



Elzira Elisabeth Saviani

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato a)  
ELZIRA ELIZABETH SAVIANI  
e aprovada pela Comissão Julgadora  
Campinas, 07/10/92 *[Assinatura]*

**METABOLISMO DE [<sup>3</sup>H]GIBERELINAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE  
*Dalbergia miscolobium* BENTHAM**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
da Universidade Estadual de Campinas para  
a obtenção do título de Mestre em Ciências  
Biológicas na área de Biologia Vegetal.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Maria (Bacellar) Monteiro<sup>†</sup>

Campinas

1992

Dedico, este trabalho, aos  
meus pais, Synesio e Elzi-  
ra que possibilitaram os  
meus estudos e aos meus  
irmãos, Junior e Heloisa.

## AGRADECIMENTOS

\  
À Dra Ana Maria Monteiro, pela orientação e confiança demonstrada durante a realização deste trabalho;

Ao Dr Alan Crozier, do Departamento de Botânica da Universidade de Glasgow, pela co-orientação e incentivo no decorrer deste trabalho. Quero agradecer, também, pelas Gibberelinas radioativas padrão gentilmente cedidas;

Aos professores Dra Ana Maria M. A. Lagoa, Dr Ladaslav Sodek e Dra Maria de Fátima D. A. Pereira pelas sugestões feitas por ocasião da pré-banca;

Ao Dr Paulo Arruda e Dr Adilson Leite, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEC) da UNICAMP, que permitiram o acesso a equipamentos e orientaram no uso dos mesmos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro;

\  
À Vilma Palazetti de Almeida, pela leitura do manuscrito e sugestões;

Ao Iveraldo Rodrigues, pela ilustrações feitas à nan-  
quim;

Ao kesler Santos de Oliveira Bastos, meu marido, pelo  
carinho e presença constante;

Aos amigos Eliana Akie Simabukuro, Fernando Guimarães  
e Sandra Maria Mansur Scagliusi pela convivência e apoio;

Aos colegas, funcionários e professores do Departamen-  
to de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, que de um modo ou de  
outro colaboraram na realização deste trabalho.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1. Material Vegetal.....	20
2.2. Metabolismo de GAs Durante a Germinação.....	20
2.2.1. Aplicação de GAs Radioativas.....	21
2.2.2. Aplicação de [1,2- <sup>3</sup> H]GA <sub>4</sub> e GA <sub>4</sub> não Marcada.....	22
2.2.3. Extração de GAs.....	22
2.2.4. Fracionamento e Purificação de GAs Livres e GAs conjugadas.....	23
2.2.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	25
2.2.5.1. Separação de GAs Radioativas Padrão.....	26
2.2.5.2. Preparo das Amostras e Análise dos Metabó- litos de GAs produzidos.....	27
3. RESULTADOS.....	29
3.1. GAs Radioativas Padrão.....	29
3.2. Metabolismo de [1,2- <sup>3</sup> H]GA <sub>4</sub> e GA <sub>4</sub> não Marcada.....	29
3.3. Metabolismo de GAs Durante a Germinação.....	31
3.3.1. Metabolismo de [1,2- <sup>3</sup> H]GA <sub>1</sub> .....	31
3.3.2. Metabolismo de [1- <sup>3</sup> H]GA <sub>8</sub> .....	34
3.3.3. Metabolismo de [1,2- <sup>3</sup> H]GA <sub>4</sub> .....	38

3.3.4. Metabolismo de [2,3- <sup>3</sup> H]GA <sub>20</sub> .....	43
3.3.5. Metabolismo de [1- <sup>3</sup> H]GA <sub>5</sub> .....	46
3.3.6. Metabolismo de [17- <sup>3</sup> H]GA <sub>19</sub> .....	52
4. DISCUSSÃO.....	53
5. RESUMO.....	62
6. LITERATURA CITADA.....	64

## ABREVIATURAS

BHT	Butil-hidroxi tolueno
Bq	Becquerels (1 Bq = 60 dpm)
cps	Contagens por segundos
C <sub>19</sub> -GA	Giberelina com dezenove átomos de carbono
C <sub>20</sub> -GA	Giberelina com vinte átomos de carbono
dpm	Desintegrações por minutos (Kdpm= $\times 10^3$ dpm )
GA	Giberelina
GA-GEs	Giberelina éster glicosídeo
GA-GET	Giberelina éter glicosídeo
[ <sup>3</sup> H]GA	Giberelina tritiada
GC-MS	Cromatografia gasosa ligada a um espectrometro de massa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-RC	Cromatografia líquida de alta eficiência ligada a um detector de radioatividade
M <sub>n</sub>	M = metabólito; n = nº do metabólito
ODS-Hypersil	Octadecil-Hypersil
POPOP	1,4-bis-(5-feniloxazol-2-il-benzeno)
PPO	2,5-bifeniloxazole
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
QAE-Sephadex	Troca aniônica quaternário

## 1. INTRODUÇÃO

As giberelinas são substâncias reguladoras de crescimento e componentes endógenos das angiospermas, gimnospermas, pteridófitas e provavelmente também de musgos, hepáticas e algas (CROZIER, 1983).

Uma revisão do histórico das giberelinas foi feita recentemente por TAKAHASHI *et al.* (1990). No início deste século KUROSAWA (1926), estudando uma doença de arroz chamada "Bakanae", que era caracterizada por um crescimento excepcional da planta, observou que o fungo *Gibberella fujikuroi* era responsável por essa condição e que, em laboratório, culturas de fungos secretavam uma substância que causava o mesmo alongamento da parte aérea em plântulas de arroz sadias, isto é, não contaminadas pelo fungo. YABUTO & SUMIKI (1938) conseguiram cristalizar esta substância indutora do crescimento, que eles chamaram de giberelina. Em 1959, CROSS *et al.* foram os primeiros a determinarem a estrutura do ácido giberélico ou GA<sub>3</sub>, e logo depois disto, foi demonstrado que as GAs são componentes naturais, também, dos tecidos das plantas superiores. A primeira GA identificada em plantas superiores foi a GA<sub>1</sub>, em sementes imaturas de *Phaseolus multiflorus* (agora classificada como *Phaseolus coccineus*), e a GA isolada pareceu ser a mesma detectada em fungos (MacMILLAN & SUTER, 1958).

Em plantas superiores as GAS controlam uma série de processos de desenvolvimento, como alongamento do eixo caulinar, germinação, crescimento de gemas, floração, desenvolvimento de frutos e indução enzimática (CROZIER, 1981 e 1983; GRAEBE, 1987).

Até o presente momento 72 GAS (Figura 1) foram isoladas de fungos e plantas superiores e foram denominadas como GAS livres (HEDDEN, 1987). Entre estas, algumas foram encontradas em culturas de fungos, outras são exclusivas de plantas superiores, enquanto que existem GAS que foram detectadas em ambas (CROZIER, 1983). Em tecidos de plantas superiores estas giberelinas variam qualitativa e quantitativamente com o tempo, podendo se concluir que as GAS são ativamente metabolizadas nos tecidos das plantas (SPONSEL, 1983a). Várias das GAS conhecidas são provavelmente precursoras ou catabólitos de algumas poucas GAS que são as que têm função hormonal *per se* (HEDDEN *et al.*, 1978). Existem também giberelinas conjugadas sendo as mais comuns as ligadas covalentemente a uma molécula de glicose (SCHNEIDER, 1983). Elas são principalmente de dois tipos, GA-GEt e GA-GEs. A GA-GEt tem a molécula de glicose ligada a grupo hidroxil e a GA-GEs tem sua molécula de glicose ligada ao grupo carboxílico do C-7 (SCHNEIDER, 1983).

Estruturalmente, as GAS são diterpenos cíclicos que possuem um esqueleto básico de *ent*-giberelano (Figura 2) e

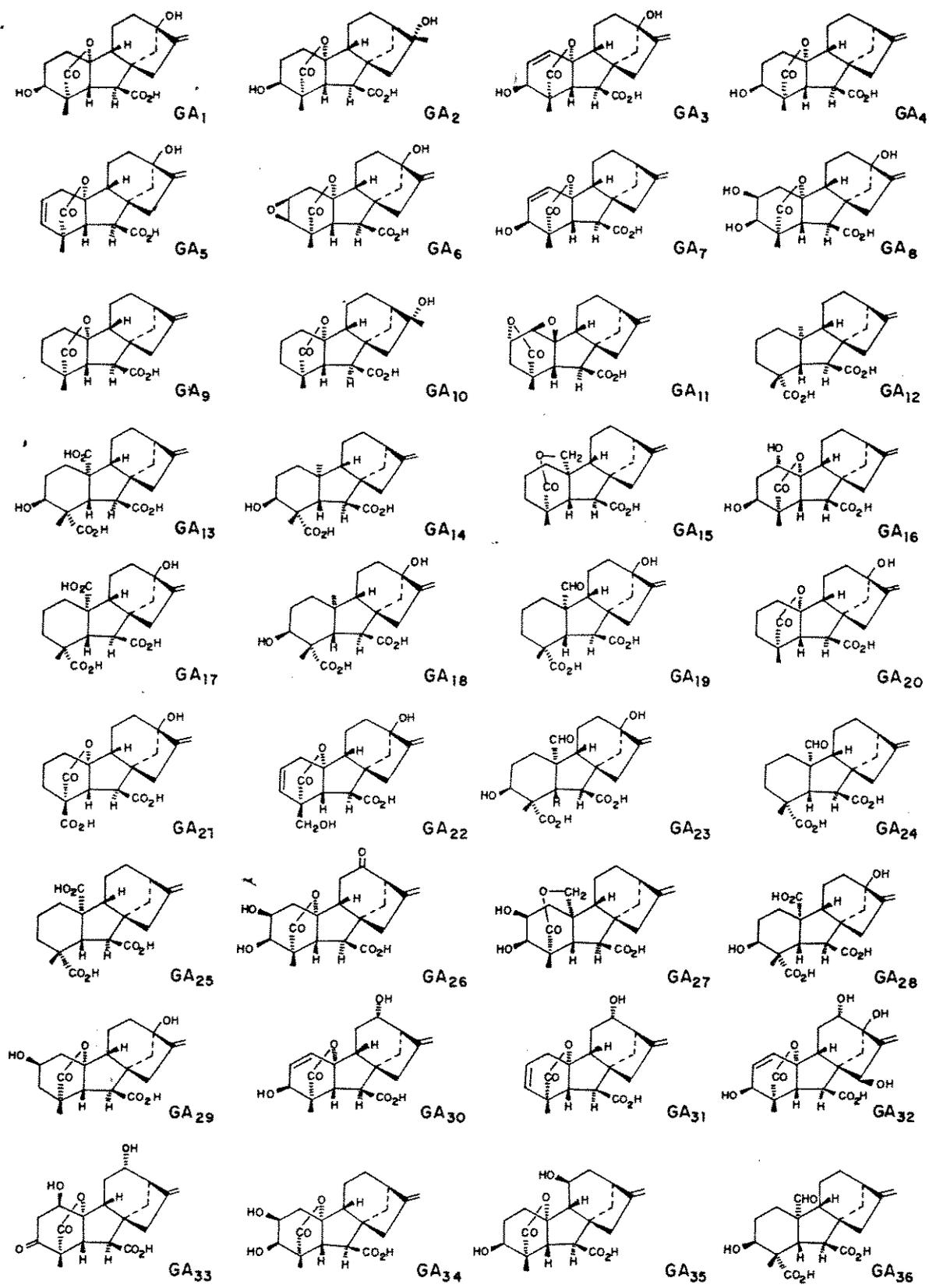
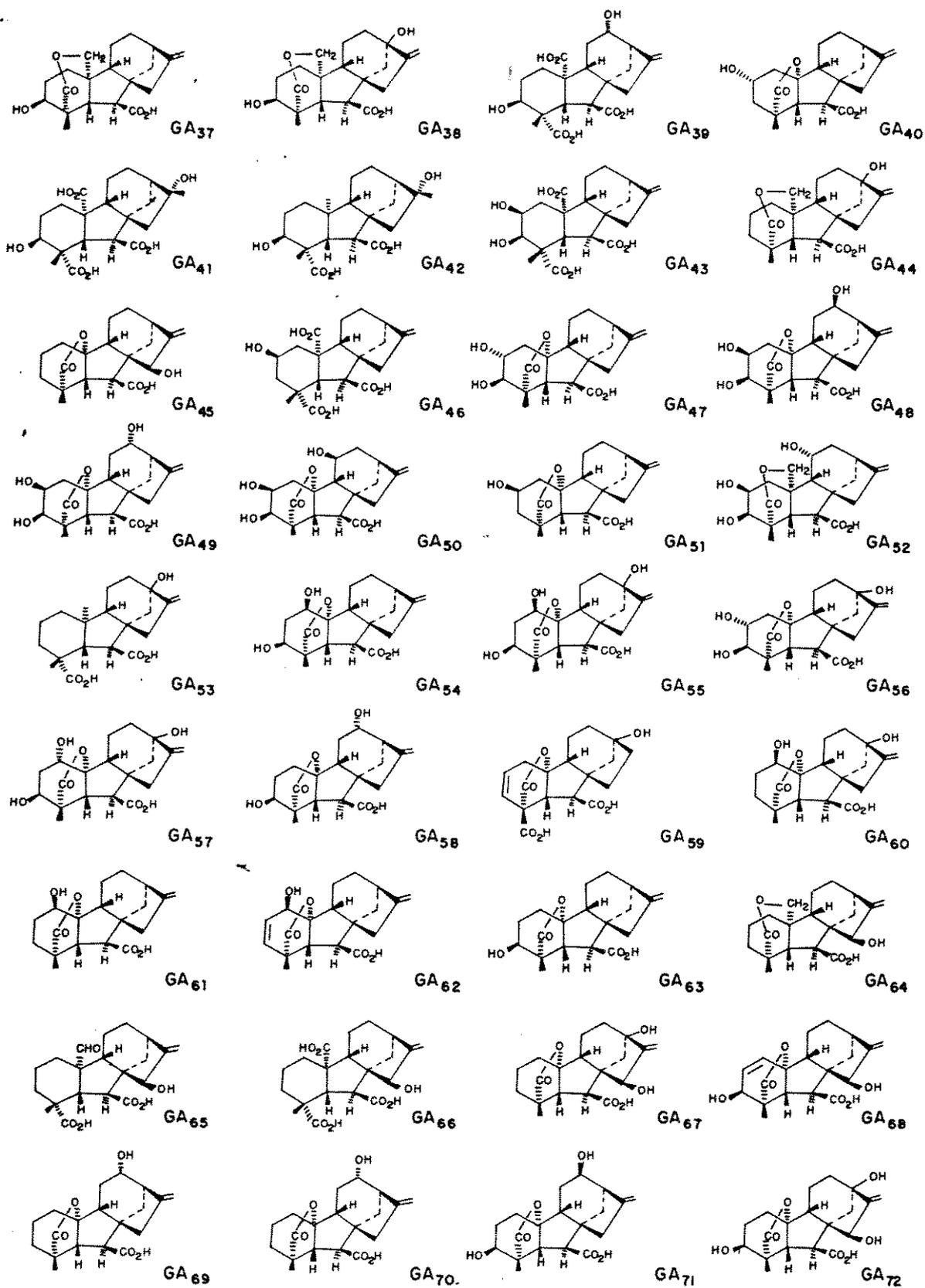


Figura 1. Estruturas das Gas (GA<sub>1</sub> - GA<sub>36</sub>) (HEDDEN, 1987).



Continuação da Figura 1. Estruturas das GAs (GA37 - GA72)  
(HEDDEN, 1987).

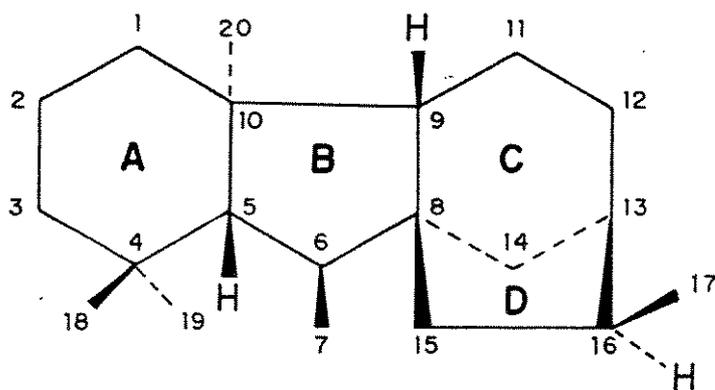


Figura 2. Esqueleto de *ent*-giberelano (CROZIER, 1983).

podem ser divididas em dois grupos: as C<sub>20</sub>-GAs, que possuem 20 átomos de carbono e as C<sub>19</sub>-GAs que possuem 19 átomos de carbono, pela perda do carbono 20 durante o metabolismo (CROZIER, 1983). As C<sub>20</sub>-GAs são caracterizadas pela presença do C-20 que pode aparecer como grupo CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH, CHO ou COOH. As que apresentam no C-20 um grupo CH<sub>2</sub>OH podem formar uma ligação  $\delta$ -lactona com o C-19. As C<sub>19</sub>-GAs possuem, com exceção da GA<sub>11</sub>, uma ligação  $\delta$ -lactona entre os carbonos 19-10. A presença de grupos hidroxila (-OH) geralmente ocorre nas posições 2 $\beta$ , 3 $\beta$  ou 13, embora possam ocorrer em outras posições da molécula. As variações nas posições das hidroxilações, carboxilações e ligações lactonas afetam o grau de atividade biológica das GAs nos bioensaios (CROZIER *et al.* 1970). As C<sub>19</sub>-GAs apresentam uma atividade biológica maior quando comparadas com as C<sub>20</sub>-GAs (REEVE & CROZIER, 1974). Foi demonstrando que, as C<sub>19</sub>-GAs com 3 $\beta$ -hidroxilação, 3 $\beta$ ,13-dihidroxilação ou dupla ligação na posição 1 e 2 são mais ativas, enquanto que as GAs com 2 $\beta$ -hidroxilação não apresentam atividade biológica (REEVE & CROZIER, 1974).

A biossíntese e metabolismo das GAs podem ser dividido em três etapas: (1<sup>o</sup>) a biossíntese do *ent*-caureno, a partir do mevalonato, (2<sup>o</sup>) a biossíntese do GA<sub>12</sub>-aldeído a partir do *ent*-caureno e (3<sup>o</sup>) a biossíntese de GAs a partir do GA<sub>12</sub>-aldeído (GRAEBE, 1987). O primeiro e segundo caminho já estão bem estabelecidos, sendo aparentemente o mesmo tanto para fungos como para plantas superiores, enquanto que o ter-

ceiro caminho pode ser ramificado em várias direções dependendo da espécie e do tecido vegetal (HEDDEN *et al.*, 1978; CROZIER, 1981 e 1983; GRAEBE, 1987).

O caminho biossintético para o *ent*-caureno via ácido mevalônico, já foi bem estudado no fungo *Gibberella fujikuroi* (EVANS & HANSON, 1972 apud COOLBAUGH, 1983) e em sistemas livres de células de plantas superiores, por exemplo, sementes imaturas de *Marah macrocarpus* (GRAEBE *et al.*, 1965), *Curcubita maxima* (GRAEBE, 1969), *Phaseolus coccineus* (TURNBULL *et al.*, 1986) e em plântulas de *Ricinus communis* (ROBINSON & WEST, 1970), *Pisum sativum* (COOLBAUGH *et al.*, 1973) e *Zea mays* (HEDDEN & PHINNEY, 1979). Como mostra a Figura 3, o ácido mevalônico é primeiramente convertido em isopentenil-pirofosfato que é o intermediário na formação dos terpenos cíclicos. O próximo passo é a formação do geranylgeranyl-pirofosfato, que é metabolizado via copalil-pirofosfato, dando origem ao *ent*-caureno (COOLBAUGH, 1983). As enzimas responsáveis pela conversão do ácido mevalônico em *ent*-caureno são solúveis e requerem ATP,  $Mg^{++}$  e  $Mn^{++}$  como cofatores (COOLBAUGH, 1983).

O metabolismo do *ent*-caureno até o GA<sub>12</sub>-aldeído foi demonstrado no fungo *G. fujikuroi* (WEST, 1973) e em sistemas livres de células de várias angiospermas como *Pisum sativum* (COOLBAUGH & MOORE, 1971) e *Zea mays* (WURTELE *et al.*, 1982). Embora não tenha sido confirmada em plantas superiores intactas devido às dificuldades técnicas do estudo, assume-se que

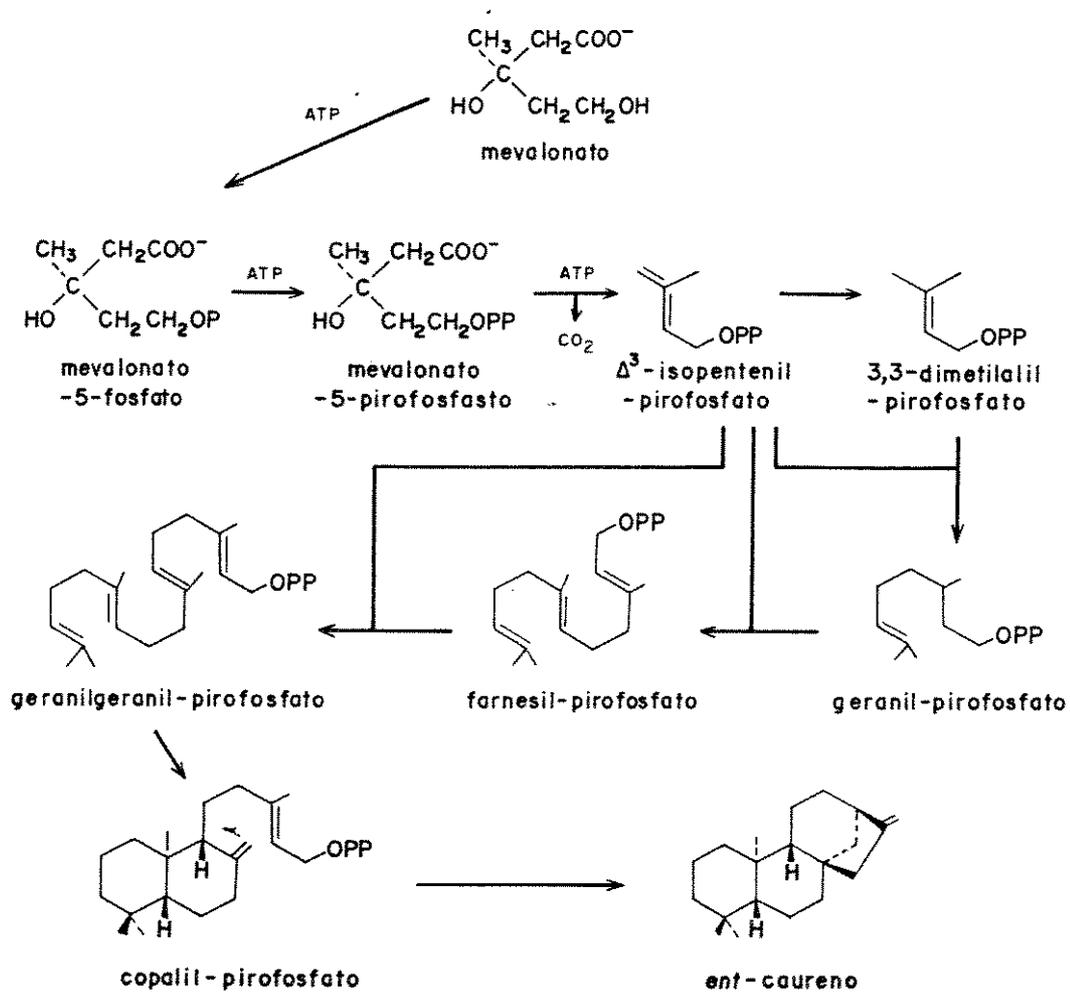


Figura 3. Via biossintética do mevalonato ao *ent*-caureno (COOLBAUGH, 1983).

a via demonstrada *in vitro* também ocorra *in vivo* (SPONSEL, 1983a). Esta etapa do metabolismo está esquematizada na figura 4 (HEDDEN, 1983). Compreende os seguintes passos: o entcaureno é oxidado sequencialmente, produzindo o ácido ent-7- $\alpha$ -hidroxicaurenóico que é o precursor direto da GA<sub>12</sub>-aldeído (HEDDEN, 1983). Há, também, uma segunda ramificação que é a produção do ácido ent-6 $\alpha$ -7 $\alpha$ -dihidroxicaurenóico a partir do ácido ent-7 $\alpha$ -hidroxicaurenóico. O papel fisiológico deste produto até o momento permanece desconhecido (MORITZ, 1989).

Os estudos da biossíntese e metabolismo das giberelinas a partir da GA<sub>12</sub>-aldeído são importantes para esclarecer quais são as GAS fisiologicamente ativas e como e onde os níveis endógenos das mesmas são controladas (HEDDEN, 1987).

A conversão de GA<sub>12</sub>-aldeído (C<sub>20</sub>-GA) em outras GAS foi bastante estudada em *G. fujikuroi* (BEARDER, 1983). Estes estudos fornecem a base para o estudo do metabolismo das GAS em plantas superiores. Assim, notou-se em *G. fujikuroi*, que após hidroxilações e oxidações do GA<sub>12</sub>-aldeído formando outras GAS de 20 carbonos, ocorre a perda do C-20 da molécula dando origem às GAS com 19 carbonos (BEARDER, 1983). Em plantas intactas as informações sobre as prováveis vias metabólicas partindo do GA<sub>12</sub>-aldeído formando as C<sub>19</sub>-GAS são especulativas e se baseiam nos tipos de C<sub>20</sub>-GAS que ocorrem naturalmente na espécie onde o metabolismo está sendo estudado (SPONSEL, 1983a). Como nas angiospermas, existe uma série de C<sub>20</sub>-GAS estruturalmente diferentes das encontradas em *G.*

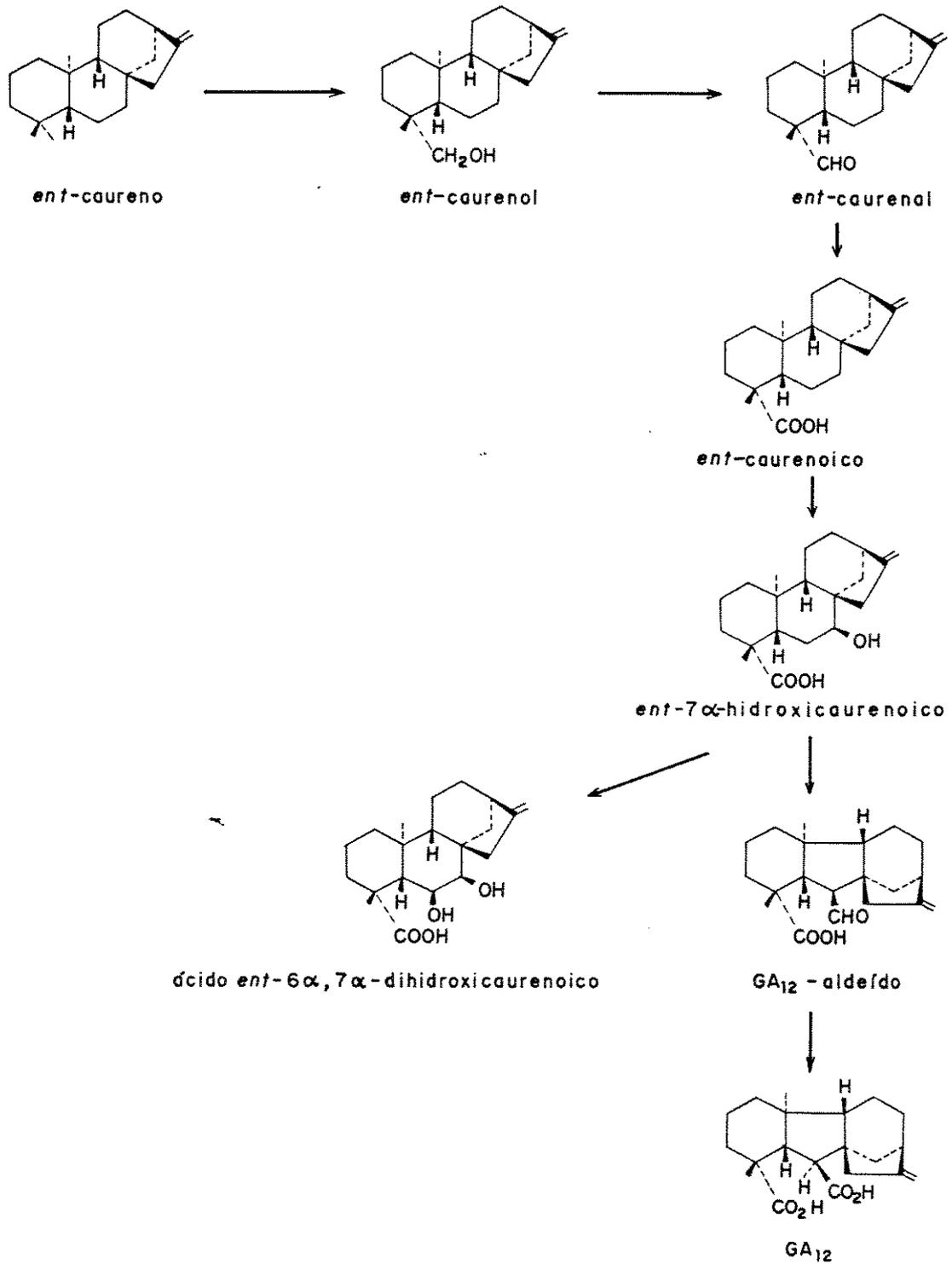


Figura 4. Metabolismo do *ent*-caureno até  $GA_{12}$ -aldeído (HEDDEN, 1983).

*fujikuroi*, presume-se que, em plantas superiores, existam vias metabólicas alternativas às encontradas em fungos (SPONSEL, 1983a).

Estudos sobre o metabolismo de reguladores de crescimento em plantas superiores apresentam algumas dificuldades. A quantidade de GAS em plantas superiores, especialmente nos tecidos vegetativos, é muito baixa (TAKAHASHI *et al.*, 1986), devendo-se tomar cuidado no fornecimento de precursores às plantas para que sejam aplicadas concentrações fisiológicas (SPONSEL, 1983a). Tem-se conhecimento de que apenas uma pequena quantidade do precursor fornecido à planta é absorvido por ela. Parte da substância que foi absorvida é translocada para o sítio de metabolismo, enquanto uma outra parte pode desviar e ir, por exemplo, para o vacúolo onde é convertida, por enzimas não específicas, em produtos que não são produzidos *in vivo* (HEDDEN, 1987). Também aparecem problemas durante a extração e purificação dos metabólitos dificultando sua identificação (SPONSEL, 1983a).

Fatores ambientais como luz, fotoperíodo, disponibilidade de água, etc, também podem alterar o metabolismo das C<sub>19</sub>-GAS fornecidas às plantas durante um estudo do metabolismo. A maior parte dos trabalhos mostrou desativação das GAS aplicadas, tanto por 2 $\beta$ -hidroxilação como por conjugação. Estes passos metabólicos não ocorrem em *G. fujikuroi*, onde estas GAS não têm função (SPONSEL, 1983a). Desta forma, SPONSEL (1983a) sugere que estes processos de desativação devem estar

especialmente relacionados ao controle dos níveis de GAS biologicamente ativas nos tecidos das plantas superiores.

Estudos *in vitro*, muitas vezes podem superar estas dificuldades. A desvantagem desta técnica é, por exemplo, a fragmentação do tecido da planta, possibilitando o acesso de enzimas ao substrato, do qual elas são normalmente separadas espacialmente. Portanto, experimentos usando plantas intactas são necessários para verificar se uma determinada via metabólica também ocorre *in vivo*. Fenômenos que envolvem a interação de diferentes tecidos ou órgãos da planta são também mais bem estudados *in vivo* (SPONSEL, 1983a).

Sementes imaturas mostram ser fontes ricas de GAS e podem conter no total cerca de 50 mg de GA por kg de peso de matéria fresca. Esta quantidade é muitas vezes maior do que a detectada em outros tecidos de plantas superiores (ver HEDDEN, 1987). A quantidade e a diversidade de GAS nas sementes imaturas e maduras de *Phaseolus coccineus* e *Phaseolus vulgaris* têm feito destas espécies o material ideal para o estudo do metabolismo de GAS (SPONSEL, 1983a). DURLEY *et al.* (1971) utilizando cromatografia gasosa, identificaram as C<sub>19</sub>-GAS GA<sub>1</sub>, GA<sub>5</sub>, GA<sub>6</sub>, GA<sub>8</sub>, GA<sub>17</sub>, GA<sub>19</sub> e GA<sub>20</sub>, em diferentes estádios de desenvolvimento das sementes de ambas as espécies (*Phaseolus coccineus* e *Phaseolus vulgaris*). HIRAGA *et al.* (1974a e 1974b) isolaram as GAS livres e conjugadas GA<sub>4</sub>, GA<sub>38</sub>, GA<sub>48</sub>, GA<sub>8</sub>-GEt, GA<sub>1</sub>-GEs, GA<sub>4</sub>-GEt, GA<sub>37</sub>-GEt e GA<sub>38</sub>-GEt, de sementes imaturas e maduras de *Phaseolus vulgaris*. Os resultados indi-

cam que há uma ampla distribuição das GAs livres durante o desenvolvimento da semente, mas há um declínio das GAs livres e um acúmulo das GAs-conjugadas à medida que a semente se desenvolve (HIRAGA *et al.*, 1974a e 1974b).

O metabolismo das C<sub>19</sub>-GAs em *Phaseolus vulgaris* foi bastante estudado por YAMANE *et al.* (1975 e 1977). Este grupo tomou a precaução de usar GAs que ocorrem endogenamente nesta espécie. A via metabólica das C<sub>19</sub>-GAs foi estabelecida através do fornecimento de C<sub>19</sub>-GAs marcadas radioativamente às sementes de *Phaseolus vulgaris* tanto *in vivo* (YAMANE *et al.*, 1975), como *in vitro* (YAMANE *et al.*, 1977). Os resultados obtidos nestes trabalhos utilizando cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa, sugeriram que existem duas ramificações da via biossintética das GAs, a partir da GA<sub>12</sub>-aldeído como ilustra a Figura 5. A principal diferença entre as duas é que uma envolve a hidroxilação no carbono da posição 13 da molécula e a outra envolve hidroxilação no carbono da posição 3 da molécula. Na via da hidroxilação no carbono 13, a GA<sub>12</sub>-aldeído sofre hidroxilação no carbono 13 dando origem ao GA<sub>53</sub>-aldeído que perde o grupo aldeído da posição 7 dando origem ao GA<sub>53</sub>. A GA<sub>12</sub>-aldeído pode também ser convertida em GA<sub>12</sub> que sofre hidroxilação no carbono 13 produzindo GA<sub>53</sub>. A GA<sub>53</sub> é metabolizada dando origem à GA<sub>44</sub> que é convertida em GA<sub>19</sub>. Esta última dá origem à GA<sub>20</sub> (primeira C<sub>19</sub>-GA). A GA<sub>20</sub> pode sofrer uma oxidação produzindo GA<sub>5</sub>, podendo, também, se ligar a uma molécula de glicose formando uma GA conju-

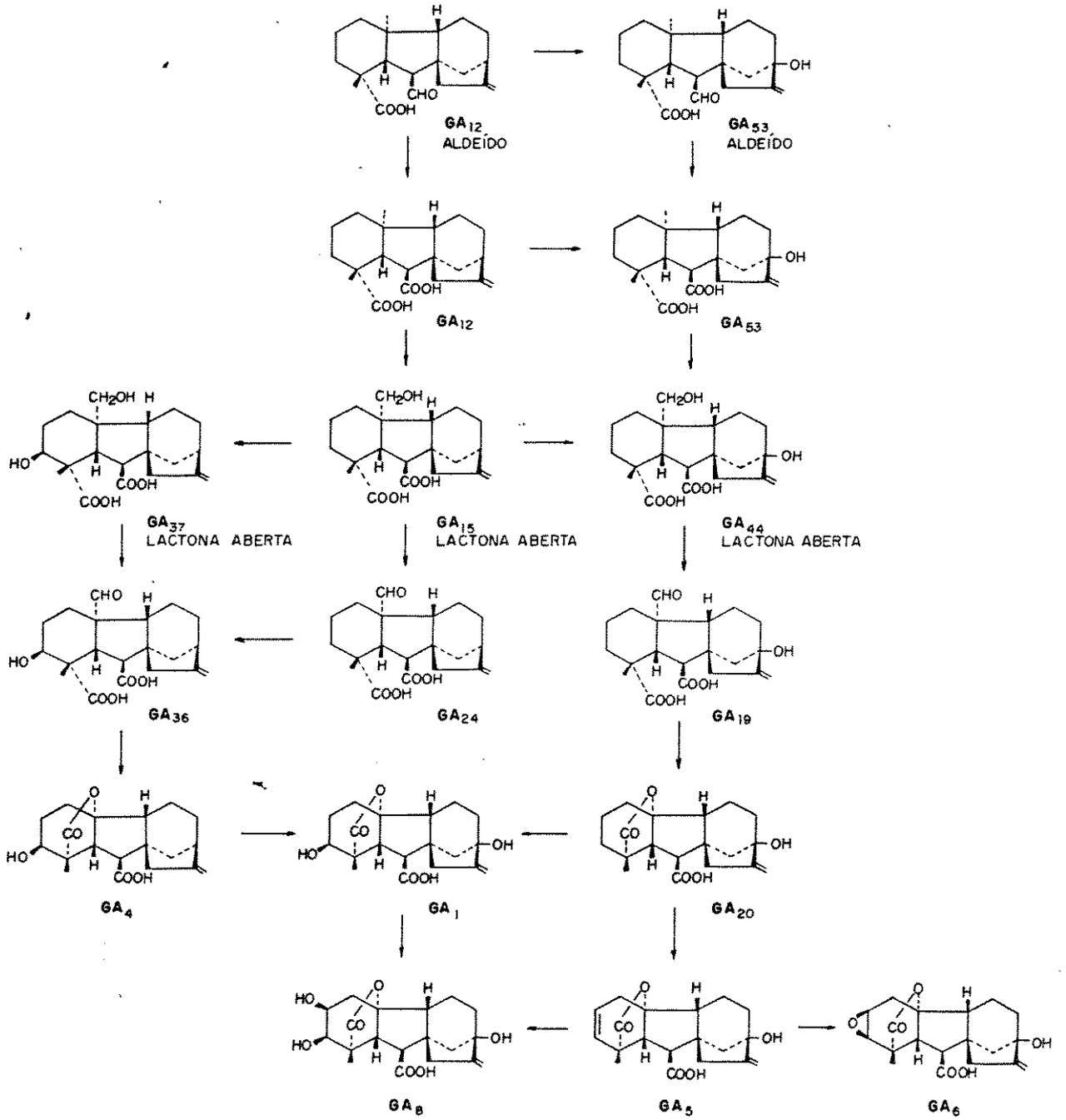


Figura 5. Caminho hipotético do metabolismo de GAs (YAMANE *et al.*, 1975 e 1977).

gada, a GA<sub>20</sub>-GEs. Através de outra oxidação a GA<sub>5</sub> pode dar origem à GA<sub>6</sub>. Na via de hidroxilação no carbono 3, a GA<sub>12</sub>-aldeído é metabolizada, dando origem à GA<sub>15</sub> que é convertida em em GA<sub>36</sub>, via GA<sub>24</sub> e/ou GA<sub>37</sub>. A etapa final desta sequência é a conversão da GA<sub>36</sub> em GA<sub>4</sub>. Os resultados obtidos mostraram que a GA<sub>20</sub> através de uma hidroxilação no C-3 e a GA<sub>4</sub> através de uma hidroxilação no C-13 dão origem a GA<sub>1</sub>, mas não há indicações de qual seja o caminho preferencial para a síntese da GA<sub>1</sub> endógena. A GA<sub>1</sub>, por sua vez, pode ser desativada por uma 2β-hidroxilação formando a GA<sub>8</sub> (YAMANE *et al.*, 1975 e 1977). Tanto a GA<sub>1</sub> como a GA<sub>8</sub> podem se ligar a açúcares formando as GAs conjugadas: GA<sub>1</sub>-GEt, GA<sub>1</sub>-GEs e GA<sub>8</sub>-GEs (MALCOLM *et al.*, 1991).

FRYDMAN *et al.* (1974) e SPONSEL (1983b) identificaram em sementes imaturas de *Pisum sativum* cv. Progress N<sup>o</sup>9, a GA<sub>9</sub>, a GA<sub>17</sub>, a GA<sub>20</sub>, a GA<sub>44</sub>, a GA<sub>51</sub> e o catabólito da GA<sub>29</sub>. Em *Vicia faba* além das GAs citadas acima SPONSEL *et al.* (1979) identificaram também a GA<sub>53</sub>.

Estudos feitos por KAMIYA & GRAEBE (1983) *in vitro*, com sementes de *Pisum sativum* cv. Kleinrheinlander sugeriram que as primeiras C<sub>19</sub>-GAs formadas são as GA<sub>9</sub> e GA<sub>20</sub>, através de duas vias metabólicas. Uma delas é a via de não hidroxilação precoce do C-13, na qual a primeira C<sub>19</sub>-GA formada é a GA<sub>9</sub>, tendo como precursora imediata a GA<sub>24</sub>. Este caminho é semelhante ao que ocorre em fungos. A outra é a via de hidroxilação precoce do carbono 13 (Figura 5). Parece que esta via

metabólica, da "hidroxilação precoce na posição 13" é de ocorrência geral em plantas superiores (BEARDER, 1983).

Embora pouco se saiba a respeito da compartimentação das giberelinas a nível celular, alguns trabalhos mostram que uma das enzimas envolvidas na biossíntese das GAs, a 2 $\beta$ -hidroxilase, está predominantemente presente nas testas das sementes. TAKAHASHI *et al.* (1986) trabalhando com extrato de sementes imaturas de *Phaseolus vulgaris* não detectaram a presença desta enzima. Contudo, quando foram detectadas as GAs endógenas no embrião e na testa, tanto a GA<sub>8</sub> como a GA<sub>29</sub>, ambas com grupo hidroxila no carbono 2, estavam presentes nas duas regiões, mas em maior quantidade na testa. Resultado semelhante foi obtido em sementes maduras de *Phaseolus coccineus* (ALBONE *et al.*, 1984), onde o GA<sub>8</sub> e o seu catabólito também estavam presentes em maior quantidade na testa.

Evidências crescentes sobre a compartimentação das GAs vêm da descoberta que a GA<sub>20</sub> e a GA<sub>29</sub> estão presentes nos cotilédones de sementes maduras de *Pisum sativum* (SPONSEL, 1983b). A GA<sub>29</sub> é sintetizada nos cotilédones e transportada para a testa onde é convertida em catabólito do GA<sub>29</sub>. Este é conduzido até o embrião durante o processo de germinação. Apesar da atividade biológica das GAs conjugadas e catabólitos das GAs ser muito mais baixa que a das GAs livres, elas podem regular processos fisiológicos alterando o nível de substâncias reguladoras de crescimento ativas.

Estudando o processo de alongamento do eixo caulinar, em plântulas de *Zea mays*, que PHINNEY & SPRAY (1982) descobriram que a GA<sub>1</sub> é a giberelina biologicamente ativa *per se*. HEDDEN *et al.* (1972) identificaram GA<sub>17</sub>, GA<sub>19</sub>, GA<sub>20</sub>, GA<sub>44</sub>, GA<sub>53</sub> e em baixas quantidades GA<sub>1</sub>, GA<sub>8</sub> e GA<sub>29</sub> como componentes endógenos de plântulas normais de milho e isto os levou a supor que a "via de hidroxilação precoce do C-13" (Figura 5) poderia ocorrer nesta espécie. O estudo de mutantes anões de milho nomeados de dwarf 1 (d-1), dwarf 2 (d-2), dwarf 3 (d-3) e dwarf 5 (d-5), contribuiu para o estabelecimento dos diferentes passos desta via. O nanismo nestes mutantes é expresso após a germinação e pode ser superado através de tratamentos com GAs (PHINNEY, 1984). Os resultados obtidos nesses experimentos indicam que o nanismo é atribuído a bloqueios em diferentes passos da via biossintética que leva à formação da GA<sub>1</sub>. Estudos semelhantes feitos com mutantes de *Pisum sativum* (INGRAM *et al.*, 1984) e *Oryza sativa* (SUZUKI *et al.*, 1981) sugerem que a GA<sub>1</sub>, também, pode ser a "GA ativa" que controla o alongamento do eixo caulinar.

Apesar dos estudos com milho (PHINNEY, 1984), ervilha (INGRAM *et al.*, 1984) e arroz (SUZUKI *et al.*, 1981) terem ajudado a apontar a estrutura da GA "ativa", eles fornecem poucos esclarecimentos sobre como realmente a GA promove o alongamento do eixo caulinar. Deve existir uma sequência de eventos, partindo da interação primária da GA com o seu sítio receptor até o processo real de alongamento celular. Acredi-

ta-se que os receptores da GA possam ser proteínas (MONTEIRO *et al.*, 1985).

*Dalbergia miscolobium*, também denominada *D. violacea* ou *D. dolycopetala* é uma espécie de leguminosa de porte arbóreo, presente em todos os cerrados desde o Paraná até o Ceará. É popularmente conhecida como "cabiúna-do-cerrado" ou "jacarandá-do-cerrado" e seu potencial madeireiro é semelhante ao de *D. nigra*, chamada "jacarandá-da-bahia" (RIZZINI, 1971). MONTEIRO *et al.* (1988) detectaram a presença de GA<sub>1</sub>, na concentração de 600 pmoles.g<sup>-1</sup> de peso de matéria fresca após 3 horas de embebição das sementes de *D. miscolobium*. Este nível diminuiu até 200 pmoles.g<sup>-1</sup> de peso fresco após 24 horas de embebição, permanecendo relativamente constante durante os 5 dias subsequentes. Apesar de mudanças nos níveis endógenos de GA<sub>1</sub> terem sido medidas durante o crescimento inicial de *D. miscolobium*, não se conhece nada a respeito do metabolismo de giberelinas nesta planta. Como já foi dito anteriormente, a via biossintética das GAs a partir do mevalonato até GA<sub>12</sub>-aldeído, parece ser comum para todas as plantas, mas a partir daí variações podem ocorrer entre espécies diferentes (GRAEBE, 1987). Apesar destas variações, existe uma sequência básica para todas as vias que é a oxidação sucessiva do carbono 20, levando à sua eliminação da molécula e a formação de giberelinas com 19 carbonos, que têm atividade biológica maior (BEARDER, 1983). Após a perda do carbono 20, hidroxilações ocorrem nos carbonos 2, 3 e 13 levando à forma-

ção da GA<sub>1</sub> que, em várias plantas, é a giberelina biologicamente ativa (PHINNEY, 1984).

O objetivo deste trabalho consistiu em estudar, em *D. miscolobium*, o metabolismo das giberelinas precursoras diretas da GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub> e GA<sub>20</sub>, bem como de outros intermediários e produtos do metabolismo da GA<sub>1</sub>, durante o crescimento inicial do embrião, a fim de se entender o controle dos níveis endógenos de GA<sub>1</sub> nesta fase do desenvolvimento.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material Vegetal

As sementes de *Dalbergia miscolobium* utilizadas neste trabalho foram coletadas entre abril e maio de 1989, no quilômetro 5 da antiga estrada que dava acesso à cidade de Itirapina-SP.

Os frutos foram trazidos para o laboratório do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia na Universidade Estadual de Campinas (SP), onde secaram em temperatura ambiente por cerca de um mês. Após este período foram selecionados, separando-se as sementes dos frutos. As sementes foram armazenadas em sacos plásticos lacrados e mantidas em geladeira a 11°C, até serem utilizadas.

### 2.2. Metabolismo de GAs Durante a Germinação

Visando o acompanhamento do metabolismo das GAs, durante a germinação, aplicaram-se às sementes, diferentes GAs radioativas. O efeito da quantidade de GA aplicada no metabolismo foi verificado aplicando-se [1,2-<sup>3</sup>H]GA<sub>4</sub> conjuntamente com GA<sub>4</sub> não marcada em diferentes concentrações.

### 2.2.1. Aplicação de GAs Radioativas

Após 3 horas de embebição, em água corrente, retirou-se o tegumento das sementes. Estas, foram colocadas em placa de Petri de 15 cm de diâmetro, forrada com papel de filtro umedecido com 10 ml de água destilada, formando lote de 15 sementes.

A seguir, com o auxílio de uma microseringa, foi aplicada sobre o eixo embrionário de cada semente, uma gota de 2  $\mu$ l contendo  $1 \times 10^6$  dpm das seguintes GAs radioativas: [1,2- $^3$ H]GA<sub>1</sub> (atividade específica  $1.1 \times 10^{15}$  Bq.mol<sup>-1</sup>), [1- $^3$ H]GA<sub>8</sub> (atividade específica  $7.3 \times 10^{12}$  Bq.mol<sup>-1</sup>), [1,2- $^3$ H]GA<sub>4</sub> (atividade específica  $1.4 \times 10^{15}$  Bq.mol<sup>-1</sup>), [2,3- $^3$ H]GA<sub>20</sub> (atividade específica  $5.3 \times 10^{13}$  Bq.mol<sup>-1</sup>), [1- $^3$ H]GA<sub>5</sub> (atividade específica  $1.9 \times 10^{14}$  Bq.mol<sup>-1</sup>) ou [17- $^3$ H]GA<sub>19</sub> (atividade específica  $1.8 \times 10^{15}$  Bq.mol<sup>-1</sup>). As GAs foram diluídas em metanol e água destilada, na proporção 50:50 (v/v). Estas giberelinas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Alan Crozier da Universidade de Glasgow (Escócia).

Após a aplicação de GAs as placas foram colocadas em câmara de germinação (FANEM 347F) a 25°C constantes, com iluminação contínua ( $320 \text{ uW.cm}^{-2}$ ) fornecida por lâmpadas fluorescentes, permanecendo neste local até o final do período de incubação.

O período de incubação, para os tratamentos que receberam [1,2- $^3$ H]GA<sub>1</sub>, [1- $^3$ H]GA<sub>8</sub>, [1- $^3$ H]GA<sub>5</sub> ou [17- $^3$ H]GA<sub>19</sub>, foi

de 24 e 96 horas, enquanto que, os que receberam  $[1,2-^3\text{H}]\text{GA}_4$  ou  $[2,3-^3\text{H}]\text{GA}_{20}$  tiveram os seguintes períodos de incubação: 0, 30 minutos, 2, 12, 24 e 96 horas.

### 2.2.2. Aplicação de $[1,2-^3\text{H}]\text{GA}_4$ e $\text{GA}_4$ não Marcada

Neste caso, as sementes foram preparadas como descrito no item 2.2.1.. Sobre o eixo embrionário de cada semente foi aplicada uma gota de 2  $\mu\text{l}$  contendo  $1 \times 10^6$  dpm de  $[1,2-^3\text{H}]\text{GA}_4$ , assim como concentrações crescentes de  $\text{GA}_4$  não marcada (controle, 0.1, 1, 10 e 100  $\mu\text{g}$ ) em solução de metanol e água destilada, na proporção 50:50 (v/v). O período de incubação utilizado foi de 96 horas, para cada um dos tratamentos.

### 2.2.3. Extração de GAs

Após a incubação das sementes, nos tratamentos citados acima, 10 sementes por tratamento foram colocadas em frascos de vidro, contendo 30 ml de solução de metanol e antioxidante BHT (0.85 mg : 1 l MeOH), onde permaneceram armazenadas em freezer, até a etapa posterior de extração.

A extração foi feita homogeneizando-se o material em um aparelho tipo Polytron acoplado a um ultrassonicador cinemático. O homogeneizado foi mantido por uma hora, em temperatura e luz ambientes, sendo então, filtrado a vácuo. Do resí-

duo foi feita a extração por mais 3 vezes, com igual volume de metanol, sendo os filtrados reunidos.

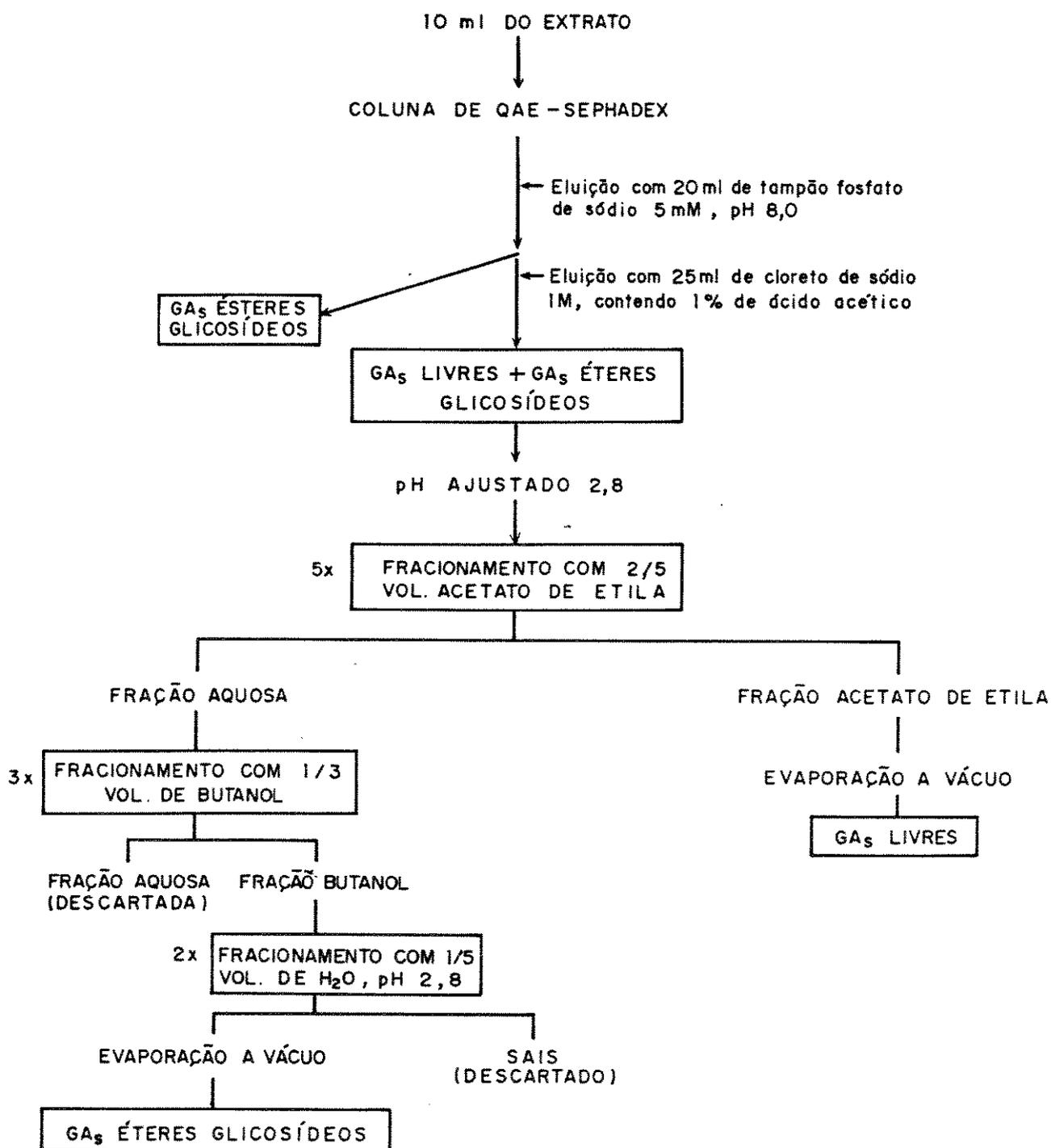
O extrato metanólico assim obtido, foi guardado em freezer até ser analisado por HPLC-RC.

#### 2.2.4. Fracionamento e Purificação de GAS Livres e GAS Conjugadas

Para o fracionamento e purificação de GAS livres e GAS conjugadas éteres e ésteres, utilizou-se o método descrito por Moritz (1989). Para tanto, foram utilizados, somente os extratos metanólicos de sementes incubadas com GAS radioativas durante um período de 96 horas, com exceção dos extratos incubados com  $[1-^3\text{H}]\text{GA}_8$  e  $[17-^3\text{H}]\text{GA}_{19}$  que não foram fracionados.

O extrato metanólico foi submetido à evaporação até secagem completa em evaporador rotatório, a vácuo, em temperatura de  $30^\circ\text{C}$ . A seguir, o extrato foi ressuscendido em 5 ml de tampão fosfato de sódio, 5 mM, pH 8.0 e a ele foi adicionado 0.2 g de PVPP insolúvel. Este extrato foi filtrado a vácuo e o resíduo de PVPP lavado com mais 5 ml de tampão fosfato.

O Esquema 1 mostra os principais passos do fracionamento usado para purificar as diferentes GAS presentes no extrato após o tratamento do mesmo com PVPP. Os 10 ml do extrato, preparado como descrito acima, foram colocados em uma co-



Esquema 1. Principais passos do fracionamento usado para purificar as GAs livres e GAs conjugadas presentes em extrato de sementes de *D. miscolobium* (MORITZ, 1989).

luna de QAE Sephadex, com 100x10 mm de diâmetro, previamente equilibrada com tampão fosfato 5 mM, pH 8.0. O extrato foi então eluído com 20 ml de tampão fosfato 5mM, pH 8.0. Os primeiros 30 ml coletados, continham GAS-GEs e foram liofilizados antes de serem analisados por HPLC-RC.

. As GAS livres e GAS-GEt foram eluídas da coluna de QAE-Sephadex, com 25 ml de cloreto de sódio 1 M, contendo 1% de ácido acético. O pH da solução dos 25 ml coletados foi ajustado para 2.8, sendo a seguir fracionado por 5 vezes com 2/5 do volume de acetato de etila. As GAS livres permaneceram na fração do acetato de etila que foi colocado em freezer por 24 horas, seguindo-se filtração para remoção da água e evaporação vácuo, antes de ser analisado por HPLC-RC. A fração aquosa, remanescente, foi fracionada por 3 vezes com 1/3 do volume de butanol para remover as GAS-GEt. Antes de secar, o extrato butanólico foi fracionado por 2 vezes com 1/5 do volume de água com pH ajustado para 2.8, para remover os sais presentes no extrato. Após secar o extrato butanólico, procedeu-se à análise dos conjugados éteres glicosídeos presentes por HPLC-RC.

#### 2.2.5.Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, utilizando coluna de ODS-Hipersil(5 µm) medindo 250 mm de comprimento por 5 mm de diâmetro, foi utili-

zado para análise dos metabólitos radioativos presentes nos extratos. A fase móvel constituiu-se em ácido acético 0.5% (solvente A) e metanol (solvente B).

Os solventes foram injetados na coluna (1 ml.min<sup>-1</sup>) por meio de 2 bombas controladas por um microcomputador (LKB, mod.2152). A medida em que o material saía da coluna, era misturado com líquido de cintilação (12 g de PPO, 200 ml de metanol, 300 ml de triton X-100 e 700 ml de xileno), bombeado numa taxa de 3 ml.min.<sup>-1</sup> (bomba-Reeve Analytical, mod.9702) antes de passar pela célula fluxo homogênea do detector de radioatividade (LKB, mod.1208).

Os picos radioativos foram registrados num integrador (LKB, mod.2122).

#### 2.2.5.1. Separação de GAS Radioativas Padrão

Para o estabelecimento de uma metodologia adequada para a análise dos metabólitos de GAS presentes nos extratos, várias eluições por gradiente foram feitas usando-se GAS radioativas padrão, até a obtenção da condição que proporcionou a melhor separação das mesmas.

Uma alíquota referente a  $10 \times 10^3$  dpm de cada uma das seguintes GAS radioativas: [1-<sup>3</sup>H]GA<sub>8</sub>; [1,2-<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub>; [<sup>3</sup>H]GA<sub>6/5</sub>; [2,3-<sup>3</sup>H]GA<sub>20</sub>; [17-<sup>3</sup>H]GA<sub>19</sub>; [1,2-<sup>3</sup>H]GA<sub>4</sub>; [17-<sup>3</sup>H]GA<sub>14</sub> e [2,3-<sup>3</sup>H]GA<sub>9</sub>, foi evaporada sob fluxo de N<sub>2</sub> líquido até a secagem completa. O material foi então ressuspendido em metanol

e ácido acético 0.5%, na proporção usada no início do gradiente, antes de ser analisado por HPLC-RC.

Com base nos resultados obtidos nesta separação, escolheu-se um gradiente de eluição de 20 a 70% de metanol em ácido acético 0.5%, durante 40 minutos, para a análise dos metabólitos dos extratos.

#### **2.2.5.2. Preparo das Amostras e Análise dos Metabólitos de GAs Produzidos**

Antes das amostras serem submetidas à HPLC, a radioatividade em cada extrato foi medida utilizando-se um contador de cintilação (LKB, WALLAC 1211 MINIBETA). Aliquotas de 1 ml, em cada um dos extratos, foram retiradas e à elas foram acrescentadas 5 ml de líquido de cintilação. O líquido de cintilação constituiu-se em: 5 g de PPO, 0.3 g de POPOP, 200 ml de triton X-100, 300 ml de tolueno e 700 ml de metanol. Baseando-se nestes resultados, retiram-se aliquotas de  $50 \times 10^3$  dpm, de cada um dos extratos, com exceção dos extratos de GA<sub>1</sub>-GEs, GA<sub>5</sub>-GEs e GA<sub>20</sub>-GEs onde retiram-se aliquotas de  $20 \times 10^3$  dpm. Cada aliquota foi submetida à secagem completa por evaporação a vácuo. Em seguida o material foi novamente ressuscendido em 1 ml de metanol e a amostra foi evaporada sob fluxo de N<sub>2</sub> líquido até a secagem. Só então o material tornou a ser ressuscendido em metanol e ácido acético 0.5%, na proporção 15:85 (v/v) e centrifugado para a remoção

de resíduos presentes.

Os extratos foram, então, analisados em HPLC-RC como descrito acima. Para a identificação dos picos radioativos obtidos foram feitas co-cromatografias com as GAs radioativas padrão.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. GAs Radioativas Padrão

A Figura 6 ilustra o perfil cromatográfico obtido após a HPLC-RC das GAs radioativas padrão. Notou-se que de acordo com a polaridade de cada GA, o tempo de retenção obtido foi o seguinte:  $[1-^3\text{H}]GA_8$  foi eluída em 12.9 minutos,  $[1,2-^3\text{H}]GA_1$  em 21.4 minutos,  $[^3\text{H}]GA_6$  em 22.5 minutos,  $[1-^3\text{H}]GA_5$  em 31.7 minutos,  $[2,3-^3\text{H}]GA_{20}$  em 32.9 minutos,  $[17-^3\text{H}]GA_{19}$  em 36.5 minutos,  $[1,2-^3\text{H}]GA_4$  em 42.4 minutos,  $[17-^3\text{H}]GA_{14}$  em 44.7 minutos e  $[2,3-^3\text{H}]GA_9$  em 46.2 minutos. Além dos picos referentes as GAs radioativas padrão, observou-se a presença de um outro pico ( $I_1$ ). Este pico foi atribuído a uma impureza radioativa presente na  $[^3\text{H}]GA_{6/5}$ . O tempo de retenção desta impureza foi de 27.5 minutos.

#### 3.2. Metabolismo de $[1,2-^3\text{H}]GA_4$ e $GA_4$ não Marcada

Com o intuito de se verificar o efeito da quantidade de GA aplicada no metabolismo, sementes de *D. miscolobium* receberam uma concentração constante de  $[1,2-^3\text{H}]GA_4$ , assim como, concentrações crescentes de  $GA_4$  não marcada ( controle,

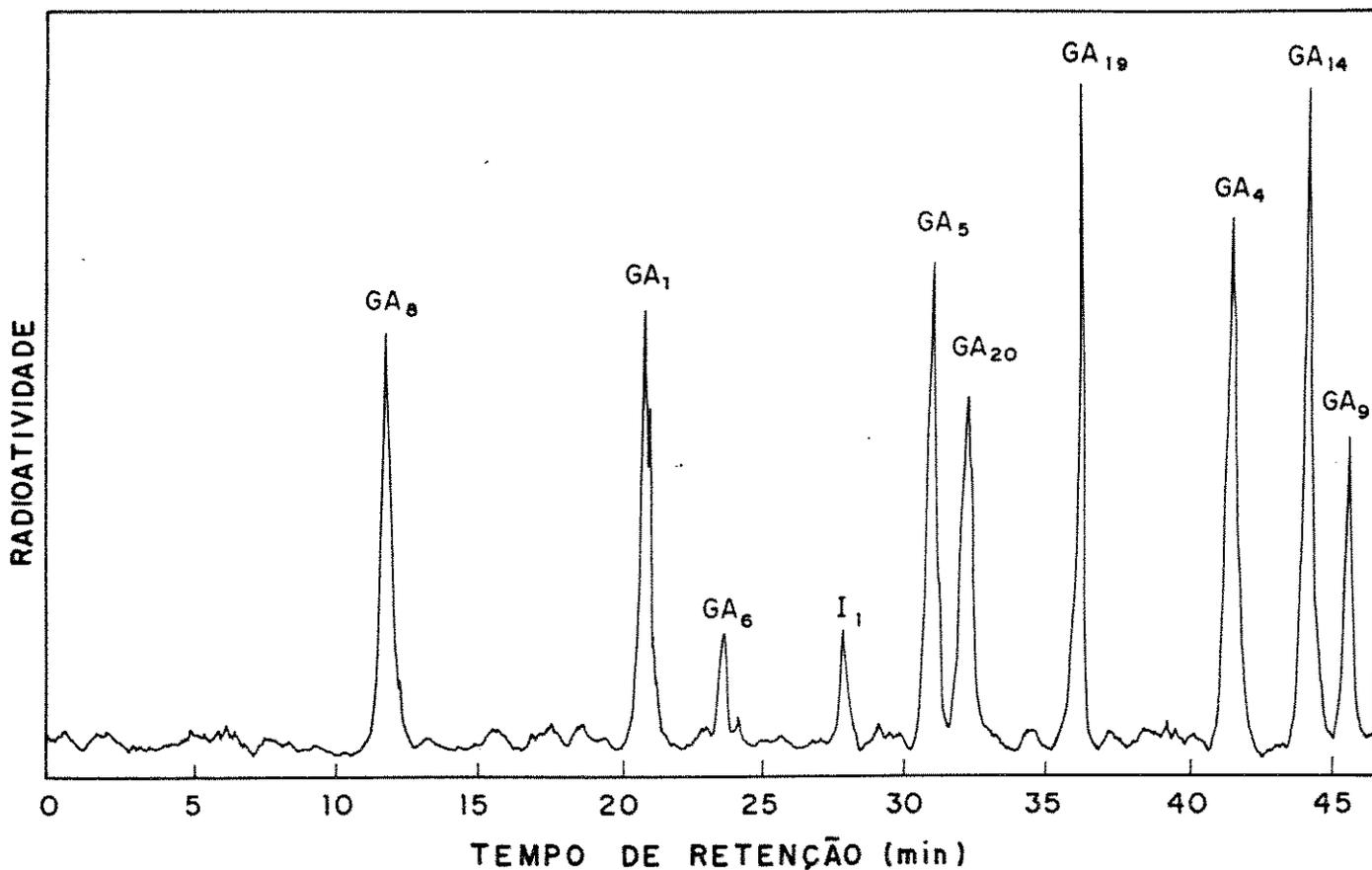


Figura 6. Perfil cromatográfico de GAs radioativas padrão após a HPLC-RC.

HPLC em fase reversa: 250x50mm ODS-Hypersil (5  $\mu$ m).

Fase móvel: 20%-70% de metanol em ácido acético 0.5%, durante 40 min.

Fluxo do solvente: 1 ml.min<sup>-1</sup>; Fluxo do líquido de cintilação: 3 ml.min<sup>-1</sup>.

Amostra: 10x10<sup>3</sup> dpm/GA padrão.

Sensibilidade do Detector de Radioatividade: 16 cps.

I<sub>n</sub> (I= impureza, n= n<sup>o</sup> da impureza).

0.1, 1, 10 ou 100  $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$  ). Os dados obtidos, após 96 horas (Tabela 1) mostraram que nos tratamentos que receberam até 10  $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$  de  $\text{GA}_4$  não marcada os metabólitos produzidos, assim como a quantidade de radioatividade recuperada para cada produto, foram praticamente os mesmos obtidos no controle. Já o tratamento com concentração de 100  $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$  de  $\text{GA}_4$  não marcada resultou em alterações substanciais nos metabólitos produzidos em relação ao controle.

### 3.3. Metabolismo de GAs Durante a Germinação

As transformações sofridas por cada uma das GAs radioativas aplicadas às sementes de *D. miscolobium* foram analisadas por HPLC-RC, após diferentes períodos de incubação. As concentrações de GAs aplicadas foram sempre menores do que 10  $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$  ( 0.01  $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ ).

#### 3.3.1. Metabolismo de [1,2- $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub>

A [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub> foi fornecida às sementes de *D. miscolobium*. Após 24 e 96 horas de incubação, houve produção de dois metabólitos, o M<sub>1</sub> e o M<sub>2</sub>, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 1. O efeito de quantidades crescentes de GA<sub>4</sub> não marcada no metabolismo de 1x10<sup>6</sup> dpm de [1,2-<sup>3</sup>H]GA<sub>4</sub> em sementes de *D. miscolobium*, 96 horas, após os tratamentos. Dados expressos em % de radioatividade de cada metabólito em relação ao total recuperado após HPLC-RC.

n.d.= metabólito não detectado.

T.R.= tempo de retenção.

M<sub>n</sub> = M (metabólito), n (n<sup>o</sup> do metabólito).

T.R. (min)	METABÓLITO	TRATAMENTOS				
		controle	[1,2- <sup>3</sup> H]GA <sub>4</sub> + 0,1µg GA <sub>4</sub> não marcada	[1,2- <sup>3</sup> H]GA <sub>4</sub> + 1,0µg GA <sub>4</sub> não marcada	[1,2- <sup>3</sup> H]GA <sub>4</sub> + 10 µg GA <sub>4</sub> não marcada	[1,2- <sup>3</sup> H]GA <sub>4</sub> + 100µg GA <sub>4</sub> não marcada
10,7	M <sub>1</sub>	nd	2%	2,5%	3%	nd
17,0	M <sub>2</sub>	3%	3%	4%	5%	nd
18,1	M <sub>3</sub>	nd	3%	6%	7%	14%
21,4	M <sub>4</sub>	nd	nd	nd	nd	43%
25,9	M <sub>5</sub>	nd	nd	nd	nd	5%
34,6	M <sub>6</sub>	27%	18%	19%	20%	nd
35,5	M <sub>7</sub>	nd	nd	4,5%	3%	nd
36,5	M <sub>8</sub>	3%	4%	4%	6%	14%
39,8	M <sub>9</sub>	45%	44%	39%	40%	9%
40,9	M <sub>10</sub>	22%	26%	21%	16%	5%
42,4	GA <sub>4</sub>	nd	nd	nd	nd	10%

Tabela 2. Metabolismo de  $[1,2-^3\text{H}]\text{GA}_1$ , em sementes de *D. miscolobium* após diferentes períodos de incubação. Dados expressos em % de radioatividade de cada metabólito em relação ao total recuperado após HPLC-RC.

?= quando acompanha um tipo de GA, indica que possivelmente esta é a GA presente.

n.d.= metabólito não detectado.

T.R.= tempo de retenção.

$M_n$  = M (metabólito), n ( $n^o$  do metabólito).

T.R. (min)	METABÓLITO	IDENTIFICAÇÃO	PER. DE INCUBAÇÃO	
			24 h	96 h
9,7	$M_1$	$\text{GA}_2\text{-GEt ?}$	16%	32%
18,1	$M_2$	$\text{GA}_1\text{-GEt ?}$	48%	68%
21,4		$\text{GA}_1$	44%	nd

A Figura 7 ilustra o perfil cromatográfico obtido após 96 horas de incubação. A [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub> foi toda metabolizada em M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>, ambos mais polares que a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub>, sendo que, o M<sub>1</sub> é mais polar que a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub>. Com o intuito de se investigar a identidade destes dois metabólitos, o extrato metanólico, de 96 horas, foi fracionado e purificado em GAS livres e GAS conjugadas. Os cromatogramas obtidos (Figura 8) mostraram que tanto o M<sub>1</sub> como o M<sub>2</sub> eram GAS éteres glicosídeos, uma vez que, eles estavam presentes apenas na fração GA-GET (Figura 8B). Assim, o M<sub>1</sub>, que foi eluído antes da [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub>, pode ser o [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub>-GET e o M<sub>2</sub>, que foi eluído após a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub> e antes da [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub> pode ser o [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub>-GET. Tanto na fração GA livre (Figura 8A) como na fração GA-GEs (Figura 8C), nenhuma radioatividade significativa foi detectada.

### 3.3.2. Metabolismo de [ $1-^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub>

Quando a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub> foi fornecida às sementes de *D. miscolobium*, os seguintes resultados foram observados:

Tanto no tratamento de 24 horas como no de 96 horas de metabolismo a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub> não foi totalmente metabolizada. O único metabólito produzido foi o M<sub>1</sub>, como mostra a Tabela 3, mais polar que a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub>. Possivelmente este metabólito, seja o mesmo identificado durante o metabolismo da [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub>, a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub>-GET.

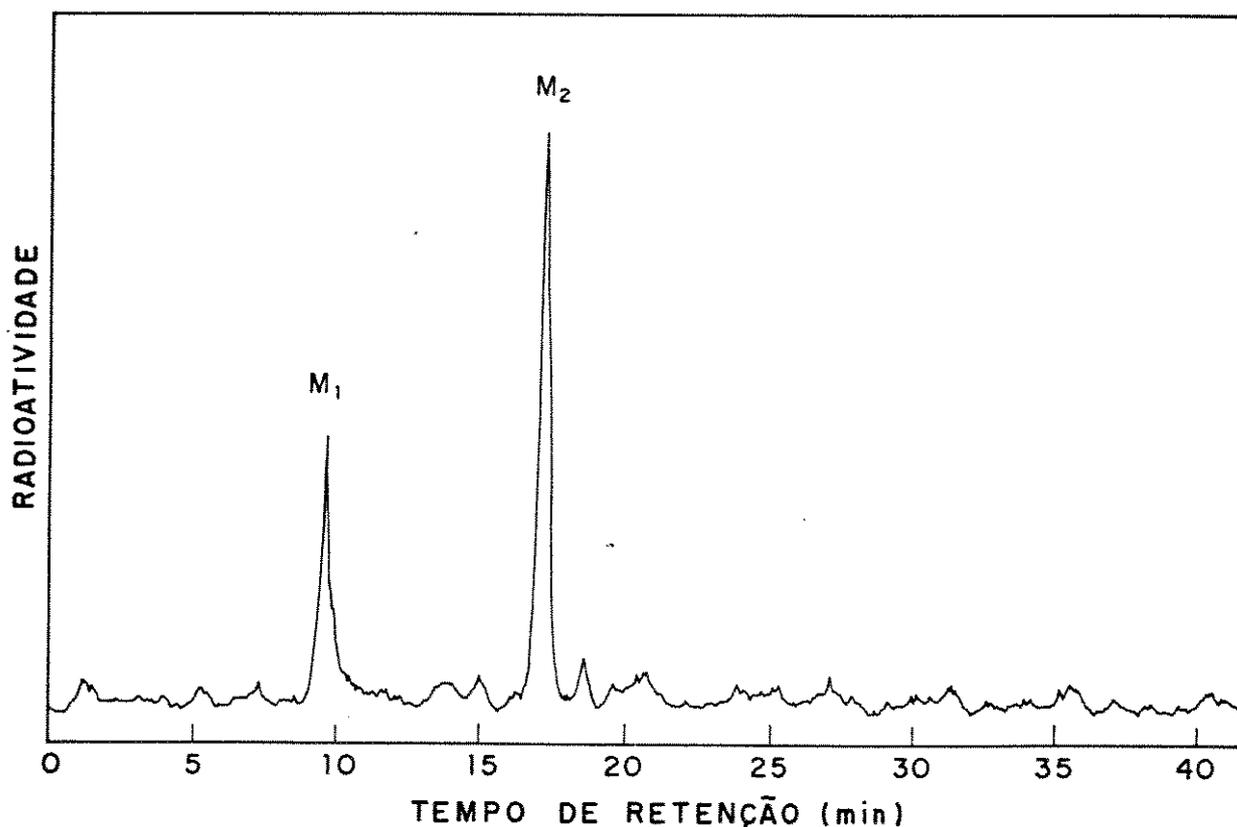


Figura 7. Metabolismo de  $[1,2-^3\text{H}]\text{GA}_1$  em sementes de *D. miscolobium*, 96 horas, após o tratamento.

HPLC em fase reversa: 250x5 mm ODS-Hypersil (5  $\mu\text{m}$ ).

Fase móvel: 20%-70% de metanol em ácido acético 0.5%, durante 40 min.

Fluxo do solvente: 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fluxo do líquido de cintilação: 3  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Amostra:  $50 \times 10^3$  dpm do extrato metanólico.

Sensibilidade do Detector de Radioatividade: 16 cps.

Representação dos picos:  $M_n$  (M= metabólito, n= n<sup>o</sup> do metabólito).

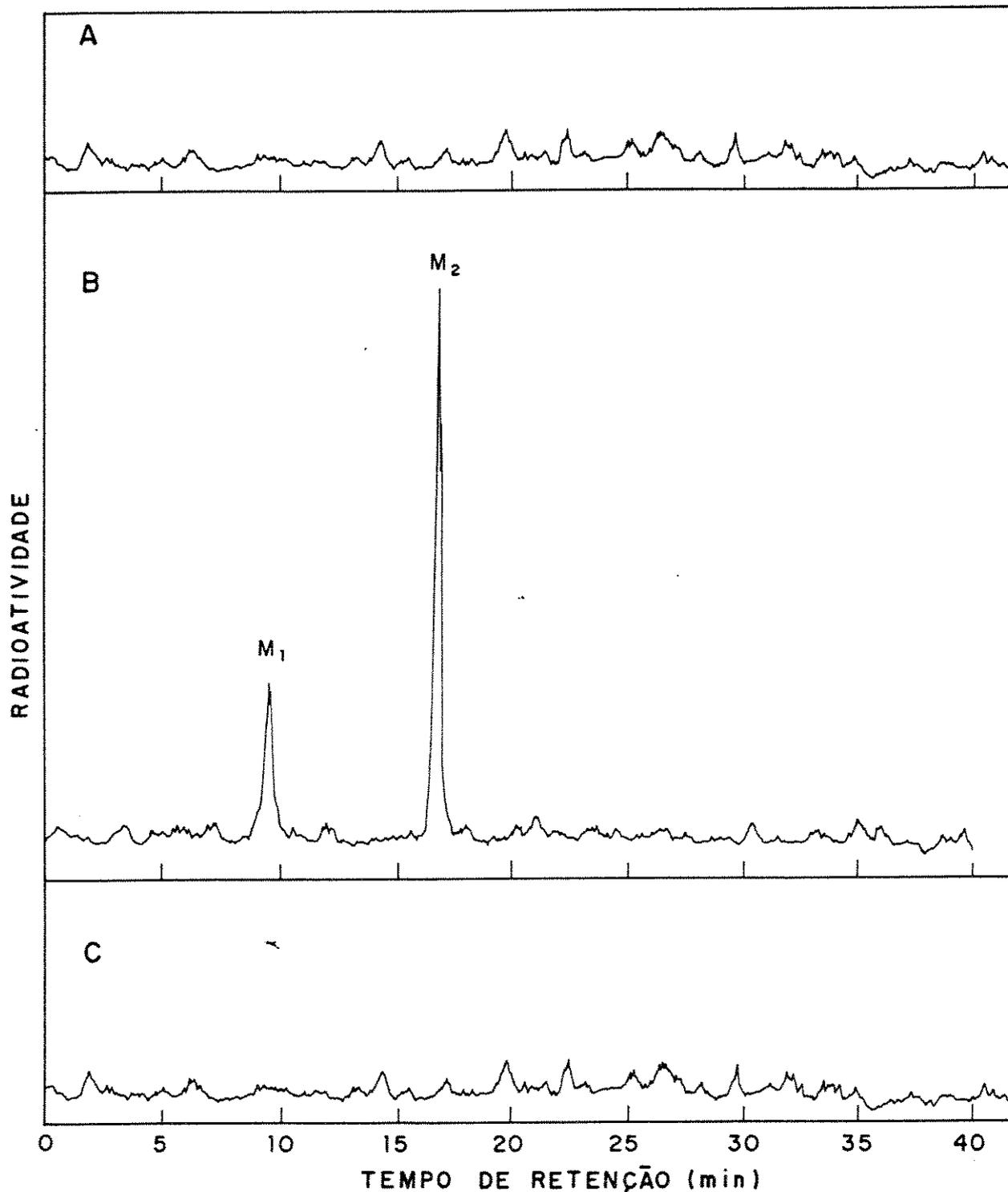


Figura 8. Metabolismo da  $[1,2-^3\text{H}]\text{GA}_1$  em sementes de *D. miscolobium*, 96 horas, após o tratamento. Fração GA livre (A), fração GA-GEt (B) e fração GA-GEs (C). Amostras:  $50 \times 10^3$  dpm,  $50 \times 10^3$  dpm e  $20 \times 10^3$  dpm respectivamente. Condições de HPLC e representação dos picos como na Figura 7.

Tabela 3. Metabolismo de  $[1-^3\text{H}]\text{GA}_8$ , em sementes de *D. miscolobium* após diferentes períodos de incubação. Dados expressos em % de radioatividade de cada metabólito em relação ao total recuperado após HPLC-RC.

?= quando acompanha um tipo de GA, indica que possivelmente esta é a GA presente.

T.R.= tempo de retenção.

$M_n$  = M (metabólito), n ( $n^o$  do metabólito).

T.R. (min)	METABÓLITO	IDENTIFICAÇÃO	PER. DE INCUBAÇÃO	
			24 h	96 h
9,7	$M_1$	$\text{GA}_8\text{-GEt ?}$	47%	62%
12,9		$\text{GA}_8$	53%	38%

A identidade do  $M_1$  não pode ser confirmada, uma vez que, o extrato metanólico de 96 horas de incubação não foi fracionado e purificado em GAS livres e GAS conjugadas.

### 3.3.3. Metabolismo de $[1,2-^3\text{H}]\text{GA}_4$

Quando a  $[^3\text{H}]\text{GA}_4$  foi aplicada às sementes de *D. miscolobium*, observou-se a formação do primeiro metabólito ( $M_1$ ) somente após 2 horas de metabolismo. O tempo de retenção deste metabólito foi 39.8 minutos, como mostra a Tabela 4.

No entanto, após 12 horas de metabolismo, vários metabólitos ( $M_1$  a  $M_5$ ) puderam ser detectados. Entre eles notou-se a presença de um metabólito com tempo de retenção similar a  $[^3\text{H}]\text{GA}_1$ , o  $M_3$ , cuja identidade foi confirmada por co-cromatografia com  $[^3\text{H}]\text{GA}_1$  padrão. Notou-se também a presença de um produto mais polar que a  $[^3\text{H}]\text{GA}_1$ , o  $M_2$ , com tempo de retenção muito semelhante a  $[^3\text{H}]\text{GA}_1\text{-GEt}$ , também produzido pelo metabolismo da  $[^3\text{H}]\text{GA}_1$  (Tabela 4).

A análise do extrato metanólico obtido após 96 horas de metabolismo proporcionou o perfil cromatográfico que é ilustrado na Figura 9. Verificou-se que toda a  $[^3\text{H}]\text{GA}_4$  foi metabolizada e que todos os metabólitos presentes no extrato metanólico de 12 horas se mantiveram, só que em proporção maior, com exceção da  $[^3\text{H}]\text{GA}_1$  ( $M_3$ ) que desapareceu após 12 horas e o  $M_2$  que se manteve constante (Tabela 4).

Tabela 4. Metabolismo de  $[1,2-^3\text{H}]GA_4$ , em sementes de *D. miscolobium* após diferentes períodos de incubação. Dados expressos em % de radioatividade de cada metabólito em relação ao total recuperado após HPLC-RC.

?= quando acompanha um tipo de GA, indica que possivelmente esta é a GA presente.

T.R.= tempo de retenção.

M<sub>n</sub> = M (metabólito) n (n<sup>o</sup> do metabólito).

T.R. (min)	METABÓLITO	IDENTIFICAÇÃO	PERÍODO DE INCUBAÇÃO					
			cont.	30'	2 h	12 h	24 h	96 h
18,1	M <sub>2</sub>	GA <sub>1</sub> -GEt ?	nd	nd	nd	4%	4%	5%
21,4	M <sub>3</sub>	GA <sub>1</sub>	nd	nd	nd	7%	nd	nd
34,6	M <sub>4</sub>	GA <sub>34</sub> -GEt ?	nd	nd	nd	5%	12%	21%
39,8	M <sub>1</sub>	GA <sub>34</sub> ?	nd	nd	17%	56%	61%	53%
48,9	M <sub>5</sub>	GA <sub>4</sub> -GEt ?	nd	nd	nd	18%	12%	21%
42,4		GA <sub>4</sub>	100%	100%	83%	18%	11%	nd

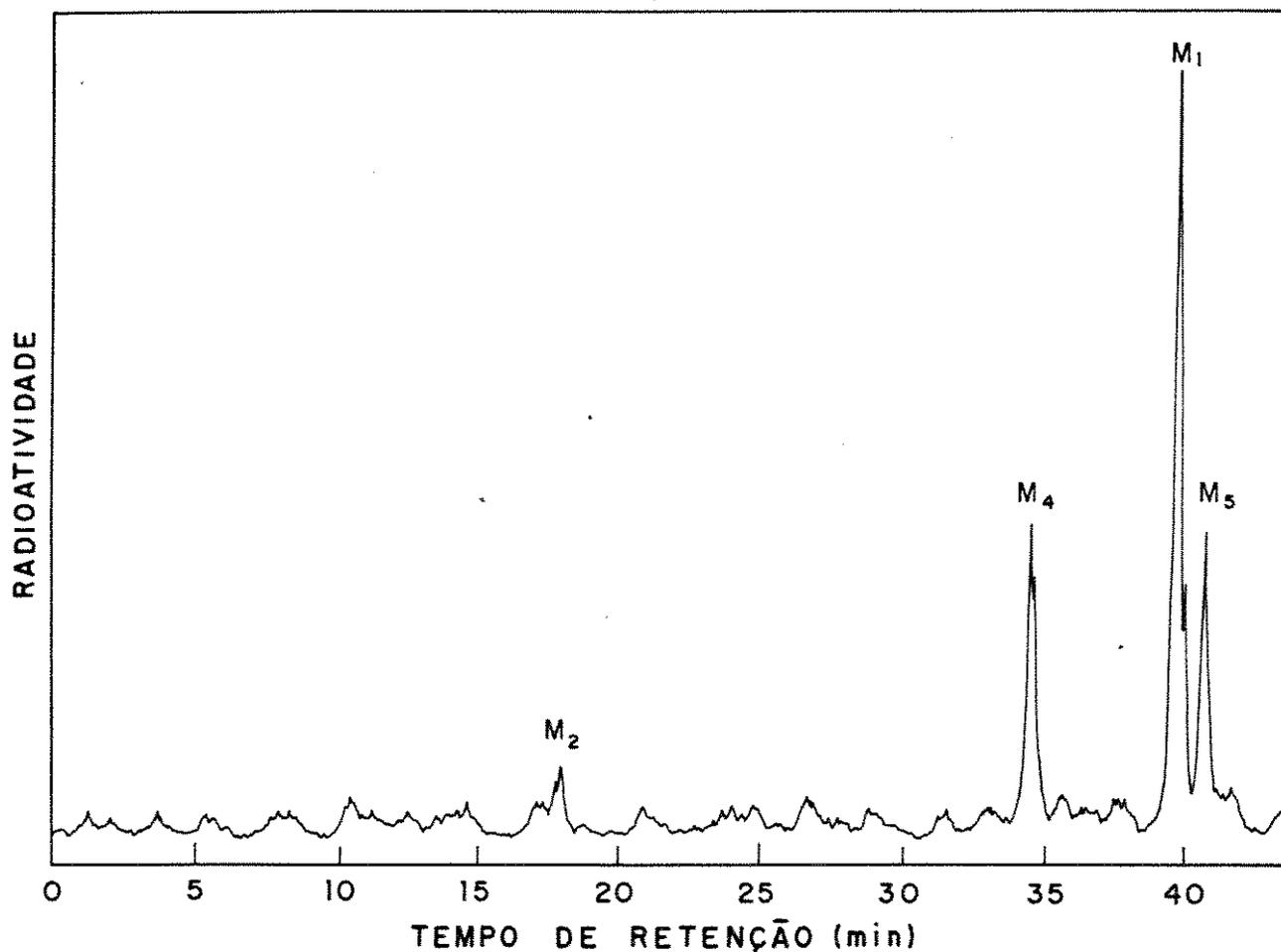


Figura 9. Metabolismo da  $[1,2-^3\text{H}]GA_4$  em sementes de *D. miscolobium*, 96 horas, após o tratamento. Amostra  $50 \times 10^3$  dpm. Condições de HPLC e representação dos picos como na Figura 7.

A fim de esclarecer a identidade destes metabólitos, procedeu-se ao fracionamento e à purificação do extrato metabólico em GAs livres e GAs conjugadas. Os cromatogramas obtidos mostraram que na fração GA livre (Figura 10A) M<sub>1</sub>, M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub> estavam presentes, o M<sub>1</sub> em uma proporção relativamente maior que os demais. O M<sub>1</sub> não apareceu nas frações GA-GEs ou GA-GEt, sendo provavelmente uma GA livre (Figuras 10B e 10C). Algumas evidências levaram a crer que o M<sub>1</sub> poderia ser a [<sup>3</sup>H]GA<sub>34</sub>, pois o seu tempo de retenção foi semelhante ao da [<sup>3</sup>H]GA<sub>34</sub>. Em *Phaseolus coccineus*, TURNBULL & CROZIER (1989) observaram que a [<sup>3</sup>H]GA<sub>34</sub> foi formada a partir da [<sup>3</sup>H]GA<sub>4</sub>, através de uma hidroxilação na posição 2β.

Na fração GA-GEs (Figura 10C) não se observou radioatividade significativa, enquanto que, na fração GA-GEt (Figura 10B) detectou-se principalmente o M<sub>4</sub> e em proporção menor o M<sub>2</sub> e o M<sub>5</sub>. Considerando-se correta a identificação do M<sub>1</sub> como [<sup>3</sup>H]GA<sub>34</sub>, sugeriu-se que o M<sub>5</sub> seria a [<sup>3</sup>H]GA<sub>4</sub>-GEt. O M<sub>4</sub>, que foi eluído mais rapidamente que a GA<sub>34</sub>, poderia ser então a [<sup>3</sup>H]GA<sub>34</sub>-GEt. O M<sub>2</sub>, com tempo de retenção de 18.1 pareceu ser o mesmo M<sub>2</sub> presente no metabolismo da [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub>, portanto [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub>-GEt.

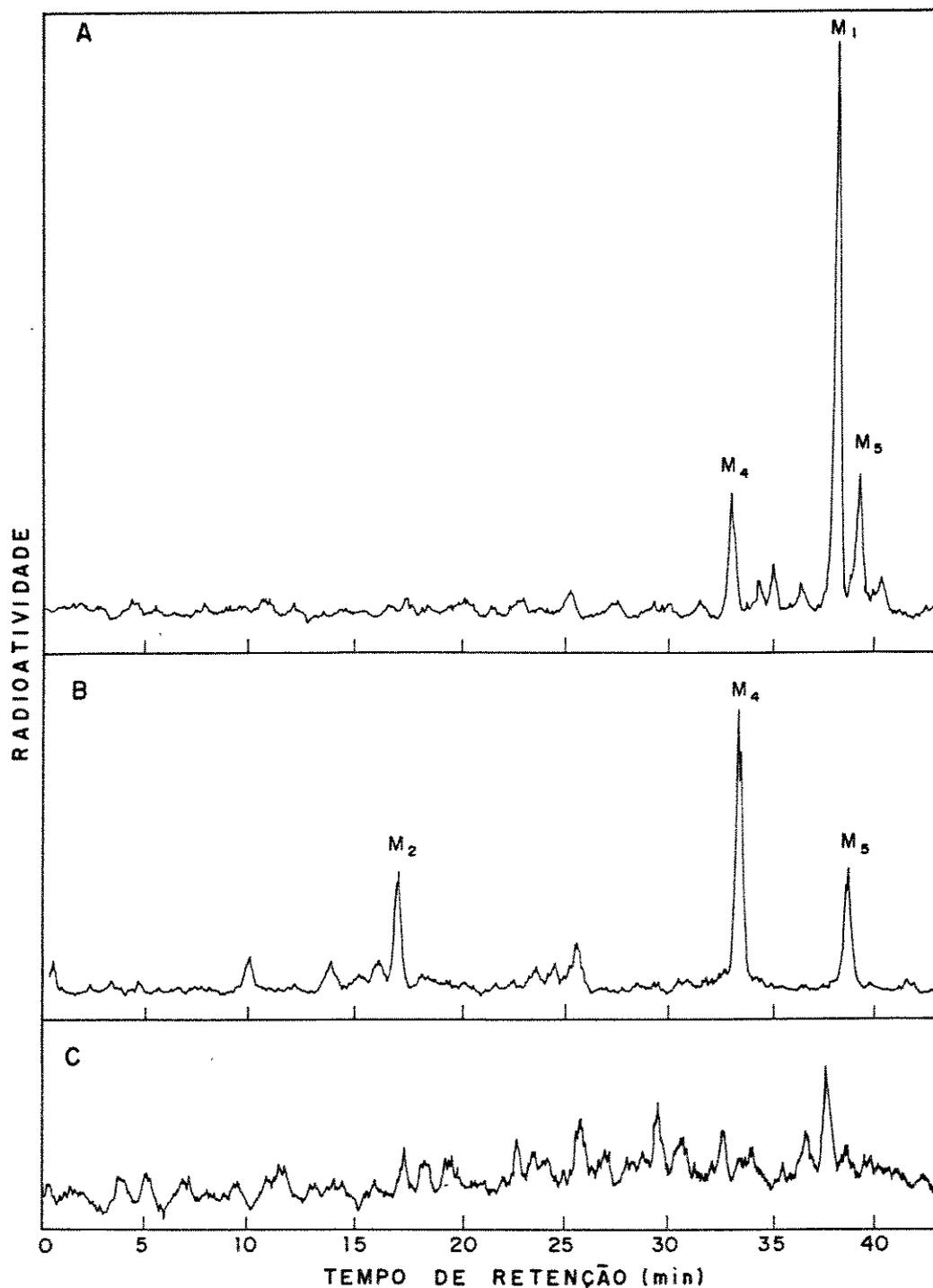


Figura 10. Metabolismo de  $[1,2-^3\text{H}]\text{GA}_4$  em sementes de *D. miscolobium*, 96 horas, após o tratamento. Fração GA livre (A), fração GA-GEt (B) e fração GA-GEs(C). Amostra:  $50 \times 10^3$  dpm/fração. Condições de HPLC e representação dos picos como na Figura 7.

### 3.3.4. Metabolismo de [2,3-<sup>3</sup>H]GA<sub>20</sub>

A [<sup>3</sup>H]GA<sub>20</sub> foi fornecida às sementes de *D. miscolobium* e os metabólitos produzidos após os diferentes tempos de incubação são apresentados na Tabela 5.

Os resultados mostram que o metabólito M<sub>1</sub>, com tempo de retenção semelhante ao da [<sup>3</sup>H]GA<sub>5</sub>, foi o primeiro a ser produzido, 2 horas após tratamento, se mantendo com o aumento do período de incubação. Após 12 horas, foi produzido um metabólito com tempo de retenção semelhante ao [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub> (M<sub>2</sub>). Quantidades máximas da [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub> (M<sub>2</sub>) estavam presentes após 24 horas de metabolismo, mas em 96 horas foi detectada em pequena quantidade. A identidade destes dois metabólitos foi confirmada por co-cromatografia com GAs radioativas padrão.

Os dados apresentados na Tabela 5 mostraram também que os mesmos metabólitos produzidos após 24 horas de incubação foram formados após 96 horas de metabolismo. O perfil cromatográfico obtido após 96 horas é ilustrado na Figura 11. Além da presença da [<sup>3</sup>H]GA<sub>5</sub> (M<sub>1</sub>) e da [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub> (M<sub>2</sub>) observou-se a produção de dois picos mais polares que a [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub>, o M<sub>3</sub> e o M<sub>4</sub>, e de um pico com tempo de retenção semelhante ao da [<sup>3</sup>H]GA<sub>6</sub> (M<sub>5</sub>), cuja identidade foi confirmada por co-cromatografia.

A separação do extrato metanólico de 96 horas em GAs livres e GAs conjugadas veio a confirmar alguns resultados.

Tabela 5. Metabolismo de  $[2,3-^3\text{H}]GA_{20}$ , em sementes de *D. miscolobium* após diferentes períodos de incubação. Dados expressos em % de radioatividade de cada metabólito em relação ao total recuperado após HPLC-RC.

?= quando acompanha um tipo de GA, indica que possivelmente esta é a GA presente.

T.R.= tempo de retenção.

$M_n$  = M (metabólito), n ( $n^o$  do metabólito).

T.R. (min)	METABÓLITO	IDENTIFICAÇÃO	PERÍODO DE INCUBAÇÃO					
			cont.	30'	2 h	12 h	24 h	96 h
18,0	$M_3$	$GA_8-GEt$ ?	nd	nd	nd	nd	4%	10%
18,1	$M_4$	$GA_1-GEt$ ?	nd	nd	nd	nd	10%	31%
21,4	$M_2$	$GA_1$	nd	nd	nd	8%	28%	6%
22,5	$M_5$	$GA_6$	nd	nd	nd	nd	5%	5%
30,0	$M_1$	$GA_5$	nd	nd	15%	10%	7%	9%
32,9		$GA_{20}$	100%	100%	85%	82%	54%	39%

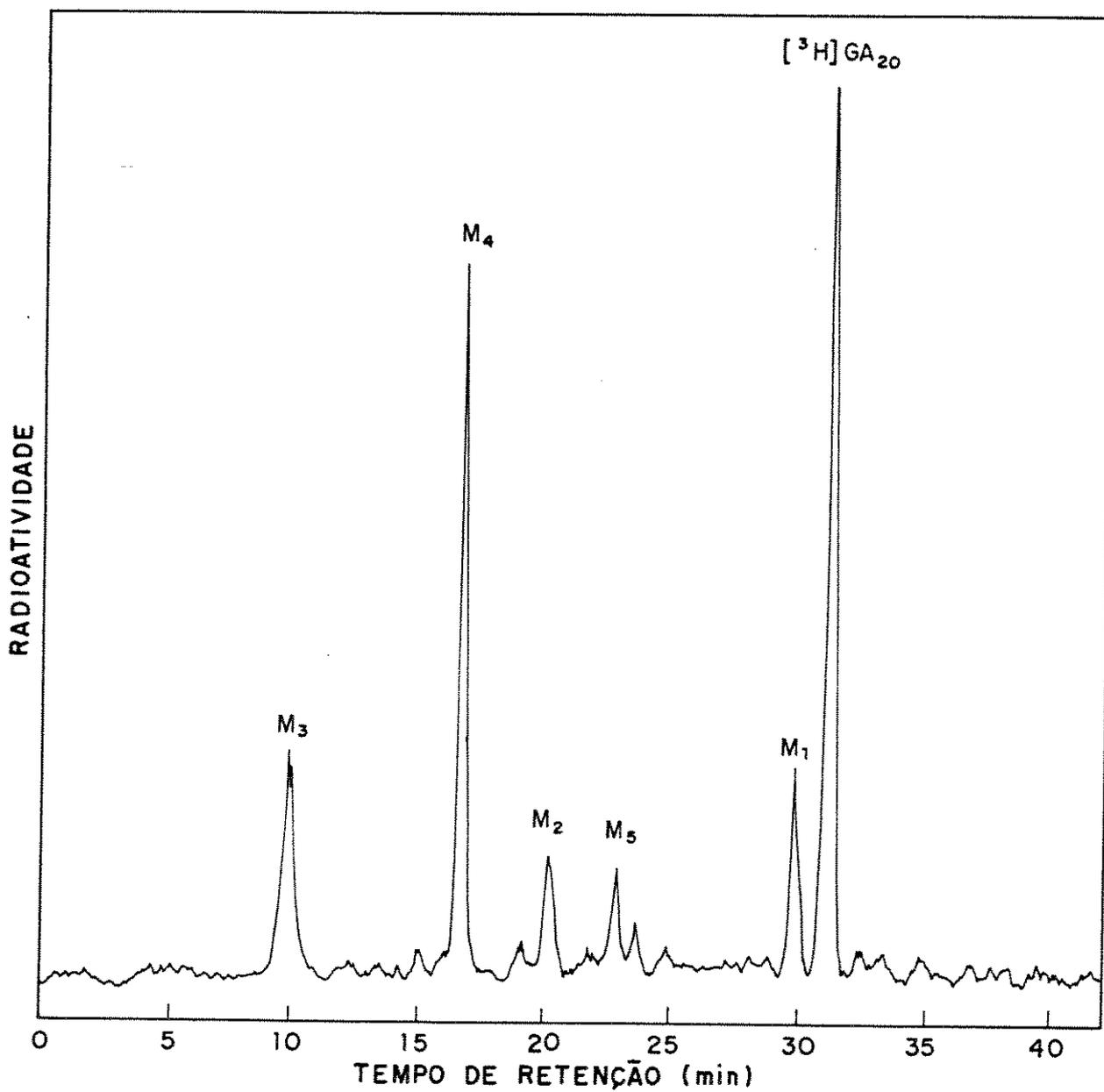


Figura 11. Metabolismo de  $[2,3-^3\text{H}]\text{GA}_{20}$  em sementes de *D. miscolobium*, 96 horas, após o tratamento. Amostra:  $50 \times 10^3$  dpm. Condições de HPLC e representação dos picos como na Figura 7.

A Figura 12A mostra que na fração GA livre detectou-se [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub> (M<sub>2</sub>), [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>6</sub> (M<sub>5</sub>), [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>5</sub> (M<sub>1</sub>) e [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>20</sub>, além da presença de alguns picos desconhecidos. Na fração GA-GEt (Figura 12B), os metabólitos M<sub>3</sub> (GA<sub>8</sub>-GEt) e M<sub>4</sub> (GA<sub>1</sub>-GEt) estavam presentes, indicando que ambos eram éteres glicosídeos. Na fração GA-GEs nenhuma radioatividade foi detectada.

### 3.3.5. Metabolismo de [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>5</sub>

Quando [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>5</sub> foi fornecida às sementes de *D. miscolobium* os metabólitos produzidos após 24 e 96 horas de incubação tiveram os tempos de retenção um pouco diferentes dos obtidos nos experimentos anteriores. Isso pode ter ocorrido devido a problemas da composição do solvente durante a cromatografia. Os resultados foram então interpretados com base em co-cromatografia, usando a mesma composição do solvente, com a GA<sub>1</sub>, GA<sub>5</sub> e GA<sub>6</sub>.

No tratamento de 24 horas (Tabela 6), verificou-se a presença de cinco metabólitos. O M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> e M<sub>4</sub> estavam presentes em pequenas quantidades, o M<sub>3</sub>, que foi confirmado por co-cromatografia como sendo uma [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>6</sub> e um outro metabólito menos polar que a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>6</sub>, o M<sub>5</sub>, apareceram em quantidades maiores. O M<sub>1</sub> era, provavelmente, a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub>-GEt, presente tanto no metabolismo da [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub> (M<sub>2</sub>) como no metabolismo da [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>4</sub> (M<sub>4</sub>) ou no metabolismo da [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>20</sub> (M<sub>4</sub>). Os demais metabólitos, M<sub>2</sub>, M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub> não puderam ser identificados.

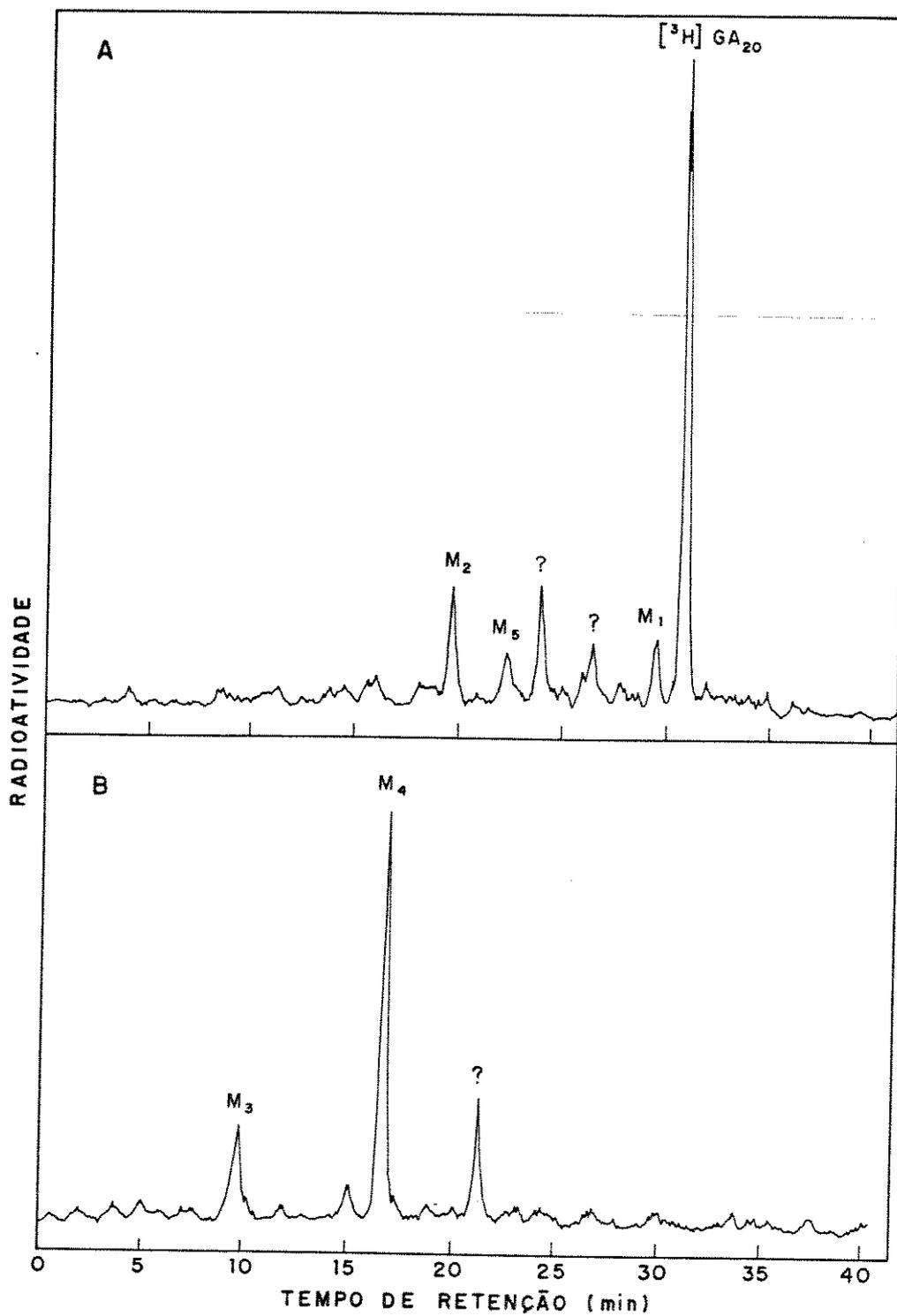


Figura 12. Metabolismo de  $[2,3-^3\text{H}]\text{GA}_{20}$  em sementes de *D. miscolobium*, 96 horas, após o tratamento. Fração GA livre (A), fração GA-GEt (B). Amostras:  $50 \times 10^3$  dpm e  $50 \times 10^3$  dpm respectivamente. Condições de HPLC e representação dos picos como na Figura 7.

Tabela 6. Metabolismo de  $[1-^3\text{H}]\text{GA}_5$ , em sementes de *D. miscolobium* após diferentes períodos de incubação. Dados expressos em % de radioatividade de cada metabólito em relação ao total recuperado após HPLC-RC.

?= quando acompanha um tipo de GA, indica que possivelmente esta é a GA presente.

T.R.= tempo de retenção.

$M_n$  = M (metabólito), n ( $n^o$  do metabólito).

T.R. (min)	METABÓLITO	IDENTIFICAÇÃO	PER. DE INCUBAÇÃO	
			24 h	96 h
9,7	$M_6$	$\text{GA}_8\text{-GEt ?}$	nd	7%
16,0	$M_7$	?	nd	14%
17,5	$M_1$	$\text{GA}_1\text{-GEt ?}$	10%	18%
21,0	$M_8$	$\text{GA}_1$	nd	2%
22,5	$M_2$	?	4%	8%
23,3	$M_3$	$\text{GA}_5$	34%	29%
24,5	$M_4$	?	4%	5%
28,0	$M_5$	?	14%	7%
30,0		$\text{GA}_5$	34%	10%

No tratamento de 96 horas, além da presença dos metabólitos  $M_1$ - $M_5$ , que também foram obtidos no tratamento de 24 horas (Tabela 6), outros metabólitos estavam presentes em pequenas quantidades. A Figura 13 ilustra estes resultados. O  $M_8$  foi co-cromatografado com a  $[^3\text{H}]\text{GA}_1$ . Outros dois metabólitos mais polares, o  $M_6$  e o  $M_7$  foram produzidos. O  $M_6$  estava presente tanto no metabolismo da  $[^3\text{H}]\text{GA}_1$  ( $M_1$ ), como no metabolismo da  $[^3\text{H}]\text{GA}_8$  ( $M_3$ ) ou no metabolismo da  $[^3\text{H}]\text{GA}_{20}$  ( $M_3$ ), sendo, portanto, a  $[^3\text{H}]\text{GA}_8$ -GET. Não foi possível identificar o  $M_7$ , que foi eluído entre os metabólitos 1 e 2.

Apesar do extrato metanólico de 96 horas ter sido fracionado e purificado em GAs livres e GAs conjugadas, como mostra a Figura 14, foi difícil interpretar os resultados.

Verificou-se que na fração GA livre (Figura 14A) apareceram os picos referentes a  $[^3\text{H}]\text{GA}_5$ , a  $[^3\text{H}]\text{GA}_6$  ( $M_3$ ), a  $[^3\text{H}]\text{GA}_1$  ( $M_8$ ) além da presença dos metabólitos  $M_1$  e  $M_6$ , que também foram observados na fração GA-GET (Figura 14B) juntamente com o  $M_2$  e o  $M_7$ . Baseando-se nos resultados dos metabolismos da  $[^3\text{H}]\text{GA}_1$ ,  $[^3\text{H}]\text{GA}_4$  e  $[^3\text{H}]\text{GA}_{20}$ , os metabólitos  $M_1$  e  $M_6$  foram identificados como  $[^3\text{H}]\text{GA}_1$ -GET e  $[^3\text{H}]\text{GA}_8$ -GET respectivamente. Quanto aos outros dois metabólitos ( $M_2$  e  $M_7$ ) que foram detectados na fração GA-GET (Figura 14B) pode-se sugerir que sejam formas conjugadas da  $[^3\text{H}]\text{GA}_6$ . Os metabólitos  $M_4$  e  $M_5$  presentes na fração GA-GEs (Figura 14C) poderiam ser formas conjugadas da  $[^3\text{H}]\text{GA}_5$ . A única giberelina que produziu metabólitos ( $M_4$  e  $M_5$ ) na fração GA-GEs foi a  $[^3\text{H}]\text{GA}_5$  (Figura 14C).

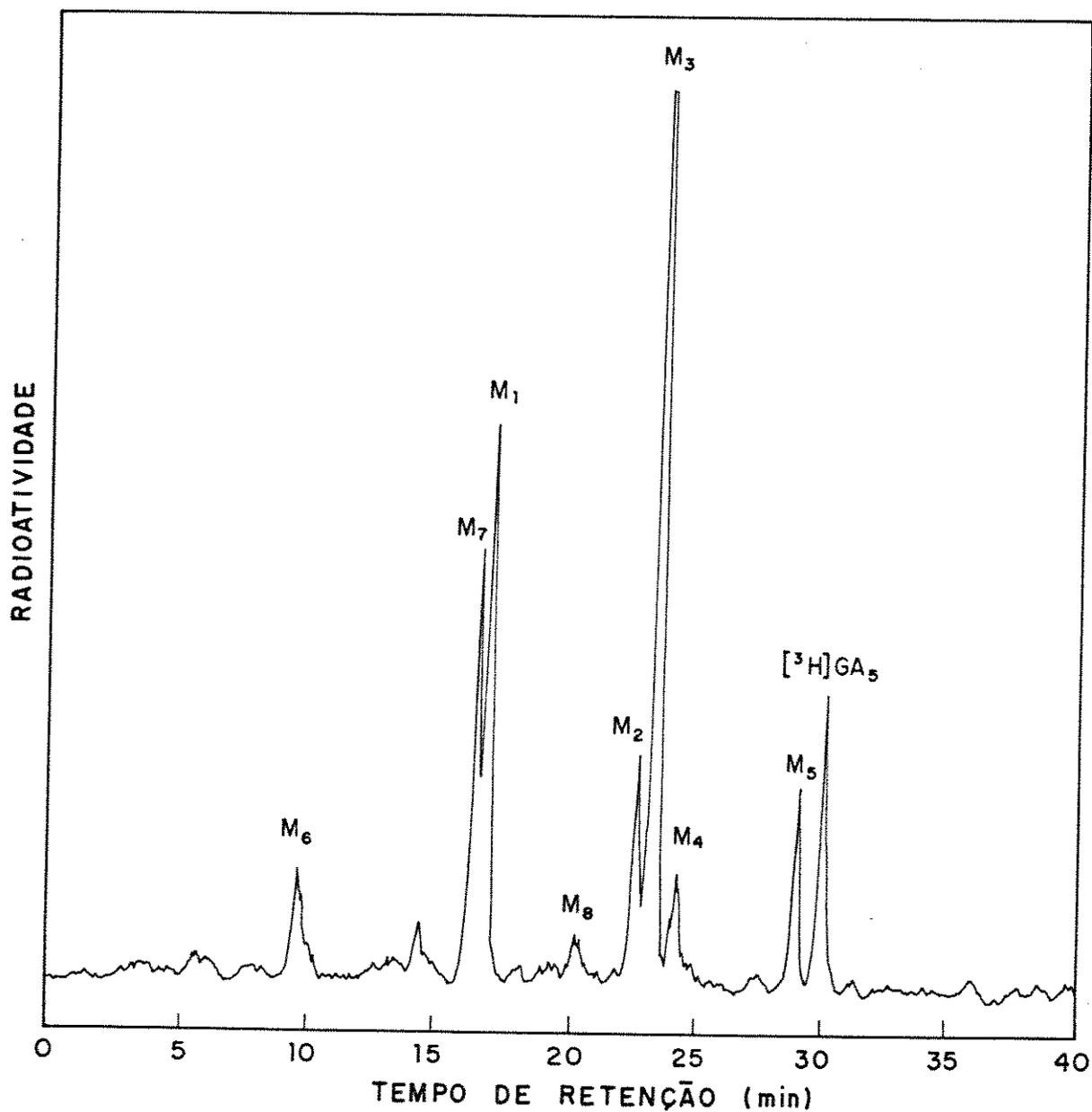


Figura 13. Metabolismo de  $[1-^3\text{H}]\text{GA}_5$  em sementes de *D. miscolobium*, 96 horas, após o tratamento. Amostra:  $50 \times 10^3$  dpm. Condições de HPLC é representação dos picos como na Figura 7.

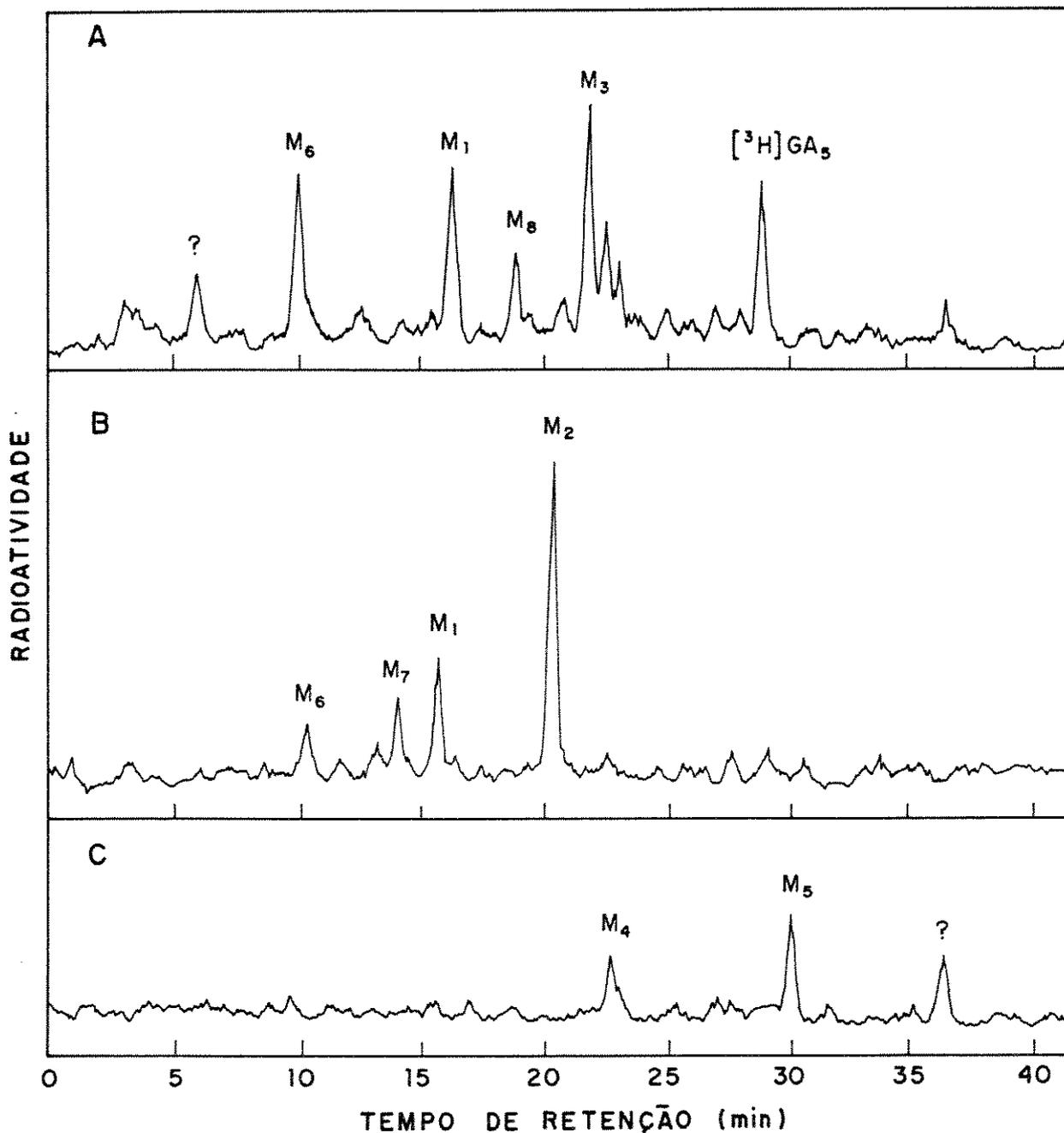


Figura 14. Metabolismo de  $[1-^3\text{H}]\text{GA}_5$  em sementes de *D. miscolobium*, 96 horas, após o tratamento. Fração GA livre (A), fração GA-GEt (B) e fração GA-GEs (C). Amostras:  $50 \times 10^3$  dpm,  $50 \times 10^3$  dpm e  $20 \times 10^3$  dpm respectivamente. Condições de HPLC e representação dos picos como na Figura 7.

### 3.3.6. Metabolismo de [17-<sup>3</sup>H]GA<sub>19</sub>

Quando a [<sup>3</sup>H]GA<sub>19</sub> foi fornecida às sementes de *D. miscolobium*, nenhum metabolismo foi observado, após 24 e 96 horas de tratamento.

#### 4. DISCUSSÃO

Sabe-se que em sementes existem grandes quantidades de GAs e que a maioria das GAs conhecidas, hoje, foram identificadas em extratos de sementes imaturas (SPONSEL, 1983a). Este autor mostrou que os níveis de GAs ativas variam dependendo do estágio de maturação em que as sementes se encontram. Por exemplo, KWAK *et al.* (1988) observaram alterações nos níveis de GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub> e GA<sub>6</sub> em sementes de *Phaseolus vulgaris* durante a maturação. Estas GAs chegaram nos seus níveis máximos na metade do estágio de maturação das sementes. Resultados semelhantes foram observados durante o desenvolvimento de sementes de *Pisum sativum* (FRYDMAN *et al.*, 1974), *Phaseolus vulgaris* (DURLEY *et al.*, 1971; YAMANE *et al.*, 1977) e *Leucaena leucocephala* (ARIGAYO *et al.*, 1984).

GAs biologicamente inativas, com uma  $\beta$  hidroxilação no C-2 (SPONSEL, 1987) e GAs conjugadas (SCHNEIDER, 1983) se acumulam no final da maturação das sementes. TURNBULL & CROZIER (1989) mostraram que em preparações livres de células de sementes maduras de *Phaseolus coccineus* ocorreu a conversão tanto de [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub> como de [<sup>3</sup>H]GA<sub>4</sub> para GAs com uma  $\beta$  hidroxilação no C-2. GARCIA-MARTINEZ *et al.* (1986) constataram a presença de GA<sub>1</sub>, GA<sub>8</sub>, GA<sub>20</sub> e GA<sub>29</sub> durante o estágio de desenvolvimento inicial de sementes de ervilhas, mas somente

GA<sub>20</sub> e GA<sub>29</sub> em sementes maduras.

O papel das GAs na germinação de várias espécies de sementes tem sido estudado extensivamente. Sementes de ervilha germinam normalmente mesmo quando inibidores da biossíntese de GAs são fornecidos durante a embebição (GRAEBE, 1986 e SPONSEL, 1983b). Neste caso, portanto, a germinação independe da biossíntese *de novo* de GAs. Entretanto, as plântulas obtidas quatro dias após a germinação destas sementes foram anãs, mostrando que o alongamento do eixo caulinar depende da biossíntese *de novo* de GAs. Em contraste, KOORNEEF & van der VEEN (1980 apud GRAEBE, 1987) e KOORNEEF *et al.* (1981 apud GRAEBE, 1987) mostraram que os mutantes de *Arabidopsis*, tomate e outras plantas não germinam a menos que GA seja adicionada.

Em plântulas, a GA<sub>1</sub> controla o alongamento do eixo caulinar (PHINNEY, 1984). Em sementes, embora não se tenha estabelecido claramente a função das GAs, elas nos proporcionam um vantajoso ponto de partida para se determinar o potencial metabólico das GAs nas diversas espécies.

A fim de se estudar a via metabólica das GAs em *D. miscolobium*, analisaram-se por HPLC-RC as transformações sofridas por algumas [<sup>3</sup>H]GAs fornecidas a estas sementes. Sabendo-se que a GA<sub>1</sub> é uma giberelina endógena de sementes de *D. miscolobium* (MONTEIRO *et al.*, 1988) estudou-se o metabolismo de GAs relacionadas biossinteticamente à GA<sub>1</sub>.

Para estabelecer a capacidade da semente no metabolismo de GAs, [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>4</sub> foi aplicada às sementes juntamente com GA<sub>4</sub> não marcada em diferentes concentrações. Sementes de *D. miscobolium* mostraram ter capacidade de metabolizar [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>4</sub> sem alterações significativas no perfil metabólico mesmo quando lhes foram fornecidas altas concentrações do substrato (Tabela 1). Isto pode ter acontecido pelas seguintes razões: uma alta capacidade de metabolizar a GA e/ou aumentou-se a capacidade metabólica do tecido, quando houve um aumento da quantidade exógena de GA aplicada (TURNBULL & CROZIER, 1989).

Os dados discutidos a seguir foram baseados nos resultados demonstrados nas Tabelas 2-6.

Quando a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub> foi fornecida os únicos metabólitos produzidos foram a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub>-GET (M<sub>1</sub>), e predominantemente, a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub>-GET (M<sub>2</sub>). Talvez a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub>, intermediária entre a GA<sub>1</sub> e GA<sub>8</sub>-GET, pudesse ter sido detectada se o metabolismo da [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub> fosse acompanhado detalhadamente desde o momento da aplicação. TURNBULL & CROZIER (1989) observaram que no metabolismo da [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>4</sub> em epicótilo de *Phaseolus coccineus* tanto a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub> como a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub>-GET acumularam em maior quantidade que a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub>, mostrando que a enzima 2 $\beta$ -hidroxilase, que converte a GA<sub>1</sub> para GA<sub>8</sub>, poderia ser enzima limitante da reação, não havendo, assim, acúmulo de GA<sub>8</sub>. Este resultado assemelha-se ao observado durante a germinação de *Phaseolus vulgaris*, onde a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub> foi rapidamente convertida para [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub>-GET com um acúmulo mínimo de [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub>. Foi sugerido

que a GA<sub>1</sub> poderia ser convertida diretamente em GA<sub>8</sub>-GEt sem que houvesse liberação da GA livre correspondente (NADEAU & RAPPAPORT, 1972 e YAMANE *et al.*, 1975). A presença de uma pequena quantidade de [<sup>3</sup>H]GA<sub>8</sub> nas sementes tratadas com [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub> foi atribuída a uma via biossintética separada, onde a formação da GA<sub>8</sub> pode ter ocorrido devido ao excesso de precursor fornecido, ou uma subsequente hidrólise do glicosídeo (YAMANE *et al.*, 1975)

Quando [<sup>3</sup>H]GA<sub>8</sub> foi fornecida às sementes de *D. miscobolium* foi convertida, simplesmente, em [<sup>3</sup>H]GA<sub>8</sub>-GEt, que também foi encontrada nos metabolismos da [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub>, [<sup>3</sup>H]GA<sub>4</sub>, [<sup>3</sup>H]GA<sub>20</sub> e [<sup>3</sup>H]GA<sub>5</sub>. O resultado obtido aqui concorda com os de NADEAU & RAPPAPORT (1972) e YAMANE *et al.* (1975) quando estudaram sementes de *Phaseolus vulgaris*.

Os resultados obtidos durante o metabolismo da [<sup>3</sup>H]GA<sub>4</sub>, [<sup>3</sup>H]GA<sub>20</sub> e [<sup>3</sup>H]GA<sub>5</sub> foram mais difíceis de ser interpretados, pois um grande número de metabólitos foi produzido. Além disso, a metodologia de separação de GAs livres e GAs conjugadas, utilizada neste trabalho, não foi totalmente eficiente. Este fato não é surpreendente, pois a separação, baseada em propriedades de fracionamento e cromatografia de troca aniônica, é difícil. Pareceu que a fração de GAs livres continha todas as GAs livres com algumas GAs conjugadas. A separação das conjugadas em éter-glicosídeos (ácidos, pois a glicose está ligada a um radical -OH) e éster-glicosídeos (neutros, pois a glicose está ligada ao radical -COOH) pare-

ceu ter sido eficiente. Para análises futuras será melhor incluir uma outra etapa separatória de exclusão, que separa de acordo com o peso molecular. Esta separação é possível usando-se gel Biobeads SX-4, e eluindo as GAs livres e conjugadas com tetrahidrofurano (REEVE & CROZIER, 1976). Através deste método obtém-se uma fração de baixo peso molecular (GAs livres) e uma de alto peso molecular (GAs conjugadas).

Quando [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>4</sub> foi fornecida às sementes de *D. miscobolium*, apenas uma pequena parte deste substrato converteu-se em [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub> (M<sub>3</sub>), que apareceu nas análises iniciais do metabolismo, esta [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub> foi provavelmente convertida em [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub>-GEt (M<sub>2</sub>). A via principal do metabolismo pareceu ser através da formação de [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>34</sub> (M<sub>1</sub>), por uma hidroxilação na posição 2 $\beta$  e a seguir [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>34</sub>-GEt (M<sub>4</sub>). A [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>4</sub> também pareceu ter sido convertida em [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>4</sub>-GEt (M<sub>5</sub>).

O passo que envolve uma 2 $\beta$  hidroxilação, conhecido como sendo um passo que desativa as GAs (GRAEBE, 1987), também foi observado em várias espécies de coníferas onde a GA<sub>4</sub> é convertida em GA<sub>34</sub>, por exemplo, *Picea abies* (DUNBERG & ODEN, 1983), *Pinus attenuata* (KAMIENSKA *et al.*, 1976) e *Picea stichensis* (MORITZ *et al.*, 1989). MORITZ *et al.* (1989) observaram ainda que há um aumento da desativação das GAs (conversão de GA<sub>4</sub> em GA<sub>34</sub>) quando as plantas de *Picea stichensis* estão crescendo em condições que não induzam a floração.

TURNBULL *et al.* (1986) demonstraram que plântulas de *Phaseolus coccineus* são capazes de metabolizar rapidamente

[<sup>3</sup>H]GA<sub>4</sub> em vários produtos, tais como GA<sub>4</sub>-GEs, GA<sub>4</sub>-GEt, GA<sub>8</sub>-GEt, GA<sub>1</sub> e GA<sub>8</sub>. Isto não foi observado em culturas livres de células de sementes de *Phaseolus coccineus*, onde a GA<sub>4</sub> não foi metabolizada (MALCOLM *et al.*, 1991).

Os resultados obtidos durante o metabolismo da [<sup>3</sup>H]GA<sub>20</sub> sugerem que em *D. miscolobium* a GA<sub>1</sub> endógena seja formada via GA<sub>20</sub>, por uma 3β hidroxilação, pois esta é convertida em [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub> (M<sub>2</sub>) mais efetivamente que a GA<sub>4</sub>, que é transformada, principalmente, em [<sup>3</sup>H]GA<sub>34</sub> (M<sub>1</sub>). A formação de [<sup>3</sup>H]GA<sub>5</sub> (M<sub>1</sub>) e [<sup>3</sup>H]GA<sub>6</sub> (M<sub>5</sub>) parecem ser vias menos importantes pois estes dois metabólitos são formados em menor quantidade. Dois outros metabólitos também foram detectados. Estes parecem ser GAs conjugadas, GA<sub>1</sub>-GEt (M<sub>4</sub>) e GA<sub>8</sub>-GEt (M<sub>3</sub>).

Em plântulas de *Pisum sativum*, a GA<sub>20</sub> além de ser convertida em GA<sub>29</sub> e catabólito de GA<sub>29</sub>, também, é transformada em GA<sub>1</sub> através de uma 3β hidroxilação. A GA<sub>1</sub> é posteriormente convertida em GA<sub>8</sub> (INGRAM *et al.*, 1983; INGRAM *et al.*, 1984; INGRAM *et al.*, 1985 e 1986 e SPONSEL, 1986). Em ervilhas a 3β hidroxilação foi exclusivamente demonstrada na região de alongamento caulinar, mas as análises de GA<sub>1</sub>, GA<sub>8</sub> e catabólito de GA<sub>8</sub> foram feitas por CG-MS em sementes e vagens em estádios muito jovens (GARCIA-MARTINEZ *et al.*, 1986). Por outro lado, MALCOLM (1990) observou que em plântulas de *Phaseolus coccineus* [<sup>3</sup>H]GA<sub>20</sub> só foi convertida em [<sup>3</sup>H]GA<sub>5</sub> e [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub>.

Em *D. miscolobium* a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>5</sub> foi metabolizada produzindo duas GAs livres, [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>6</sub> (M<sub>3</sub>) e [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub> (M<sub>8</sub>), além de outros metabólitos que parecem ser GAs conjugadas, a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub>-GET (M<sub>1</sub>) e a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub>-GET (M<sub>6</sub>). Outros três metabólitos foram também detectados, mas não puderam ser identificados (M<sub>2</sub>, M<sub>5</sub> e M<sub>7</sub>). Os resultados aqui obtidos sugerem que a GA<sub>1</sub> pode ser formada a partir da GA<sub>5</sub> e/ou GA<sub>6</sub>; GA<sub>8</sub>-GET pode ser formada a partir de GA<sub>6</sub>, bem como a partir da GA<sub>1</sub>. Para esclarecer quais destes passos estão ocorrendo seria necessário fornecer [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>6</sub> às sementes.

Segundo SEMBDNER *et al.* (1968 apud YAMANE *et al.*, 1975) em sementes imaturas de *Phaseolus coccineus* a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>6</sub> foi convertida em [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>8</sub> e seu respectivo glicosídeo. YAMANE *et al.* (1975) investigando o metabolismo da [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>5</sub> em sementes maduras de *Phaseolus vulgaris*, observaram que a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>6</sub> não foi intermediária na conversão de GA<sub>5</sub> para GA<sub>8</sub>.

Quando [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>5</sub> foi fornecida às sementes imaturas de *Pharbitis nil*, KOSHIOKA *et al.* (1985) mostraram que foi convertida no mínimo em seis GAs livres: GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>8</sub>, GA<sub>22</sub> e GA<sub>29</sub> e em pelo menos dez GAs conjugadas: GA<sub>5</sub>-GET, GA<sub>5</sub>-GEs, GA<sub>1</sub>-GET, GA<sub>1</sub>-GEs, GA<sub>3</sub>-GET, GA<sub>3</sub>-GEs, GA<sub>6</sub>-GET ou GA<sub>6</sub>-GEs, GA<sub>8</sub>-GET, GA<sub>22</sub>-GET ou GA<sub>22</sub>-GEs e GA<sub>29</sub>-GET. Estes autores observaram, também, que a GA<sub>5</sub> foi convertida em GA<sub>6</sub> e que a GA<sub>6</sub> foi intermediária na conversão de GA<sub>5</sub> para GA<sub>3</sub>, de GA<sub>5</sub> para GA<sub>1</sub> e de GA<sub>5</sub> para GA<sub>29</sub>.

Nenhum metabolismo foi observado quando [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>19</sub> foi fornecida às sementes de *D. miscolobium*. Esta ausência de metabolismo pode ter ocorrido devido à posição da marcação radioativa. A introdução do  $^3\text{H}$  na molécula faz com que o radical CH<sub>2</sub> exocíclico, do anel D da GA<sub>19</sub> se transforme em CH<sub>3</sub>. Portanto, esta GA marcada não é realmente, a GA<sub>19</sub>. Não obstante em ervilha, KAMIYA & GRAEBE (1983) observaram que a [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>19</sub> é convertida em [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>20</sub> enquanto em *Phaseolus coccineus* [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>19</sub> é metabolizada em [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>20</sub>, [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>5</sub> e [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub> (MALCOLM *et al.*, 1991).

Baseando-se nos resultados obtidos e em dados de literatura sugere-se a via metabólica ilustrada na Figura 15 para o metabolismo das GAs em *D. miscolobium*.

Apesar da GA<sub>1</sub> endógena ter sido detectada em sementes de *D. miscolobium* (MONTEIRO *et al.*, 1988) não está claro se GA<sub>4</sub>, GA<sub>5</sub>, GA<sub>20</sub> e GA<sub>6</sub> são GAs endógenas destas sementes, para saber quais as vias metabólicas que, *in situ*, levam à formação de GA<sub>1</sub>. Entretanto, pode-se sugerir, com base nos resultados obtidos até o momento, que em *D. miscolobium*, a GA<sub>1</sub> seja formada via GA<sub>20</sub>, pois esta é convertida em GA<sub>1</sub> mais efetivamente que a GA<sub>4</sub>.

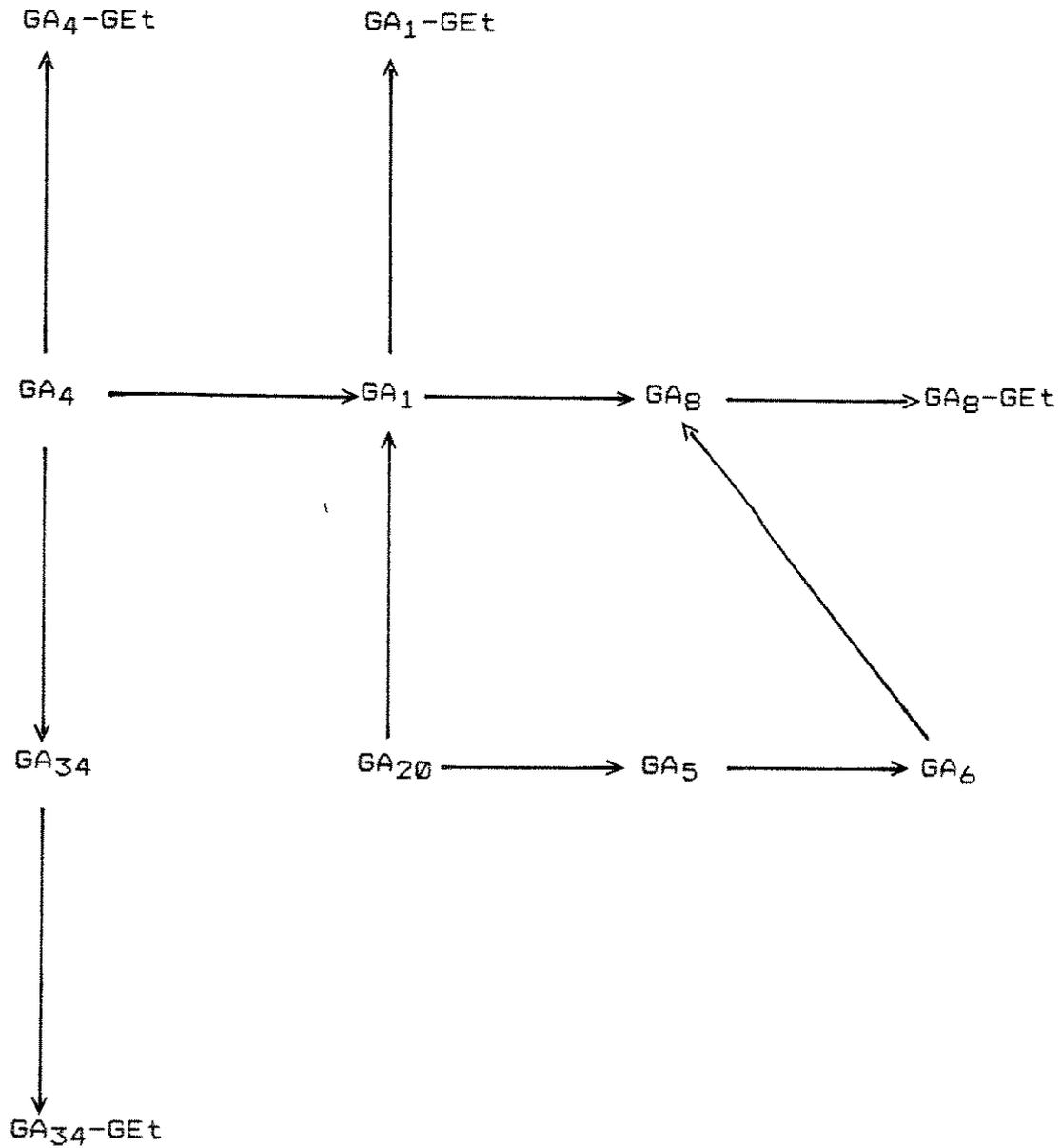


Figura 15. Caminho hipotético, para o metabolismo das GAs em sementes de *D. miscolobium*.

## 5. RESUMO

O metabolismo das GAs precursoras diretas da GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub> e GA<sub>20</sub> bem como de outras GAs intermediárias e produtos do metabolismo da GA<sub>1</sub> foi estudado durante o crescimento inicial do embrião de *D. miscolobium*, a fim de se entender o controle dos níveis endógenos de GA<sub>1</sub> nesta fase do desenvolvimento.

Foram fornecidas às sementes de *D. miscolobium* diferentes GAs radioativas e os metabólitos formados foram analisados por HPLC-RC.

Com exceção da [<sup>3</sup>H]GA<sub>19</sub> todas as outras GAs ([<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub>, [<sup>3</sup>H]GA<sub>8</sub>, [<sup>3</sup>H]GA<sub>4</sub>, [<sup>3</sup>H]GA<sub>20</sub> e [<sup>3</sup>H]GA<sub>5</sub>), aplicadas às sementes, foram metabolizadas. As GAs conjugadas formadas foram principalmente as GAs-GET. Sugeriu-se um caminho hipotético para o metabolismo em plântulas de *D. miscolobium* no qual, a [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub> poderia ser formada a partir da [<sup>3</sup>H]GA<sub>20</sub> e/ou da [<sup>3</sup>H]GA<sub>4</sub>, sendo a conversão de [<sup>3</sup>H]GA<sub>20</sub> em [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub>, através de uma 3<sup>o</sup> hidroxilação, mais efetiva. A [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub> foi convertida em [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub>-GET e [<sup>3</sup>H]GA<sub>8</sub>-GET. Esta última, possivelmente, através da [<sup>3</sup>H]GA<sub>8</sub> que sofre, então, uma conjugação formando a [<sup>3</sup>H]GA<sub>8</sub>-GET. A [<sup>3</sup>H]GA<sub>20</sub> além de ser transformada em [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub>, também, pode ser convertida em [<sup>3</sup>H]GA<sub>5</sub> que é convertida em [<sup>3</sup>H]GA<sub>6</sub> que por sua vez pode ser transformada em [<sup>3</sup>H]GA<sub>8</sub>. A produção da [<sup>3</sup>H]GA<sub>6</sub>, [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub>, [<sup>3</sup>H]GA<sub>1</sub>-GET, [<sup>3</sup>H]GA<sub>8</sub>-GET e três

metabólitos não identificados foi observada após a aplicação de [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>5</sub> às sementes. Apesar da [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>4</sub> ter sido convertida em [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>1</sub>, pareceu que as vias principais de metabolismo, desta GA, foram através da formação da [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>4</sub>-GEt e/ou [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>34</sub> e [ $^3\text{H}$ ]GA<sub>34</sub>-GEt.

## 6. LITERATURA CITADA

- ALBONE, K. S.; SPONSEL, V. M.; GASKIN, P. & MacMILLAN, J., 1984. Identification and localization of GAs in maturing seeds of the cucurbit *Sechium edule* and a comparison between this cucurbit and the legume *Phaseolus coccineus*. *Planta*, 162: 560-565.
- ARIGAYO, S.; FUJISAWA, S.; SAKURAI, A.; KAMIYA, Y.; ADISEWOJO, S. S. & TAKAHASHI, N., 1984. Fluctuation of endogenous levels of free and conjugated gibberellins throughout seed maturation in *Leucaena leucocephala* (Lmk) De wit. *Plant Cell Physiol.*, 25: 1395-1402.
- BEARDER, J. R., 1983. *In vivo* diterpenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*: The pathway after *ent*-kaurene. In: CROZIER, A. *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*, vol. 1. Praeger, New York. 53-98 pp.
- COOLBAUGH, R. C., 1983. Early stages of gibberellin biosynthesis. In: CROZIER, A. *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*, vol.1. Praeger, New York. 53-98 pp.

- COOLBAUGH, R. C. & MOORE, T. C., 1971. Metabolism of kaurene in cell-free extracts of immature pea seeds. *Phytochemistry*, 10: 2401-2412.
- COOLBAUGH, R. C.; MOORE, T. C.; BARLOW, S. A. & ECKLUND, P. R., 1973. Biosynthesis of *ent*-kaurene in cell-free extracts of *Pisum sativum* shoots tips. *Phytochemistry*, 12: 1613-1618.
- CROZIER, A., 1981. Aspects of the metabolism and physiology of gibberellins. In: WOOLHOUSE, H. W. *Advances in Botanical Research*, vol. 9. Academic Press London. 33-149 pp.
- CROZIER, A., 1983. *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*, vol. 1 and 2. Praeger, New York.
- CROZIER, A.; KUO, C. C.; DURLEY, R. C. & PHARIS, R. P., 1970. The biological activities of 26 gibberellins in nine plant bioassays. *Can. J. Bot.* 48: 867-877.
- DUNBERG, A. & ODEN, P. C., 1983. Gibberellins and conifers. In: CROZIER, A. *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*, vol. 2. Praeger, New York. 221-295 pp.
- DURLEY, R. C.; MacMILLAN, J. & PRYCE, R. P., 1971. Investigation of gibberellins and other growth substances

in the seed of *Phaseolus multiflorus* and of *Phaseolus vulgaris* by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemistry*, 10: 1891-1908.

FRYDMAN, V. M.; GASKIN, P. & MacMILLAN, J. 1974. Qualitative and quantitative analyses of gibberellins throughout seed maturation in *Pisum sativum* cv. PROGRESS n<sup>o</sup>9. *Planta*, 118:123-132.

GARCIA-MARTINEZ, J. L.; SPONSEL, V. M.; GASKIN, P., 1986. Gibberellins in developing fruits of *Pisum sativum* cv. Alaska: studies on their role in pod growth and seed development. *Planta*, 170: 130-137.

GRAEBE, J. E., 1969. The enzymatic preparation of <sup>14</sup>C-kaurene. *Planta*, 85: 171-174.

GRAEBE, J. E., 1986. Gibberellin biosynthesis from gibberellin A<sub>12</sub>-aldehyde. In: BOPP, M. *Plant growth substances*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. 74-82 pp.

GRAEBE, J. E., 1987. Gibberellin biosynthesis and control. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 38: 419-465.

- GRAEBE, J. E.; DENNIS, D. T.; CHRISTEN, D. U. & WEST, C. A., 1965. Biosynthesis of gibberellins. I. The biosynthesis of (-)-kauren-19-ol, and *trans*-geranyl-geraniol in endosperm nucellus of *Echinocystis macrocarpa* Greene. *J. Biol. Chem.*, 240: 1847-1854.
- HEDDEN, P., 1983. *In vitro* metabolism of gibberellins. In: CROZIER, A. *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*, vol. 1. Praeger, New York. 99-149 pp.
- HEDDEN, P., 1987. Gibberellins. In: RIVIER, L. & CROZIER, A. *Principles and Practice of Plant Hormone Analyses*, vol. 1. Academic Press, London. 9-10 pp.
- HEDDEN, P. & PHINNEY, B. O., 1979. Comparison on *ent*-Kaurene and *ent*-isokaurene synthesis in cell-free system from etiolated shoots of normal and dwarf-5 maize seedlings. *Phytochemistry*, 18: 1475-1479.
- HEDDEN, P.; PHINNEY, B. O.; HEUPEL, R.; FUJI, D.; COHEN, H.; GASKIN, P.; MacMILLAN, J. & GRAEBE, J. E., 1972. Hormones of young tassels of *Zea mays* L.. *Phytochemistry*, 21: 391-394.
- HEDDEN, P.; MacMILLAN, J. & PHINNEY, B. O., 1978. The metabolism of gibberellins. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 29:

149-192.

HIRAGA, K.; YOKATA, T.; MUROFUSHI, N. & TAKAHASHI, N., 1974a.

Isolation and characterization of gibberellins in mature seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Agric. Biol. Chem.*, 38: 2511-2520.

HIRAGA, K.; KAWABE, S.; YOKATA, T.; MUROFUSHI, N. &

TAKAHASHI, N., 1974b. Isolation and characterization of gibberellins in mature seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Agric. Biol. Chem.*, 38: 2521-2527.

INGRAM, T. J.; REID, J. B.; POTTS, W. C. & MURFET, I. C.,

1983. Internode length in *Pisum*. The effect of the *Le* gene on gibberellin metabolism. *Physiol. Plant.*, 59: 607-616.

INGRAM, T. J.; REID, J. B.; MURFET, I. C.; GASKIN, P.;

WILLIS, C. L. & MacMILLAN, J., 1984. Internode length in *Pisum*. The *Le* gene controls the 3B-hydroxylation of gibberellin A<sub>20</sub> to gibberellin A<sub>1</sub>. *Planta*, 160: 455-463.

INGRAM, T. J.; REID, J. B.; MacMILLAN, J., 1985. Internode

length in *Pisum sativum* L. The kinetics of growth and [<sup>3</sup>H]gibberellin A<sub>20</sub> metabolism in genotype *na Le*. *Planta*, 164: 429-438.

- INGRAM, T. J.; REID, J. B.; MacMILLAN, J., 1986. The quantitative relationship between gibberellin A<sub>1</sub> and internode growth in *Pisum sativum* L. *Planta*, 168: 414-420.
- KAMIENSKA, A.; DURLEY, R. C. & PHARIS, R. P., 1976. Endogenous gibberellins of pine pollen. Conversion of 1,2-[<sup>3</sup>H]GA<sub>4</sub> to gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>34</sub> in germination pollen of *Pinus attenuata* Lemm. *Plant Physiol.*, 58: 68-70.
- KAMIYA, Y. & GRAEBE, J. E., 1983. The biosynthesis of all major pea gibberellins in cell-free system from *Pisum sativum*. *Phytochemistry*, 22: 681-690.
- KWAK, S. S.; KAMIYA, Y.; TAKAHASHI, M.; SAKURAI, A. & TAKASHASHI, N., 1988. Metabolism of [<sup>14</sup>C]GA<sub>20</sub> in a cell-free system from developing seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell Physiol.*, 29: 707-711.
- KOSHIOKA, M.; PHARIS, P. R.; KING, R. W.; MUROFUSHI, N. & DURLEY, R. C., 1985. Metabolism of [<sup>3</sup>H]gibberellin A<sub>5</sub> in developing *Pharbitis nil* seeds. *Phytochemistry*, 24: 663-671.
- MALCOLM, J. M., 1990. Gibberellin metabolism in seeds and seedlings of the runner bean, *Phaseolus coccineus* L. Tese de doutorado. Universidade de Glasgow, Escócia.

- MALCOLM, J. M.; CROZIER, A., TURNBULL, C. G. N. & JENSEN, E., 1991. Metabolism of C<sub>19</sub>-and-C<sub>20</sub>-gibberellin by cell-free preparations from immature *Phaseolus coccineus* seeds. *Physiol. Plant.*, 82:57-88.
- MONTEIRO, A. M.; TURNBULL, C. & CROZIER, A., 1985. As gibberelinas e sua função no alongamento do eixo caulinar. *Rev. Bras. Bot.*, 8: 241-264.
- MONTEIRO, A. M.; CROZIER, A. & SANDBERG, G., 1988. Endogenous hormones, germination and early seedling growth of *Dalbergia dolichopetala*. *J. Plant Physiol.*, 132: 762-765.
- MORITZ, T., 1989. Gibberellins and flower-bud differentiation in spruce. Tese de doutorado. Universidade de Umea, Suécia.
- MORITZ, T.; PHILIPSON, J. & ODEN, P. C., 1989. Metabolism of tritiated and deuterated gibberellins A<sub>1</sub>, A<sub>4</sub> and A<sub>9</sub> in Sitka spruce (*Picea sitchensis*) shoots during the period of cone-bud differentiation. *Physiol. Plant.*, 77: 39-45.
- NADEAU, R. & RAPPAPORT, L., 1972. Metabolism of gibberellin A<sub>1</sub> in germination bean seeds. *Phytochemistry*, 11: 1611-1616.

- PHINNEY, B. O., 1983. The history of gibberellin. In: CROZIER, A. *The biochemistry and Physiology of Gibberellins*, vol. 1. Praeger, New York. 19-52 pp.
- PHINNEY, B. O., 1984. Gibberellin A<sub>1</sub>, dwarfism and the control of shoot elongation in higher plants. In: CROZIER, A. & HILLMAN, J. R. *The Biochemistry and Metabolism of Plant Hormones*, vol. 23. University Press, Cambridge. 17-41 pp.
- PHINNEY, B. O. & SPRAY, C., 1982. Chemical genetics and the GA pathway in *Zea mays* L.. In: WAREING, P. F. *Plant growth substances*. Academic Press, London. 101-110 pp.
- REEVE, D. R. & CROZIER, A., 1974. An assessment of gibberellin structure activity relationship. *J. Exp. Bot.*, 25: 431-445.
- REEVE, D. R. & CROZIER, A., 1976. Purification of plant hormone extracts by gel permeation chromatography. *Phytochemistry*, 15: 791-793.
- RIZZINI, C. T., 1971. Plantas do Brasil: Arvores e Madeiras Uteis do Brasil. Ed. E. Blucher e EDUSP, São Paulo, 294 pp.

- ROBINSON, D. R. & WEST, 1970. Biosynthesis of cyclic diterpenes in extracts from seedlings of *Ricinus communis* L. I. Identification of diterpene hydrocarbons formed from mevalonate. *Biochemistry*, 9: 70-79.
- SCHNEIDER, G., 1983. Gibberellin conjugates. In: CROZIER, A. *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*, vol. 1. Praeger, New York. 389-456 pp.
- SPONSEL, V. M., 1983a. *In vivo* gibberellin metabolism in higher plants. In: CROZIER, A. *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*, vol. 1. Praeger, New York. 151-250 pp.
- SPONSEL, V. M., 1983b. The localisation, metabolism and biological activity of gibberellins in maturing and germination seeds of *Pisum sativum*, cv. PROGRESS n<sup>o</sup> 9. *Planta*, 159: 454-468.
- SPONSEL, V. M., 1986. Gibberellins in dark and red-light-growth shoots of dwarf and tall cultivars of *Pisum sativum*: The quantification, metabolism and biological activity of gibberellins in PROGRESS n<sup>o</sup> 9 and Alaska. *Planta*, 168: 119-129.

- SPONSEL, V. M., 1987. Gibberellin biosynthesis and metabolism. *In*: DAVIES, P. J. *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. Nijhoff, Dordrecht. 43-75 pp.
- SPONSEL, V. M.; GASKIN, P. & MacMILLAN, J., 1979. The identification of gibberellins in immature seeds of *Vicia faba* and some chemotaxonomic considerations. *Planta*, 146: 101-105.
- SUZUKI, Y.; KUROGOCHI, S.; MUROFUSHI, N.; OTA, Y. & TAKAHASHI, N., 1981. Seasonal changes of GA<sub>1</sub>, GA<sub>19</sub> and abscisic acid in three rice cultivars. *Plant Cell Physiol.*, 22: 1085-1093.
- TAKAHASHI, N.; YAMAGUCHI, I. & YAMANE, H., 1986. Gibberellins. *In*: TAKAHASHI, N. *Chemistry of Plant Hormones*. CRC Press, Inc. 57-151 pp.
- TAKAHASHI, M.; PHINNEY, B. O. & MacMILLAN, J., 1990. *Gibberellins*. Springer-Verlag, Berlin.
- TURNBULL, C. G. N. & CROZIER, A., 1989. Metabolism of [1,2-<sup>3</sup>H]gibberellin A<sub>4</sub> by epicotyls and cell-free preparation from *Phaseolus coccineus* L. seedlings. *Planta*, 178: 267-274.

- TURNBULL, C. G. N. ; CROZIER, A. & SCHNEIDER, G., 1986. HPLC-based methods for the identification of gibberellin conjugates: metabolism of [<sup>3</sup>H]gibberellin A<sub>4</sub> in seedlings of *Phaseolus coccineus*. *Phytochemistry*, 25: 1823-1828.
- WEST, C. A., 1973. Biosynthesis of gibberellins. In: MILBORROW, B. V. *Biosynthesis and its Control in Plants*. Academic Press, London. 473-482 pp.
- WURTELE, E. S.; HENDDEN, P. & PHINNEY, B. O., 1982. *In vitro* metabolism of the gibberellin precursors *ent*-kaurenol and *ent*-kaurenal in normal maize seedling shoots. *J. Plant Growth Regulation*, 1: 15-24.
- YAMANE, H.; MUROFUSHI, N. & TAKAHASHI, N., 1975. Metabolism of gibberellins in maturing and germination bean seeds. *Phytochemistry*, 14: 1195-1200.
- YAMANE, H.; MUROFUSHI, N.; OSADA, H. & TAKAHASHI, N., 1977. Metabolism of gibberellins in early immature bean seeds. *Phytochemistry*, 16: 831-835.