH control. **Journal of Plant Nutrition**, New York, **12** (8):985-996, 1989.
- MARSOLIER, M.C. & HIREL, B. Metabolic and developmental control of cytosolic glutamine synthetase genes in soybean. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, **89** (3): 613-617, 1993.
- MATOH, T. & TAKAHASHI, E. Changes in the activities of ferredoxin-and NADH glutamate synthase during seedling development of peas. **Planta**, Berlin, **158**: 289-294, 1982.

McNALLY, S.F.; ORBANJO, T.O.; HIREL, B.; STEWART, G.R. Glutamine synthetase isoenzymes of *Striga hermonthica* and other angiosperm root parasites. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, **34**: 610-614, 1983.

MIFLIN, B.J. Studies on the sub-cellular location of particulate nitrate and nitrite reductase, glutamic dehydrogenase and other enzymes in barley roots. *Planta*, Berlin, **93**: 160-170, 1970.

MIFLIN, B.J.; & LEA, P.J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Progress in Phytochemistry*, London, **4**: 1-26, 1977.

MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*, Oxford, **15**: 873-85, 1976.

MIFLIN B.J. & LEA, P.J. Ammonia assimilation. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E. ed., *The biochemistry of plants*. London, Academic Press, 1980. v. 5, p.169-202.

MIFLIN B.J.; WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J. Glutamine metabolism in higher plants. *Current Topics in Cellular Regulation*, San Diego, **20**: 1-43, 1981.

**MILLER, R.E. & STADTMAN, E.R. Glutamate synthase from *Escherichia coli*.**

**An iron sulfide flavoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore,**

**247: 7407-7419, 1972.**

**MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and**

**bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*,**

**Copenhagen, 15: 473-479, 1962.**

**MURILLO, E. & JIMÉNEZ, E.S. Glutamate synthase in greening callus of**

***Bouvardia ternifolia* Schlecht. *Planta*, Berlin, 163: 448-452, 1985.**

**NORDLUND, S.; KANEMOTO, R.H.; MURREL, S.A.; LUDDEN, P.W.**

**Properties and regulation of glutamine synthetase from *Rhodospirillum***

***rubrum*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 161 (1): 13-17, 1985.**

**OAKS, A. & HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. *Plant Physiology*,**

**Rockville, 36: 345-365, 1985.**

**PAHEL, G. & TYLER, B. A new *glnA*-Linked regulatory gene for glutamine**

**synthetase in *E. coli*. *Proceedings of National Academy of Science*,**

**Uttar Pradesh, 79 (9): 4544-4548, 1979.**

PANDEY, M. & BABU P.V. Activity of NR, GDH and GS in relation to phosphorus fertilization and growth stages in chickpea. **Indian Journal of Plant Physiology**, New Delhi, **31** (3): 276-280, 1988.

PIETILA, M.; KUUSIPURO, P.; PIETILÄINEN, P.; LAHDESMAKI, P. Specificity and seasonal variation of arginase, glutamate synthase and nitrate reductase activities in scots pine needles. **Plant Science**, Amsterdam, **64**: 153-160, 1989.

PRICE, J.S. & GLEASON, F.H. Glutamate dehydrogenase from *Apodactyla* (Oomycetes). **Plant Physiology**, Rockville, **49**: 87-90, 1972

RANKUMAR, K.I.; TULI, R.; THOMAS, J. Glutamine synthetases from rice: purification and preliminary characterization of two forms in leaves and one form in roots. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, **2**: 628-636, 1981.

RATHNAM, C.K.M. & EDWARDS, G.E. Distribution of nitrate assimilating enzymes between mesophyll protoplasmic and bundle sheath cell in leaves of three groups of C<sub>4</sub> plants. **Plant Physiology**, Rockville, **57**: 881-885, 1976.

RIGANO, C.; RIGANO, V. M.; VONA, V.; FUGGI, A. Nitrate reductase and glutamine synthetase activities, nitrate and ammonia assimilation, in the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. **Archives of Microbiology**, Berlin, **129**: 110-4, 1981.

RITENOUR, G.L.; JOY, K.W.; BUNNING, J.; HANGEMAN, R.H. Intracellular localization of nitrate reductase, nitrite reductase, and glutamic acid dehydrogenase in green leaf tissue. **Plant Physiology**, Rockville, **42**: 233-237, 1967.

ROBERT, F.M. & WONG, P.P. Isoenzymes of glutamine synthetase in *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L. root nodules. **Plant Physiology**, Rockville, **81**: 142-148, 1986.

ROBINSON, S.A.; SLADE, A.P.; FOX, G.G; PHILLIPS, R.; RATCLIFFE, R.G.; STEWART, G.R. The role of glutamate dehydrogenase in plant metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, **95**: 509-516, 1992.

RHODES, D.; RENDON, G.A.; STEWART, G.R. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. **Planta**, Berlin, **125**: 201-211, 1975.

SANTOS, I. & SALEMA, R. Effect of nitrogen nutrition on nitrate and nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase and glutamate dehydrogenase in the CAM plant *Kalanchoe lateritia* Engl. **Plant Science**, Amsterdam, **84(2)**: 145-152, 1992.

SECHEY, K.A.; OAKS, A.; BEWLEY, J.D. Enzymes of nitrogen assimilation undergo seasonal fluctuation in the roots of the persistent weedy perennial *Cichorium intybus*. **Plant Physiology**, Rockville, **97 (1)**: 322-329, 1991.

SINGH, V.K.; MATHUR, M.; MATHUR, S.N. Effect of some nitrogenous and non nitrogenous salts on the activity of enzymes of ammonium assimilation in *Vigna mungo* (L.) HEPPER. **Indian Journal of Plant Physiology**, New Delhi, **29**,

STACEY, G.; TABITA, F.R.; BAALLEN, V.C. Nitrogen and ammonia assimilation in the cyanobacteria: purification of glutamine synthetase from *Annabaena* sp.

STEWART, G.R. The role of glutamate dehydrogenase in plant metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, **95**: 509-516, 1992.

STEWART, G.R.; MANN, A.F.; FENTEM, P.A. Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E. **Biochemistry of Plants: A Comprehensive treatise**, New York, Academic Press, 1980, v. 05, p. 271-320.

St-LEGGER, R.J.; MAY, B.; ALLEE, L.L.; FRANK, D.C.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic Fungus *Metarhizium anicopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 60 (1): 89-101, 1992.

SUMAR, N.; CASSELTON, P.J.; McNALLY, S.F.; STEWART, G.R. Occurrence of isoenzymes of glutamine synthetase in the *Chlorella kessleri*. **Plant Physiology**, Rockville, 74: 204-207, 1984.

SUZUKI, A.; GADAL, P.; OAKS, A. Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. **Planta**, Berlin, 151: 457-461, 1981.

SUZUKI, A.; VIDAL, J.; GADAL, P. Glutamate synthase isoforms in rice. **Plant Physiology**, Rockville, 70: 827-832, 1982.

SWARUP, R.B.; BENNETT, R.; CULLIMORE, J.V. Expression of glutamine synthetase genes in cotyledons of germinating *Phaseolus vulgaris* L. **Planta, Berlin, 183 (1): 51-56, 1990.**

TA, C.T. & CHANH, T.T. Nitrogen metabolism in the stalk tissue of maize. **Plant Physiology, Rockville, 97: 1375-1380, 1991.**

TINGEY, S.V.; WALKER, E.L.; CORUZZI, G.M. Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. **The EMBO Journal, Oxford, 6(1): 1-9, 1987.**

TOBIN, A.K.; RIDLEY, S.M.; STEWART G.R. Changes in the activities of chloroplast and cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase during normal leaf growth and plastid development in wheat. **Planta, Berlin, 163: 544-548, 1985.**

VARGAS, L. V. M. & JIMÉNEZ, E. S. Differential role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues. **Plant Physiology, Rockville, 76: 540, 1984.**

YAMAYA, T. & OAKS, A. Synthesis of glutamate by mitochondria - an anaplerotic function for glutamate dehydrogenase. **Physiologia Plantarum, Copenhagen, 70: 749-756, 1987.**

- YAMAYA, T.; OAKS, A.; MATSUMOTO, H. Characteristics of glutamate dehydrogenase in mayze shoots. **Plant Physiology**, Rockville, **76**: 1009-1013, 1984.
- YOCH, D.C.; CANTU, M.; ZHANG, Z-M. Evidence for a glutamine synthetase-chloroplast association in the phototroph *Rhodospirillum rubrum*: purification, properties, and regulation of the enzyme. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, **154** (2):632-639, 1983.
- YU, J.W. & WOO, K.C. Correlation between the development of photorespiration and the change in activities of  $\text{NH}_3$  assimilation enzymes in greening oat leaves. **Australian Journal of Plant Physiology**, East Melbourne, **18** (6):583-588, 1991.
- YUAN, H.F. & HOU, C.R. A comparative study of two forms of glutamine synthetase from rice leaves. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, **28** (1):91-108, 1987.
- WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. Distribution of enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. **Plant Physiology**, Rockville, **63**: 232-236, 1979.

WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. *Planta, Berlin*, **154**: 473-476, 1982.

WATANABE, M.; HAYASHI, M.; SUGIYAMA, M. Effects of supplemental nitrate application on the activity of some nitrogen assimilation enzymes and leaf tissue productivity in maize seedlings. *Soil Science and Plant Nutrition, Tokyo*, **31** (4):573-580, 1985.

WEISSMAN, G.S. Glutamine synthetase regulation by energy charge in sunflower roots. *Plant Physiology, Rockville*, **57**: 339-343, 1976.

WEISSMAN, G.S. Influence of ammonium and nitrate nutrition on enzymatic activity in soybean and sunflower. *Plant Physiology, Rockville*, **49**: 138-141, 1972.

WOOLFOLK, C.A.; SHAPIRO, B.; STADTMAN, E.R. Regulation of glutamine synthetase-I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics, New York*, **116**: 177-192, 1966.

**WOOLFOLK, C.A.; & STADTMAN, E.R. Cumulative feedback inhibition in the multiple and product regulation of glutamine synthetase activity in *Escherichia coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 17 (4):313-319, 1964.**

# APÊNDICES

**APÊNDICE 1 - Análise de variância dos fatores fonte de nitrogênio (FONTES  
N) x dias de cultivo (D.C.) sobre as variáveis analisadas.**

C.VARIAÇÃO	C.L.	QUADRADOS MÉDIOS								
		PROT	GDH	GS	GOGAT	%N-TOTAL	%MMS	IMMF		
Blocos	2									
Fonte N	5			58,747*	1,425*	1,598*	0,426*	16,825*	15,386*	0,05*
Residuo(s)	10			0,490	0,036	0,094	0,001	0,175	0,247	0,001
Parcelas	17									
D.C.	3			106,044*	5,642*	8,363*	0,034*	13,564*	30.929,846*	97,73*
Fonte NxD.C.	15			9,257*	1,191*	0,310*	0,072*	2,189*	2,366*	94,91*
Residuo(B)	36			0,540	0,076	0,140	0,001	0,186	0,363	
TOTAL	71									

\* Significância do teste F ao nível de 5%

Coeficiente de variação (A) = 3.203%

Coeficiente de variação (B) = 6.721%

**APÊNDICE 2 - Médias da interação fontes de nitrogênio x dias de cultivo sobre a variável porcentagem de matéria seca (%MS).**

FONTES DE NITROGÊNIO	DIAS DE CULTIVO			
	0	5	10	15
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	93,189 A, a	9,879 B, b	8,757 D, b	8,797 D, b
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +Gln	93,209 A, a	10,477 AB, b	10,196 BC, b	10,972 C, b
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> +Gln	93,512 A, a	11,615 A, bc	10,672 B, c	12,661 AB, b
Gln	93,462 A, a	11,625 A, c	12,409 A, bc	13,508 A, b
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	93,462 A, a	10,306 AB, c	9,081 CD, c	11,812 BC, b
N- ISENTO	93,370 A, a	8,278 C, b	8,310 D, b	9,077 D, b

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância (letras maiúsculas representam as diferenças entre médias de fontes de nitrogênio dentro de cada tempo de cultivo indicado, e letras minúsculas representam as diferenças entre médias de tempos de cultivo dentro de cada tratamento).

- DMS 5% (FONTE N x dias de cultivo) = 1.406

- DMS 5% (dias de cultivo x FONTE N) = 1.327

**APÊNDICE 3 - Médias da interação fontes de nitrogênio x dias de cultivo sobre a variável incremento de massa de matéria fresca (IMMF)**

FONTES DE NITROGÊNIO	DIAS DE CULTIVO			
	0	5	10	15
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,003 A,d	0,074 A,c	0,223 A,b	0,0446 A,a
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +Gln	0,003 A,d	0,062 A,c	0,131 B,b	0,211 C,a
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> +Gln	0,003 A,c	0,049 A,b	0,068 C,ab	0,078 E,a
Gln	0,003 A,c	0,049 A,b	0,075 C,ab	0,086 DE,a
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,003 A,d	0,074 A,c	0,205 A,b	0,296 B,a
N- ISENTO	0,003 A,c	0,072 A,b	0,092 C,ab	0,107 D,a

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância (letras maiúsculas representam as diferenças entre médias de fontes de nitrogênio dentro de cada tempo de cultivo indicado, e letras minúsculas representam as diferenças entre médias de tempos de cultivo dentro de cada tratamento).

- DMS 5% (FONTE N x dias de cultivo) = 0.028

- DMS 5% (dias de cultivo x FONTE N) = 0.026

**APÊNDICE 4 - Médias da interação fontes de nitrogênio x dias de cultivo sobre a variável porcentagem de nitrogênio total (%N total)**

FONTES DE NITROGÊNIO	DIAS DE CULTIVO			
	0	5	10	15
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6,187 A, a	5,377 A, a	5,257 A, a	5,960 A, a
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +Gln	6,150 A, a	5,193 A, b	5,707 A, ab	5,783 A, ab
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> +Gln	6,217 A, a	5,025 A, b	5,680 A, ab	5,810 A, ab
Gln	6,186 A, a	5,175 A, b	5,175 A, b	5,375 A, ab
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6,163 A, a	3,297 B, b	2,653 B, b	2,500 B, b
N-ISENTO	6,217 A, a	2,503 B, b	1,963 B, b	1,733 B, b

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância (letras maiúsculas representam as diferenças entre médias de fontes de nitrogênio dentro de cada tempo de cultivo indicado, e letras minúsculas representam as diferenças entre médias de tempos de cultivo dentro de cada tratamento).

- DMS 5% (FONTE N x dias de cultivo) = 1.041

- DMS 5% (dias de cultivo x FONTEN) = 0.949

**APÊNDICE 5 - Médias da interação fontes de nitrogênio x dias de cultivo sobre a variável proteínas solúveis totais.**

FONTES DE NITROGÊNIO	DIAS DE CULTIVO			
	0	5	10	15
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	13,693 A, a	11,098 B, b	10,726 B, b	10,533 A, b
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +Gln	13,851 A, a	13,572 A, a	13,182 A, a	11,220 A, b
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> +Gln	13,692 A, a	13,853 A, a	10,250 B, b	9,678 A, b
Gln	13,855 A, a	13,972 A, a	10,851 B, b	10,191 A, b
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	13,692 A, a	12,557 AB, a	7,165 C, b	7,513 B, b
N- ISENTO	13,855 A, a	7,581 C, b	3,106 D, c	2,682 C, c

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância (letras maiúsculas representam as diferenças entre médias de fontes de nitrogênio dentro de cada tempo de cultivo indicado, e letras minúsculas representam as diferenças entre médias de tempos de cultivo dentro de cada tratamento).

- DMS 5% (FONTES N x dias de cultivo) = 1.767

- DMS 5% (dias de cultivo x FONTES N) = 1.617

**APÊNDICE 6 - Médias da interação fontes de nitrogênio x dias de cultivo sobre a variável Desidrogenase de Glutamato (GDH).**

FONTES DE NITROGÊNIO	DIAS DE CULTIVO			
	0	5	10	15
$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$	2,236 A,a	2,480 A,a	2,739 B,a	2,661 B,a
$\text{NO}_3^- + \text{Gln}$	2,238 A,b	1,838 B,b	2,316 B,ab	2,806 AB,a
$\text{NH}_4^+ + \text{Gln}$	2,241 A,b	1,168 C,c	3,469 A,a	3,474 A,a
Gln	2,235 A,b	1,037 C,c	3,474 A,a	3,066 AB,a
$\text{NO}_3^-$	2,239 A,a	2,274 AB,a	2,257 B,a	2,743 B,a
N- ISENTO	2,242 A,b	0,822 C,c	0,636 C,c	2,875 AB,a

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância (letras maiúsculas representam as diferenças entre médias de fontes de nitrogênio dentro de cada tempo de cultivo indicado, e letras minúsculas representam as diferenças entre médias de tempos de cultivo dentro de cada tratamento).

- DMS 5% (FONTE N x dias de cultivo) = 0.624

- DMS 5% (dias de cultivo x FONTE N) = 0.602

**APÊNDICE 7 - Médias da interação fontes de nitrogênio x dias de cultivo sobre a variável Sintetase de Glutamina (GS).**

FONTES DE NITROGÊNIO	DIAS DE CULTIVO			
	0	5	10	15
$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$	2,769 A, a	1,669 A, b	3,426 A, a	3,425 A, a
$\text{NO}_3^- + \text{Gln}$	2,770 A, a	1,530 A, b	3,225 A, a	3,317 A, a
$\text{NH}_4^+ + \text{Gln}$	2,770 A, a	1,087 A, b	2,025 B, ab	3,324 B, a
Gln	2,772 A, a	1,060 A, b	2,042 B, a	2,431 B, a
$\text{NO}_3^-$	2,771 A, a	1,724 A, b	3,307 A, a	2,754 AB, a
N- ISENTO	2,772 A, a	1,178 A, b	2,037 B, a	2,299 B, a

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância (letras maiúsculas representam as diferenças entre médias de fontes de nitrogênio dentro de cada tempo de cultivo indicado, e letras minúsculas representam as diferenças entre médias de tempos de cultivo dentro de cada tratamento).

- DMS 5% (FONTE N x dias de cultivo) = 0.872

- DMS 5% (dias de cultivo x FONTE N) = 0.823

**APÊNDICE 8 - Médias da interação fontes de nitrogênio x dias de cultivo sobre a variável Sintase de Glutamato (GOGAT).**

FONTES DE NITROGÊNIO	DIAS DE CULTIVO			
	0	5	10	15
$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$	0,839 A,d	1,181 A,c	1,336 A,b	1,663 A,a
$\text{NO}_3^- + \text{Gln}$	0,839 A,ab	0,859 B,ab	0,817 C,b	0,890 B,a
$\text{NH}_4^+ + \text{Gln}$	0,839 A,a	0,799 C,a	0,793 C,a	0,820 C,a
Gln	0,839 A,a	0,724 D,b	0,796 C,a	0,670 D,c
$\text{NO}_3^-$	0,838 A,c	0,876 B,bc	0,947 B,a	0,901 B,ab
N- ISENTO	0,839 A,a	0,764 CD,b	0,714 D,bc	0,689 D,c

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância (letras maiúsculas representam as diferenças entre médias de fontes de nitrogênio dentro de cada tempo de cultivo indicado, e letras minúsculas representam as diferenças entre médias de tempos de cultivo dentro de cada tratamento).

- DMS 5% (FONTES N x dias de cultivo) = 0.059

- DMS 5% (dias de cultivo x FONTES N) = 0.054