

ANA CECILIA GOES HORTA $\pi/782$

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
ANA CECILIA GOES HORTA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Abel
18/1/94

EFEITO DE FONTES DE NITROGÊNIO E ENXOFRE NA SÍNTESE DAS PROTEÍNAS
DE RESERVA DE SEMENTES DE SOJA (Glycine max [L] Merrill) CULTIVA-
DAS "IN VITRO".

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Esta-
dual de Campinas para a obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. LADASLAV SODEK *t*

CAMPINAS, SP, 1994

Dedico este trabalho aos meus
filhos Renata e Germano.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Ladaslav Sodek, o meu agradecimento especial pela orientação segura e estímulo permanentes.

Aos Professores, Joaquim Albenisio Gomes da Silveira, Renato de Azevedo Moreira, Luiz Gonzaga Santoro e Antonio Celso Novaes de Magalhães pelas sugestões e discussões apresentadas durante a realização desta dissertação.

Aos demais professores do curso de Pós-graduação em Biologia Vegetal pelos ensinamentos prestados.

De modo muito especial aos Professores e amigos Benildo Sousa Cavada, Tadeu Abreu de Oliveira, Renato de Azevedo Moreira e Ana Lucia Ponte Freitas, pela ajuda, apoio, estímulo e amizade constantes e pela certeza que sempre estarão presentes em qualquer momento de minha vida.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP responsáveis pelo ambiente de colaboração e amizade necessários ao bom desempenho de qualquer trabalho científico.

As amigas Claudia Haddad, Rogéria Pereira e Eliana Chagas pela ajuda, carinho e amizade, a minha mais sincera gratidão.

Aos amigos Ronaldo, pela confecção dos gráficos, Vicente, Enilene, Marcio e Talles pela presença reconfortante.

Aos demais colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da U.F.C. pela amizade e incentivo.

Todo o reconhecimento de modo incomparável ao meu marido e companheiro Luiz Carlos que com amizade, amor e renúncia muito me apoiou nos momentos mais difíceis da minha vida e pela inestimável colaboração na confecção desta dissertação.

A minha querida filha Renata pela compreensão, renúncia e amor.

Ao meu filho Germano e a minha mãe que embora fisicamente ausentes, estão sempre presentes em todos os momentos de minha vida, dando-me proteção e forças para prosseguir.

Ao meu pai e irmãos pelo carinho e apoio.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), através da bolsa de Doutorado concedida ao autor.

Coordenação do curso de Pós-graduação da Universidade Federal do Ceará, através do Programa Institucional de Capacitação de Docentes (PICD).

Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em cujos laboratórios esta dissertação foi preparada.

Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, por permitir o uso do Analizador de Aminoácidos.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, pelo afastamento concedido

ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	1
AGRADECIMENTOS.....	11
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	v11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	1x
ABREVIATURA.....	x1
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. MATERIAL VEGETAL E CULTIVO DAS PLANTAS.....	21
3.2. CULTIVO DE COTILÉDONES IMATUROS.....	22
3.2.1. Meio de Cultura.....	23
3.3. CULTIVO DE EXPLANTES.....	25
3.3.1. Meio de Cultura.....	27
3.4. EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	28
3.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	28
3.6. EXTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES.....	29
3.7. DOSAGEM DE AMINOÁCIDOS LIVRES TOTAIS.....	30

3.8.	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	31
3.8.1.	Derivatização dos Aminoácidos.....	31
3.8.2.	Separação e Quantificação dos aminoácidos.....	31
3.9.	ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS PROTÉICOS.....	32
3.9.1.	Eletroforese e Eletrotransferência em membrana de PVDF.....	32
3.9.2.	Derivatização e Análise dos Aminoácidos Protéicos.....	33
3.10.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1.	ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	36
4.2.	EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO.....	40
4.2.1.	Cultura de Cotilédones isolados.....	40
4.2.2.	Cultura de Explantes.....	55
4.3.	EFEITO DA FONTE DE ENXOFRE.....	65
4.3.1.	Cultura de Cotilédones.....	65
4.3.2.	Cultura de Explantes.....	78
4.4.	COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DAS SUBUNIDADES DAS PROTEÍNAS DE RESERVA DE SOJA EM SEMENTES QUIESCENTES.....	87
5.	DISCUSSÃO GERAL.....	89
5.1.	EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO.....	89
5.2.	EFEITO DA FONTE DE ENXOFRE.....	103
6.	RESUMO.....	115
7.	BIBLIOGRAFIA.....	119

INDICE DE TABELAS

TABELA 1	- Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio ao meio de cultura sobre peso seco, teor de proteínas e aminoácidos livres de cotilédones imaturos de soja cultivados por 7 dias.....	41
TABELA 2	- Aminoácidos livres de cotilédones imaturos de soja cultivados "in vitro" em diferentes fontes de nitrogênio.....	46
TABELA 3	- Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio ao meio de cultura sobre peso seco, teor de proteínas e aminoácidos livres de sementes de explantes de soja cultivados por 7 dias.....	56
TABELA 4	- Aminoácidos livres de cotilédones de explantes de soja mantidos em meio de cultura contendo diferentes fontes de nitrogênio.....	61
TABELA 5	- Efeito da adição de metionina no meio de cultura sobre o crescimento, teor de proteínas e de aminoácidos livres de cotilédones imaturos de soja cultivados "in vitro".....	66
TABELA 6	- Aminoácidos livres de cotilédones imaturos de soja cultivados "in vitro" em presença e ausência de metionina.....	71
TABELA 7	- Efeito da glutamina e da metionina sobre o peso e teor de proteínas de cotilédones de soja em dois estágios de imaturidade, cultivados "in vitro".....	76

TABELA 8 - Efeito da adição de metionina no meio de cultura sobre o crescimento, teor de proteínas e de aminoácidos livres em sementes de explantes de soja cultivadas "in vitro".....	79
TABELA 9 - Aminoácidos livres de sementes de explantes de soja cultivados em presença e ausência de metionina.....	83
TABELA 10- Composição de aminoácidos das principais subunidades das proteínas de reserva de sementes quiescentes de soja.....	88

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol da farinha de cotilédones de soja, com diferentes idades de maturação (peso fresco).....	38
FIGURA 2 - Peso seco e percentagem do conteúdo de água de cotilédones de soja durante o desenvolvimento em casa-de-vegetação.....	39
FIGURA 3 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento de cotilédones imaturos de soja, cultivados "in vitro" por 7 dias.....	43
FIGURA 4 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre o teor de proteínas e aminoácidos livres totais de cotilédones imaturos de soja, cultivados "in vitro" por 7 dias.....	44
FIGURA 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol de extratos liofilizados de sementes quiescentes de soja e padrões de pesos moleculares.....	50
FIGURA 6 - Massas moleculares relativas das diferentes subunidades das proteínas de reserva de soja determinadas por PAGE-SDS.....	51
FIGURA 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol de extratos liofilizados de cotilédones imaturos de soja mantidos em cultura com diferentes fontes de nitrogênio.....	53
FIGURA 8 - Medidas de peso da matéria fresca e seca em sementes de explantes de soja, mantidos em cultura em diferentes fontes de nitrogênio.....	57

FIGURA 9 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre o teor de proteínas e aminoácidos livres totais de sementes de explantes de soja cultivados "in vitro"	59
FIGURA 10- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol de extratos liofilizados de sementes de explantes de soja mantidos em cultura com diferentes fontes de nitrogênio.....	64
FIGURA 11- Efeito da metionina no crescimento de cotilédones imaturos de soja, cultivados "in vitro" por 7 dias.....	67
FIGURA 12- Efeito da metionina sobre o teor de proteínas e aminoácidos livres totais de cotilédones imaturos de soja cultivados "in vitro" por 7 dias.....	69
FIGURA 13- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol de extratos liofilizados de cotilédones imaturos de soja mantidos em cultura com e sem metionina no meio.....	74
FIGURA 14- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol de extratos liofilizados de cotilédones imaturos de soja (pesos frescos, 50 mg e 100 mg), mantidos em cultura com ou sem nitrogênio e metionina.....	77
FIGURA 15- Efeito da metionina no crescimento de sementes de explantes de soja, cultivados "in vitro" por 7 dias.....	80
FIGURA 16- Efeito da metionina sobre o teor de proteínas e aminoácidos livres totais de sementes de explantes de soja cultivados "in vitro" por 7 dias.....	81
FIGURA 17- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol de extratos liofilizados de sementes de explantes mantidos em cultura com ou sem metionina no meio.....	86

ABREVIATURAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
CAPS	Ácido-1-Propanosulfônico-3-Ciclohexilamino
EDTA	Etileno Diamino Tetra Acetato
Fmoc-Cl	9-Fluorenilmetil Cloroformato
GABA	Ácido Aminobutírico
GOGAT	L - Glutamina (amida): Oxoglutarato Amida Transferase
GS	Glutamina Sintetase
HPLC	Cromatografia de Alta Eficiência
MSO	Metionina Sulfoximina
PAGE-SDS	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS
PITC	Fenilisotiocianato
PTC	Feniltiocarbamil
PVC	Policloreto de Polivinila
PVDF	Diofluorito Polivinilideno
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TEA	Trietilamina
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano

1 - INTRODUÇÃO

O estudo da biossíntese das proteínas de reserva nas sementes é extremamente importante, não somente pela sua importância nutricional, mas também por elas representarem um interessante modelo de expressão genética em plantas. Dessa forma, as proteínas de reserva têm sido frequentemente objeto de revisões (MILLERD, 1975; DERBYSHIRE et al., 1976; LARKINS, 1981; NIELSEN, 1984; SPENCER, 1984; HIGGINS, 1984 e PERNOLLET, 1985). Elas exibem diferentes características que permitem distinguí-las das outras proteínas: a) acumulam-se somente nas sementes e em quantidades significativas; b) têm como função principal fornecer aminoácidos ou nitrogênio durante a germinação e crescimento inicial da plântula; c) possuem uma composição de aminoácidos peculiar (tendem a ser ricas em ASN, GLN, ARG ou PRO); d) localizam-se nos corpos protéicos; e) distribuem-se usualmente em dois grupos principais: nas leguminosas, as globulinas legumina e vicilina, e nos cereais as prolaminas e glutelinas (SPENCER, 1984 e PERNOLLET, 1985).

As limitações para o uso dessas proteínas na nutrição humana e em outros animais monogástricos são bem conhecidas desde que, entre outros aspectos, as proteínas de reserva dos principais produtos agrícolas são carentes em aminoácidos essenciais.

Em termos gerais as proteínas de cereais são deficientes em lisina, triptofano e treonina (DOLL, 1984; SHEWRY et al., 1984) e as de leguminosas são deficientes nos aminoácidos sulfurados, cisteína e metionina (SPENCER, 1984 e MOREIRA et al., 1981). A modificação destas proteínas, de tal maneira que aumente a proporção desses aminoácidos limitantes dentro da semente, tem sido objeto de muitas investigações. Existem pelo menos três maneiras pelas quais se pode modificar as proteínas de sementes. Uma delas é alterar a composição de polipeptídeos específicos, outra é introduzir genes nessas sementes a partir de outras espécies e a terceira é aumentar a proporção das frações protéicas que são mais ricas em aminoácidos essenciais.

A deficiência em alguns nutrientes e a forma como são fornecidos, podem resultar em mudanças significativas na quantidade relativa dos componentes proteicos, fornecendo subsídios para o estudo de alguns mecanismos celulares que regulam a composição das proteínas de reserva. Estas modificações, entretanto, devem ser compatíveis com suas propriedades e toleradas pelas sementes durante o seu desenvolvimento sem afetar seu papel fisiológico. Para se obter sucesso na melhoria da qualidade nutricional das sementes é necessário, portanto, uma cuidadosa caracterização bioquímica da estrutura das proteínas de reserva, da biossíntese e regulação dessas proteínas durante o desenvolvimento da semente e dos genes responsáveis pela sua síntese.

A soja, particularmente, fornece um interessante sistema para estes estudos uma vez que, na maturidade fisiológica, a semente contém entre 40% e 55% de proteína, com base no peso seco (TUMER, et al., 1981, NIELSEN, 1984, COATES et al., 1985). As duas principais proteínas de reserva da soja somam 70% do total das proteínas em sementes maduras (HILL & BREIDENBACK, 1974). Elas podem ser separadas em duas frações principais, glicinina (11S) e conglicinina (7S). Em termos gerais essas duas proteínas de soja são similares, respectivamente, às leguminas e vicilinas, proteínas típicas de muitas outras leguminosas. A massa molecular observada para conglicinina varia entre 150-200 KDa e para a glicinina está geralmente entre 310-350 KDa (MOREIRA et al., 1981, NIELSEN, 1984 e HIRANO et al., 1987). Essas duas proteínas são bastante complexas, como esperado pela elevada massa molecular. A conglicinina consiste de três subunidades não idênticas, comumente denominadas de alfa', alfa e beta, com massas moleculares de 83 KDa, 78 KDa e 53 KDa, respectivamente, formando seis diferentes isômeros (NIELSEN, 1984, HOLOWACH et al., 1984 e TIERNEY et al., 1987). Entretanto, a uma baixa força iônica, a forma trimérica associa-se para formar hexâmeros. Estudos de THANH & SHIBASAKI (1978) e outros demonstraram que a conglicinina pode ser subfracionada em proteínas complexas que consistem de diferentes combinações randômicas das subunidades. No caso da glicinina, hexâmeros são observados quando a proteína é purificada a partir de soluções salinas diluídas (BRADLEY et al., 1975). Ela é composta de pelo menos 6 subunidades não idênticas e cada uma dessas subu-

nidades contém um polipeptídeo ácido ligado a um polipeptídeo básico por uma ligação dissulfeto. As duas cadeias polipeptídicas resultam de clivagens pós-tradução dos precursores proglicininas (TUMER, et al., 1982), e uma das etapas ocorre depois que o precursor entra nos corpos proteicos (CHRISPEELS, et al., 1982). As massas moleculares das subunidades ácidas e básicas variam entre 37-45 kDa e 17-22 kDa, respectivamente (MOREIRA et al., 1979, STASWICK et al., 1984, NIELSEN, 1984 e SATHE, 1991). Como a conglicinina, a glicinina também exibe polimorfismo estrutural (KITAMURA et al., 1980 e STASWICK & NIELSEN, 1983).

Outros importantes fatores distinguem essas duas moléculas. Enquanto a conglicinina contém em torno de 5% de açúcar, nenhum açúcar foi detectado na glicinina purificada. O açúcar da conglicinina está ligado a uma asparagina das subunidades alfa' e alfa e contém dois resíduos de N-acetilglucosamina seguidos de 7 a 10 resíduos de manose (YAMAUCHI & YAMAGISHI, 1979 e KOSHIYAMA, 1983). Finalmente, as subunidades dessas proteínas diferem no seu conteúdo de aminoácidos. A variação de aminoácidos sulfurados (metionina + cisteína) está entre 0,6% e 3% (w/w) nas subunidades da glicinina (STASWICK et al., 1981) e entre zero e 0,48% (w/w) para as subunidades das conglicininas (DERBYSHIRE et al., 1976 e THANH & SHIBASAKI, 1977). No geral, a composição de aminoácidos da glicinina se caracteriza pelo alto conteúdo de GLN-GLU(GLX) ASN-ASP(ASX) e também ARG, PRO, LEU e ILE (MOREIRA et al., 1979, BRADLEY et al., 1975). Comparando-se os polipeptídeos ácidos e básicos, vemos que, enquanto os primeiros contêm proporcionalmente

mais GLX e ASX, os últimos são mais ricos em LEU, VAL e ALA (MORREIRA et al., 1979). A conglícinina, por sua vez, é caracterizada pelo alto conteúdo de ASP, GLU, LEU e ARG. Considerável similaridade na composição de aminoácidos das subunidades alfa' e alfa foi observada. Entretanto, o conteúdo de HIS, se encontra em maior proporção na subunidade alfa' (THANH & SHIBASAKI, 1977, KOSHIYAMA, 1983). Este fato contribui para uma ligeira diferença nos seus pontos isoeletrônicos. Por outro lado, a subunidade beta tem, geralmente, um mais alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos (ALA, VAL, LEU, ILE, PHE) e ASP (THANH & SHIBASAKI, 1977, SYKES & GAYLER, 1981).

O conhecimento da síntese e acúmulo das proteínas é um outro aspecto de extrema importância para estudos de melhoria nutricional dessas proteínas, além de ser um dos eventos principais do metabolismo durante o desenvolvimento das sementes. Mudanças na síntese de proteínas de reserva de sementes foram investigadas em uma variedade de leguminosas incluindo, Phaseolus vulgaris (SUN et al., 1978, FOUNTAIN et al., 1989), Pisum sativum (DOMONEY et al., 1980, GATEHOUSE et al., 1982, CHANDLER et al., 1983), Vigna unguiculata (CARASCO et al., 1978), vicia faba (WRIGHT & BOUTER, 1972) e Glycine max (OCHIAI-YANAGI et al., 1978, MEINKE et al., 1981, GAYLER & SYKES, 1981, SPIELMANN et al., 1982 e KONDO et al., 1986). A conclusão geral desses estudos, tem sido que o acúmulo das proteínas inicia logo após o término da divisão celular em cotilédones em desenvolvimento.

Embora variável, dependendo da espécie, do cultivar e condições de crescimento, a síntese de proteínas de reserva em leguminosas inicia-se geralmente entre o 9º e 12º dia após a floração e a síntese máxima está compreendida entre o 15º e 30º dia (PERNOLLET, 1985). Durante a deposição das proteínas de reserva, os diversos polipeptídeos são sintetizados a diferentes taxas e em diferentes períodos. Este fato foi primeiro investigado em cevada por BISHOP (1930). Posteriormente, muitos estudos acompanhando a síntese das proteínas de reserva durante o desenvolvimento das sementes foram feitos em diferentes espécies.

LUTHE (1987) verificou, por PAGE-SDS, que das proteínas extraídas das sementes de aveia (Avena sativa L.), durante o seu desenvolvimento, muitos polipeptídeos coincidindo com as subunidades alfa e beta das globulinas estavam presentes a partir do 2º ao 4º dia após a antesis, mas o total dos componentes polipeptídicos das globulinas estavam ausentes até o 10º dia.

Em leguminosas, o início e a taxa de síntese das leguminas e vicilinas são diferentes. WRIGHT & BOULTER (1972) acompanharam o padrão de síntese das vicilina e legumina durante o desenvolvimento dos cotilédones de Vicia faba. Os autores verificaram que vicilina foi formada nas sementes antes da legumina ser detectada, porém legumina foi sintetizada a taxas mais rápidas do que a vicilina. Resultados semelhantes foram obtidos em Pisum sativum por GATEHOUSE et al. (1982). Eles mostraram que a taxa de síntese de legumina é aproximadamente constante durante o desenvolvimento da semente, enquanto que a síntese dos diferentes com-

ponentes da vicilina ocorre em diferentes estádios do desenvolvimento. Eles observaram ainda que os níveis dos mRNA das legumina e vicilina oscilavam de acordo com a taxa de síntese dos respectivos polipeptídeos, sugerindo que a síntese de proteínas de reserva é regulada primariamente a nível de transcrição.

A formação e o acúmulo das subunidades das proteínas de reserva de algumas cultivares de soja, durante o desenvolvimento da semente, foram investigadas por diversos pesquisadores (HILL & BREIDENBACH, 1974; OCHIAI-YANAGI et al., 1978; GAYLER & SYKES, 1981; MEINKE et al., 1981; SPIELMANN et al., 1982; KONDO et al., 1986 e LADIN et al., 1987).

Usando métodos desenvolvidos para caracterizar proteínas de soja HILL & BREIDENBACH (1974) descreveram mudanças quantitativas e qualitativas durante o desenvolvimento da semente. Seus estudos revelaram diferenças temporais no acúmulo dos três componentes da fração 7S, e observaram ainda que a fração 11S aparece no decorrer do desenvolvimento como uma proteína homogênea que acumula na semente com o tempo, do mesmo modo que o total das proteínas da fração 7S.

Para melhor caracterizar o desenvolvimento da semente de soja (cv. Provar), MEINKE e colaboradores (1981) estabeleceram quinze estádios de desenvolvimento, baseados nos comprimentos e pesos das sementes. Relacionando a síntese das diferentes subunidades com esses estádios, os autores observaram que as subunidades alfa' e alfa da fração 7S começam a acumular no estádio J, no qual a semente pesa entre 65 e 85 mg, com 18-20 dias após a ante-

sis, logo após o término da divisão celular. Além disso, na fração 7S purificada, os autores observaram que o total da subunidade alfa nos extratos era consistentemente mais abundante do que a subunidade alfa'. A subunidade beta, por sua vez, não acumulou até uma ou duas semanas mais tarde, durante a fase de maturação da semente, alcançando nível máximo no estágio N, quando o peso da semente era de 200 a 250 mg. Resultados semelhantes foram obtidos por GAYLER & SYKES, 1981, SPIELMANN, et al., 1982, KONDO et al., 1986 e TIERNEY et al., 1987.

As subunidades ácidas e básicas da fração 11S começam a se acumular quando a semente atinge peso entre 65 e 85 mg e entre 85 e 120mg (estádios J e K, respectivamente), 18 a 21 dias após a antesis. Em contraste, um isômero da subunidade ácida (A-4, como definida por KITAMURA et al., 1976), aparece mais tarde no desenvolvimento e seu padrão de acumulação assemelha-se àquele da subunidade beta da fração 7S (MEINKE et al., 1981). SPIELMANN e colaboradores (1982) verificaram, nos estádios iniciais do desenvolvimento da semente, a presença de um polipeptídeo com massa molecular de 83 KDa, que desaparece concomitantemente com o aparecimento dos dois principais componentes das glicininas (básicas e ácidas). Eles observaram ainda, que há diferenças temporais na síntese das subfrações desses polipeptídeos.

Posteriormente, esses estudos foram intensificados para determinar se as subunidade da fração 7S eram representadas por uma ou mais formas isoméricas (LADIN et al., 1987). Para tal, extratos protéicos de sementes de soja em diferentes estádios do

desenvolvimento foram analisados por eletroforese bidimensional. Os autores verificaram que as diversas manchas representando as subunidades alfa' e alfa no estágio inicial do desenvolvimento (estádio H), se fundem em uma mancha larga e simples em sementes próximas à maturação. Estes resultados levaram os autores a concluir que formas isoméricas das subunidades alfa' e alfa se acumulam de uma maneira regulada e que modificações pós-tradução dessas subunidades resultam em alterações nas cargas das isoformas. Ao contrário, a subunidade beta é inicialmente detectada no estágio M (peso da semente entre 160 e 200 mg) como uma isoforma simples, com o aparecimento de isoformas múltiplas desta subunidade próximo ao estágio de secagem da semente. HARADA et al. (1989), observaram que sementes de soja contêm múltiplas cópias do gene da subunidade beta e que o mRNA das subunidades alfa', alfa e beta acumulam diferencialmente, em paralelo com o aparecimento dos respectivos polipeptídeos. Assim, segundo os autores, o acúmulo diferencial desses mRNAs parece ser devido a eventos que ocorrem após a transcrição.

Foi mostrado também que processos pós-transcrição são importantes para regular a expressão de genes que codificam outras proteínas de sementes (GOLDBERG, et al., 1989). Entretanto, esses eventos pós-transcrição parecem desempenhar mais um papel ativo no estabelecimento dos níveis de predominância de mRNA de proteínas de sementes do que no controle de programas temporais de acumulação desses mRNAs durante o desenvolvimento (GOLDBERG, et al., 1989). Por exemplo, diferentes genes que codificam os

mRNAs das glicininas acumulam e desaparecem coordenadamente durante a embriogênese de soja e são ativados e reprimidos no mesmo período do desenvolvimento (NIELSEN, et al., 1989).

No entanto, este notável sincronismo é dependente das fontes de carbono e nitrogênio translocados pelo sistema vascular e/ou outras partes da planta até as sementes. Portanto, é extremamente importante se conhecer a forma pela qual os nutrientes chegam à semente e como são metabolizados para fornecer os diferentes compostos necessários ao desenvolvimento dos frutos.

Tem-se mostrado em leguminosas como soja, feijão e caupi, que o transporte de substâncias nitrogenadas das raízes para as partes aéreas depende principalmente das condições de cultivo e da fonte externa de nitrogênio. Estudos realizados por OHYAMA & KAMAZAWA (1979) com $^{15}\text{N}_2$, mostraram que as principais substâncias nitrogenadas, em plantas noduladas, foram os ureídeos. Entretanto, na ausência da fixação simbiótica do nitrogênio, a ASN foi a principal substância nitrogenada translocada das raízes para as partes aéreas.

Estudos cinéticos do transporte em soja (THORNE, 1980) e algumas espécies de Phaseolus (PATRICK & McDONALD, 1980) indicaram que os assimilados que chegam às sementes em desenvolvimento são rapidamente distribuídos no tegumento, seguido de uma transferência gradual para a superfície interna dos cotilédones, onde são acumulados. Entretanto, temporariamente, as fontes de nitrogênio podem se acumular em outros tecidos, como observado em

soja por WAREMBOURG & FERNANDES (1985). Eles verificaram que uma grande proporção do N fixado acumulou nos caules e pecíolos, provavelmente na forma de ureídeos, para posterior transferência para as sementes em desenvolvimento. Nos frutos, o primeiro local que recebe os compostos nitrogenados são as vagens. As paredes das vagens podem então armazenar e, posteriormente, redistribuir as substâncias nitrogenadas (THORNE, 1979).

Em soja, GOMES & SODEK (1984) mostraram que os aminoácidos e ureídeos aumentaram muito nas vagens expandidas, caindo a valores muito baixos durante o período de preenchimento das sementes. Portanto, as vagens de soja podem funcionar como fonte-dreno, uma vez que, se a quantidade de assimilados que chegam às sementes é alta, as vagens atuam como dreno e o peso seco das paredes das vagens aumentam. Ao contrário, se a disponibilidade de assimilados para os frutos for baixa, as paredes das vagens atuam como fonte e o peso das mesmas declina (FADER & KOLLER, 1985). Das vagens, as substâncias nitrogenadas se dirigem para os cotilédones. Entretanto, várias delas podem ser metabolizadas pelos tegumentos das sementes.

Uma das técnicas que permitem estudos da composição e dos mecanismos de descarregamento da seiva do floema e sua redistribuição em sementes em desenvolvimento é a técnica dos tegumentos vazios, utilizada por THORNE & RAINBIRD, (1983), RAINBIRD et al. (1984) e GIFFORD & THORNE, (1986).

RAINBIRD e colaboradores (1984) examinando o exudato do tegumento em plantas de soja noduladas, verificaram que GLN é o

principal soluto nitrogenado liberado pelo tegumento das sementes, chegando a atingir 52% do nitrogênio total. Os níveis de ASN foram de 19%, ARG e HIS apareceram na proporção de 5% e 4%, respectivamente. A amônia e outros aminoácidos constituíram o nitrogênio restante. A liberação dos ureídeos (alantoina e ácido alantóico) para as sementes foi insignificante. A sacarose foi a principal fonte de carbono, constituindo 90% do total de carbono exportado para o embrião, enquanto que o esqueleto carbônico das substâncias nitrogenadas constituíram os 10% restantes. Portanto, segundo os autores, a razão C:N no exudato do tegumento foi de 31mgC/mgN, similar ao observado anteriormente no floema dos frutos por PATE & HOCKING (1978). GIFFORD & THORNE (1986), utilizando a mesma técnica, também observaram que, em sementes de soja em desenvolvimento, GLN e ASN foram os principais compostos nitrogenados liberados pelos tegumentos.

MURRAY & CORDOVA-EDWARDS (1984), utilizando a técnica do pulso radioativo, verificaram que em ervilha, uma leguminosa que não transporta ureídeos, a GLN é pouco metabolizada nos tegumentos. Entretanto, introduzindo ^{14}C -ASN na corrente transpiratória, os autores verificaram que este aminoácido é utilizado diretamente na incorporação de proteínas ou convertido em GLN e, em menor proporção, em ALA, VAL e sacarose. Estas transformações, segundo os autores, ocorrem provavelmente nos tegumentos, o que está de acordo com o observado anteriormente por IRELAND & JOY (1981). Estes dados foram confirmados por WOLSWINKEL & DE RUITER (1985) que, após remoção do embrião de óvulos de Pisum sativum

em desenvolvimento, verificaram que ALA e GLN foram os componentes mais importantes liberados do tegumento, enquanto que ASN estava presente em quantidades insignificantes. Em Vicia faba, os mesmos autores verificaram que o aminoácido predominante no exudato do tegumento foi a ALA.

Mais recentemente, ROCHAT & BOUTIN (1991) utilizaram duas técnicas para verificar a composição de aminoácidos do exudato do floema em plantas de Pisum sativum noduladas e não noduladas. Uma delas, a técnica de exudação promovida por EDTA, foi utilizada para coletar seiva do floema e uma outra, a técnica do tegumento vazio utilizada para coletar os solutos secretados pelo tegumento na cavidade embrionária. Os autores verificaram que, em ambos os sistemas, sacarose foi o principal carboidrato liberado. Em plantas não noduladas, utilizando a técnica do EDTA, os principais compostos nitrogenados encontrados no exudato do floema foram a ASN, GLN, HSER e GLU, enquanto que em plantas noduladas o exudato continha altas proporções de ASN e SER e baixas proporções de HSER e GLN quando comparadas com plantas não noduladas. Em ambas as plantas, noduladas e não noduladas, os principais aminoácidos translocados para as sementes a partir do tegumento foram a ALA, GLN e HSER. Asparagina apareceu em quantidades notáveis concomitantemente com o decréscimo de GLN, em estádios posteriores.

Em caupí, os principais solutos liberados pelos tegumentos em frutos no estágio inicial do desenvolvimento foi a HIS (30-35% do N total), seguida da GLN e ASN que alcançaram 20% do N

total secretado. Porém, em sementes no estágio intermediário de desenvolvimento, GLN e ASN foram os principais compostos nitrogenados secretados (PEOPLES et al., 1985).

É evidente que deve ocorrer a interconversão de nitrogênio e, portanto, a biossíntese "de novo" dos aminoácidos nos frutos, os quais são utilizados principalmente na síntese de proteínas de reserva.

No estudo do preenchimento das sementes, vários autores têm utilizado a técnica da cultura de cotilédones imaturos "in vitro", utilizando uma fonte única de nitrogênio. Como as amidas (ASN e GLN) e os ureídeos (alantoína e ácido alantóico) são as principais fontes de nitrogênio transportada para a parte aérea em plantas superiores durante o crescimento vegetativo e reprodutivo, diversos autores utilizaram essas substâncias para o estudo de síntese de proteínas de reserva em sistemas "in vitro".

LEA et al. (1979), verificaram que em sementes de ervilha cultivadas "in vitro", GLN ou ASN, utilizadas como fonte de nitrogênio, foram igualmente eficientes em promover síntese de proteínas. Entretanto, MILLERD et al. (1975) haviam demonstrado que, enquanto a quantidade de proteína sintetizada a partir de ASN foi a mesma observada a partir de uma quantidade equivalente de uma mistura de aminoácidos, a eficiência da GLN foi inferior ao observado para o "pool" de aminoácidos endógenos. DOMONEY et al. (1980) verificaram, por imunensaio, que ambas as amidas promoveram a síntese inicial das subunidades das leguminas em em-

briões imaturos de Pisum sativum cultivados "in vitro". Em endosperma de mamona (AZARKOVICH & SOBOLEV, 1990) e em endosperma de grãos de milho (MISRA & OAKS, 1985), cultivados "in vitro", GLN foi intensamente convertida em outros aminoácidos, promovendo uma alta síntese das proteínas de reserva.

O cultivo de cotilédones de soja imaturos em meio de cultura foi também estudado por THOMPSON et al. 1977, SKOKUT et al. 1982, OBENDORF et al. 1984, COKER & SCHAEFER, 1985, HAGA & SODEK, 1987, DYER et al. 1987 e TONIN & SODEK, 1990. Foi relatado pelos autores que GLN e ASN podem, isoladamente, promover síntese e acúmulo das proteínas de reserva em cotilédones imaturos. Foi mostrado ainda, que as atividades das principais enzimas envolvidas no metabolismo dos aminoácidos, aumentaram substancialmente durante o período de cultivo, independente da fonte de nitrogênio, indicando com isso, que os cotilédones têm a capacidade para sintetizar todos os aminoácidos necessários ao seu desenvolvimento (TONIN & SODEK, 1991). Um fato interessante observado pela autora (TONIN, 1980), foi a inibição da atividade da asparaginase pela GLN, mesmo quando em presença de ASN e em cotilédones com uma mais alta atividade inicial desta enzima

Os ureídeos (alantoína e alantoato) entretanto, se comportam como pobres fontes de nitrogênio para a síntese de proteínas de reserva em cultura de cotilédones isolados de qualquer espécie de plantas estudadas (THOMPSON et al., 1977, LEA et al., 1979, COKER & SCHAEFER, 1985, HAGA & SODEK, 1987). Porém, em cultura "in vitro" de frutos de soja (explante), essas substâncias

foram igualmente eficientes quando comparadas as amidas no crescimento dos cotilédones (MOSQUIM, 1984 e MOSQUIM & SODEK, 1991). Segundo estes últimos autores, os ureídeos são metabolizados nas vagens uma vez que, foi observado aumento de N-protéico nesta parte do explante e não foi detectado ureídeos nos cotilédones. Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados por RAINBIRD et al., 1984, HSU et al., 1984 e COKER & SCHAEFER, 1985, que obtiveram evidências de que, "in situ", os ureídeos são degradados dentro do tegumento ou da vagem e o nitrogênio resultante é convertido em GLN que depois é translocado para as sementes.

Segundo THOMAS & SCHRAEDER (1981a,b), os ureídeos são primeiramente concentrados nas vagens e, então, degradados a outros compostos, como aminoácidos, ou são transportados diretamente para as sementes, onde são rapidamente degradados a aminoácidos e estes, eventualmente, incorporados nas proteínas. A alta atividade da enzima alantoinase nas sementes em desenvolvimento (GOMES & SODEK, 1984) e nos cotilédones isolados em cultura (TONIN & SODEK, 1990) corrobora com a sugestão de que ureídeos podem ser degradados nesse órgão. Uma possível explicação para o fato dos ureídeos não promoverem aumento do teor de proteínas em cultura de cotilédones isolados, foi dada por COKER & SCHAEFER (1985). Eles demonstraram que a amônia liberada pela degradação dos ureídeos não foi eficientemente incorporada em proteínas, possivelmente pelos baixos níveis da atividade da glutamina sintetase, ou devido a taxa no qual o glutamato é produzido ser insuficiente como substrato de assimilação da amônia. Porém, essas

conclusões não estão de acordo com os resultados obtidos por TONIN (1988), pois essa enzima além de ser constitutiva, possui alta atividade nos cotilédones quando em cultura.

Além das amidas e dos ureídeos uma fonte de enxofre é também extremamente necessária para o desenvolvimento dos cotilédones. A síntese de proteínas é particularmente afetada em carência de enxofre, pois a falta de aminoácidos sulfurados modifica a distribuição dos grupos protéicos dependentes desses aminoácidos (PERNOLLET, 1985). Segundo SPENCER (1984), deficiência de enxofre durante o desenvolvimento da semente de ervilha ocasionou uma redução de 80% no nível relativo de cisteína mas não afetou o nível de metionina. Embora os níveis relativos de cisteinil-tRNA e metionil-tRNA, que se constituem numa medida mais direta de substratos disponíveis para a síntese de proteínas, não tenham sido afetados pela deficiência de enxofre em ervilha, seus níveis absolutos por semente reduziram de 60-70% (MACNICOL, 1983). Consequentemente, a taxa de síntese das leguminas em cotilédones crescidos em deficiência de enxofre reduziu em 90% (CHANDLER *et al.*, 1983). Esse decréscimo é acompanhado por um aumento na quantidade das vicilinas, proteínas pobres em aminoácidos sulfurados (SPENCER, 1984).

Resultados análogos têm sido obtido em soja. Sob deficiência de enxofre, que reduz apenas levemente o acúmulo das proteínas totais, o nível das glicininas, proteínas ricas em enxofre, foi reduzido sendo compensado pelo aumento nas conglicininas que são pobres em enxofre (GAYLER & SYKES, 1985). HOLLOWACH *et*

al. (1984b) não observaram mudanças na razão 11S:7S e nem síntese diferenciada entre as diferentes subunidades, na variedade cv. Provar de soja cultivada em meio deficiente em enxofre. Entretanto, FUJIWARA et al., (1992), trabalhando com plantas transgênicas, verificaram que estas plantas acumularam muitas vezes mais a subunidade beta, enquanto que as subunidades alfa' e alfa foram pouco afetadas por esse tratamento.

A redução do nível de proteínas ricas em aminoácidos sulfurados não é causada por um aumento na degradação dessas proteínas, mas pela redução dos níveis de mRNA em sementes deficientes em enxofre (CHANDLER et al., 1983 e SPENCER et al., 1990).

A deficiência de enxofre também afeta a sequência temporal de síntese das diferentes subunidades das proteínas de reserva de soja e ervilha.

Como foi dito anteriormente, as subunidades das conglucinininas de soja mostram uma bem distinta e definida sequência de síntese, com acúmulo das subunidades alfa' e alfa precedendo a subunidade beta por 5-7 dias e com níveis superiores àqueles da subunidade beta durante o desenvolvimento da semente (GAYLER & SYKES, 1981). Sob condições de deficiência de enxofre, o acúmulo da subunidade beta é antecipado e continua a uma taxa elevada por um período de tempo maior do que o usual, sendo o principal componente na segunda metade do desenvolvimento da semente (SYKES & GAYLER, 1981). Esta subunidade acumula como um isômero extra não detectável em sementes sob condições normais, o qual é compensado pela redução dos níveis das outras conglucinininas e glicinininas

(SYKES & GAYLER, 1981).

Em ervilha, o período de síntese das vicilinas é estendido em sementes deficientes em enxofre, enquanto que as leguminas, que são sintetizadas na segunda metade do desenvolvimento têm níveis extremamente baixos, aparecendo alguns dias mais tarde (HIGGINS, 1984; CHANDLER *et al.*, 1983).

Os efeitos provocados pela carência de enxofre também foram observados em outras plantas, incluindo Lupinus angustifolius (BLAGROVE *et al.*, 1976), Oryza sativa (BAUDET *et al.*, 1986), Triticum aestivum (CASTLE & RANDALL, 1987) e Hordeum vulgare (SHEWRY *et al.*, 1983). Em todos os casos, em disponibilidade limitada de enxofre, as proteínas com baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados acumularam mais do que aquelas com alto conteúdo.

Todos esses resultados sugerem que mudanças nas proteínas de reserva são reguladas ao nível de transcrição e pós-transcrição, uma vez que os níveis dos correspondentes mRNA caem sob deficiência de enxofre (SPENCER *et al.*, 1990 e FUJIWARA *et al.*, 1992). Portanto, isto demonstra a grande complexidade da regulação de síntese de proteínas de reserva.

2- OBJETIVOS

Em vista da diversidade de compostos nitrogenados que são encontrados nas vias de transportes, é de interesse investigar a capacidade dos cotilédones de soja em utilizar essas substâncias para síntese de proteínas em sistemas de cultura.

Neste trabalho, será feita uma comparação da síntese e acúmulo de proteínas de reserva e da taxa de mudanças no "pool" dos aminoácidos livres, em cotilédones imaturos mantidos em cultura com fontes apropriadas de nitrogênio e enxofre.

A comparação será feita quantitativamente e qualitativamente, entre cotilédones crescidos na planta, cultivados em meio básico e em meio suplementado com GLN, ASN ou ALN, principais formas de nitrogênio encontradas no floema, e metionina como fonte de enxofre.

Para tal, serão utilizados dois sistemas de cultura. O sistema de cultura de cotilédones isolados, que possibilita analisar o potencial dos cotilédones em utilizar tais substâncias e sistema de cultura de frutos imaturos, em que os nutrientes entram pelas vias normais de transporte.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAL VEGETAL E CULTIVO DAS PLANTAS

Neste trabalho, foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max* (L) Merrill), cultivar "Santa Rosa", produzidas no IAC (Instituto Agronômico de Campinas, SP).

Antes do plantio, as sementes foram selecionadas de modo a se obter um grupo homogêneo. As sementes foram colocadas para germinar em vasos plásticos com capacidade de 3 litros, em casa de vegetação. A vermiculita, usada como substrato, foi exaustivamente lavada com água corrente. Quando as plantas apresentaram a primeira folha trifoliolada completamente expandida, foram transferidas para um regime de dias curtos (9 horas de luz e 15 horas de escuro), durante 4 dias, para indução da floração. Ao mesmo tempo, iniciou-se o tratamento com solução nutritiva completa de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950), sendo aplicados 250 ml por vaso (com 2 plantas), duas vezes por semana. Durante o inverno (abril a setembro), as plântulas permaneceram inicialmente em dias longos (18 horas de luz e 6 horas de escuro), para evitar a indução precoce da floração. Após o tratamento de dias curtos, as plantas foram mantidas em condições naturais de luz até a formação dos frutos. Quando os cotilédones atingiram em

torno de 40-50mg de matéria fresca (HAGA e SODEK, 1987), os vasos foram então separados em dois lotes, sendo um utilizado para os experimentos e o outro como controle "in situ" na casa de vegetação.

3.2 - CULTIVO DE COTILÉDONES IMATUROS

As vagens foram selecionadas de acordo com o tamanho das sementes, com o auxílio de uma lanterna colocada atrás dos frutos e esterilizadas por imersão numa solução de dodecil-sulfato de sódio (SDS) 0,1% contendo hipoclorito de sódio 0,5% por 5 minutos. Depois de lavadas por duas vezes em água destilada esterilizada, as vagens foram colocadas em placas de Petri e as sementes retiradas cuidadosamente com o auxílio de pinças e bisturi. Todas estas operações foram realizadas com materiais previamente autoclavados e sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Tegumentos e eixos embrionários foram removidos e os cotilédones inoculados no meio (líquido) de cultura, tomando-se sempre o cuidado de distribuir cada um dos cotilédones da mesma semente em tratamentos diferentes.

Os frascos de cultura contendo os cotilédones foram fechados com filme de PVC (Policloreto de Polivinila), colocados em agitador com cerca de 130 agitações por minuto a 25 °C e iluminados continuamente com duas lâmpadas fluorescentes a uma altura de 35cm com irradiância de $80 \text{ uE.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR, durante 7

dias. Pelo menos 15 repetições foram montadas por tratamento.

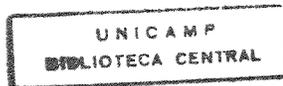
Qualquer frasco que apresentasse sinais de contaminação por microorganismos, era descartado. Selecionados os frascos, os cotilédones foram retirados do meio de cultura, lavados 2 vezes com água destilada, enxugados com papel de filtro e pesados em balança de pesagem rápida. Após congelamento, os cotilédones foram liofilizados, pesados novamente e armazenados em frascos hermeticamente fechados, a baixas temperaturas, para análises posteriores.

3.2.1- MEIO DE CULTURA

O meio de cultura padrão foi preparado segundo LINSMAIER e SKOOG (1965), modificado por THOMPSON (1977), a partir das soluções estoques abaixo, tendo as seguintes composições em g/l:

A) MACRONUTRIENTES (2 X concentrado):

KCl	1,49
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,88
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,74
KH ₂ PO ₄	0,34
K ₂ SO ₄	2,08



B) MICRONUTRIENTES (1000 X concentrado):

H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	0,022
ZnSO ₄ . 4 H ₂ O	8,6
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025

C) FERRO (200 X concentrado):

FeSO ₄ . 7 H ₂ O	5,45
NaEDTA	7,45

D) COFADORES (200 X concentrado):

Tiamina-HCl	0,08
Mioinositol	20,0
Ácido Nicotínico	0,1
Piridina-HCl	0,1
Glicina	0,4

E) SACAROSE (2 X concentrado): 50

O meio de cultura foi preparado a partir das soluções estoque da seguinte maneira: em 1 litro da solução A foram adicionados 1ml da solução B, 5ml da solução C, 5 ml da solução D e 50 g de sacarose. O pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 0,1N. Esta solução representa o dobro da concentração final. Foram colocados 2ml desta solução em frascos quadrados altos de 40ml e posteriormente autoclavados a 120°C durante 20 minutos. As fontes de nitrogênio (ASN, GLN e ALN) foram adicionadas ao meio (2 ml) através de filtro Millipore estéril, na concentração final de 1,75 mg N/ml de meio de acordo com HAGA e SODEK (1987).

Nos experimentos em que foi utilizada metionina como fonte de enxofre, a solução estoque dos macronutrientes foi modificada, substituindo-se o sulfato por uma solução equivalente de sais clorídricos. L-metionina foi adicionada ao meio numa concentração final de 8,4 mM (HOLLOWACH et al, 1984a).

3.3 - CULTIVO DE EXPLANTES

O cultivo de explantes foi baseado na metodologia descrita por CHANDLER et al (1983) e adaptado para soja por MOSQUIM (1989).

As plantas com vagens completamente expandidas e sementes ocupando todo o lúmen (cerca de 100mg de matéria fresca

cada) foram inicialmente desfolhadas e os frutos removidos, deixando-se apenas uma vagem com duas sementes em cada nó. Em seguida, os caules foram esterilizados com uma solução de SDS 0,1% e hipoclorito de sódio 0,5%, cortados com uma lâmina de barbear, e colocados em béqueres com água destilada. Os explantes obtidos (com 6 cm de comprimento) foram então transferidos para frascos de 10 ml contendo 6,5 ml do meio, previamente envolvidos na parte superior com uma tira de isopor de 15 mm de largura e fita adesiva. Os caules foram fixados com pedaços de isopor de modo que a extremidade inferior ficasse mergulhada na solução. O conjunto foi colocado em orifícios feitos em uma tampa de caixa de isopor, de modo que a parte inferior dos frascos ficasse mergulhada em um banho de gelo e a parte superior fixada na tampa. Caules e pecíolos do explante foram vedados com pasta de lanolina e todo o sistema colocado em uma câmara de crescimento a 25°C sob luz fluorescente branca contínua ($80 \text{ uE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) por um período de 7 dias. Os caules dos explantes foram cortados em sua base (2mm), sob água, a cada 48 horas e os meios trocados no quarto dia de cultivo.

O banho de gelo foi trocado sistematicamente durante o período experimental e serviu para restringir o crescimento de microorganismos no meio de cultura.

No final dos experimentos as sementes (sem tegumento) foram pesadas e congeladas. Após congelamento, foram liofilizadas, pesadas novamente e armazenadas para análises posteriores.

3.3.1 - MEIO DE CULTURA

As soluções estoque de micronutrientes e de ferro foram as mesmas utilizadas no cultivo de cotilédones isolados. A solução de macronutrientes foi preparada de acordo com CHANDLER *et al* (1983) com a seguinte composição:

CaCl ₂ .2 H ₂ O	4mM;
KH ₂ PO ₄	6mM;
K ₂ SO ₄	2mM;
MgSO ₄ .7H ₂ O	4mM.

Para cada 100 ml da solução de macronutrientes foram adicionados 0,1 ml de micronutrientes, 0,5 ml da solução de ferro, 5g de sacarose, 120 mg de N (GLN, ASN ou ALN) e o pH ajustado para 5,0.

Quando metionina foi utilizada como fonte de enxofre, foi preparada uma solução de macronutrientes em que K₂SO₄ foi substituído por KCl e MgSO₄ por MgCl₂ na mesma concentração final. L-metionina foi adicionada ao meio de cultura numa concentração final de 8,4 mM (HOLLOWACH *et al*, 1984a).

3.4 - EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.

Cotilédones ou sementes liofilizadas com pesos secos determinados foram triturados em almofariz até a obtenção de uma farinha fina. Proteínas foram extraídas em Tampão Fosfato 0,035 M contendo NaCl 0,4 M e beta-mercaptoetanol 0,01 M, pH 7,6 (WOLF et al, 1956), durante 4 horas sob constante agitação. Os extratos foram centrifugados por 15 minutos a 12000 x g e filtrados em papel de filtro. Uma alíquota de 100 ul foi tomada para determinação de proteínas pelo método de BRADFORD (1976), utilizando BSA como padrão. O restante foi dialisado exaustivamente contra água destilada, liofilizado e posteriormente analisado por eletroforese.

3.5 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.

As eletroforeses foram adaptadas do método de LAEMMLI (1970), usando-se sistema descontínuo dissociante em placa vertical (13cm X 12cm X 0,1cm). A concentração de acrilamida foi de 10% no gel de separação e de 5% no gel de empacotamento.

Os extratos protéicos liofilizados foram dissolvidos (5 mg/ml) em Tampão Fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo SDS a 2%

e beta-mercaptoetanol a 1%. A solução foi fervida em banho-maria por 10 minutos, adicionando-se sacarose (concentração final de 10%) e azul de bromofenol (0,01%) como indicador de corrida. Foram aplicadas alíquotas de 10 μ l (cerca de 50 μ g de proteína) em cada poço, e a corrida desenvolvida por cerca de 4 horas em amperagem fixa (20 mA).

O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue 0,3% em ácido acético - água - metanol (1:4,5:4,5) por uma noite e descorado numa solução de ácido acético- água - metanol (1:8:3,5) até visualização das bandas.

As estimativas dos pesos moleculares das subunidades das proteínas de reserva de soja foram feitas a partir do R_f de cada banda, usando-se como padrões as seguintes proteínas obtidas da Pharmacia: fosforilase b (94 KDa), BSA (67 KDa), ovoalbumina (43 KDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 KDa) e anidrase carbônica (30 KDa)

3.6 - EXTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES

Para extração de aminoácidos livres totais foram utilizados 50 mg de cotilédones liofilizados e triturados em 12 ml de uma mistura de metanol - clorofórmio - água (12:5:3 v/v/v) de acordo com BIELESKI e TURNER (1966). Após homogeneização em

Potter por um minuto, o material foi centrifugado a 800 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante colocado em funil de separação, onde adicionou-se 4,5 ml de água destilada e 3,0 ml de clorofórmio. O extrato foi agitado e deixado em repouso para separação das fases. A fase aquosa foi coletada e seca em banho maria a 45°C com um fluxo de ar. Após secagem, o volume original foi retomado com água destilada.

3.7 - DOSAGEM DE AMINOÁCIDOS LIVRES TOTAIS.

A concentração de aminoácidos totais foi determinada de acordo com YEMM e COOKING (1955), utilizando-se como padrão leucina em concentrações que variaram de 20 a 200 nmoles/ml.

Uma alíquota de 1 ml de amostra foi adicionado 0,5 ml de tampão citrato 0,2M, pH 5,0, 0,2 ml de ninhidrina 5% em Metil celossolve e 1,0 ml de cianeto de potássio a 2% (v/v) (a partir de KCN 0,01M) em metilcelossolve. Os tubos foram agitados, tampados com bolinhas de vidro e aquecidos em banho maria por 20 minutos. Após resfriamento o volume foi completado para 4 ml com etanol 60%, procedendo-se a leitura a 570 nm.

3.8 - CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

3.8.1 - DERIVATIZAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos livres totais, extraídos como descrito em 3.6 e a mistura de aminoácidos padrões foram preparados em solução aquosa de modo a conter cerca de 1,0 μmol de aminoácidos totais por mililitro.

Os derivados fluorescentes foram obtidos misturando-se 200 μl das amostras e padrões com 50 μl de Tampão Borato 1,0M pH 6,3 e 250 μl do reagente 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl, 15mM) em acetona, segundo EINARSSON et al. (1983). Após 30 segundos, o excesso de reagente foi removido, agitando-se com 1ml de pentano, por três vezes consecutivas. As soluções dos derivados foram diluídas 10 vezes com água mili-Q.

3.8.2 - SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos foram separados e quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), utilizando uma coluna cromatográfica Hypersil-ODS de 250 X 4,6 mm, acoplada a um sistema da LKB.

Os solventes utilizados foram: Ácido Acético contendo trietilamina 0,1% pH 4,2 ajustado com NaOH (NASHOLM et al, 1987) ou pH 3,0 (solvente A) e metanol (solvente B). O gradiente de eluição foi de 45% a 65% de B entre 0 e 25 minutos e 65% a 85% de B entre 24 e 40 minutos, com fluxo de 1,0 ml/min. Cada injeção da amostra correspondeu a um volume de 10 ul. Os aminoácidos foram detectados por um monitor de fluorescência, com comprimento de onda de excitação de 263nm e de emissão de 313nm.

A quantificação dos aminoácidos foi feita pela comparação da altura dos picos das amostras com a altura dos picos dos aminoácidos usados como padrão.

3.9 - ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS PROTEICOS

3.9.1 - ELETROFORESE E ELETROTRANSFERÊNCIA EM MEMBRANA DE Diofluorito Polivinilideno (PVDF)

A eletroforese das proteínas (15 mg/ml) foi feita como descrita em 3.5, utilizando-se um gel de 1,5 mm de espessura e a eletrotransferência ("Western blotting") segundo MATSUDAIRA (1987), com pequenas modificações

Após eletroforese, o gel foi cortado e embebido no tampão de transferência CAPS (Ácido-1-propanosulfônico-3-ciclohe-

xilamino) 10 mM, metanol 10%, pH 11,0, por 5 minutos para reduzir a quantidade de Tris e Glicina. Durante esse tempo, a membrana de PVDF (Diofluorito polivinilideno) foi lavada com metanol 100% e estocada no tampão de transferência.

O sanduíche para a eletrotransferência foi montado com o gel e a membrana entre folhas de papel de filtro Whatman nº 3 e duas esponjas, em cassetes apropriados. As amostras foram eletroeluídas em amperagem constante (400 mA) a uma temperatura de 15°C por 30 a 45 minutos. Após esse tempo, a membrana de PVDF foi lavada por 3 vezes com água deionizada por 5 minutos e corada com amido black 0,5% em ácido acético 5% e metanol 50% durante 5 minutos. O descoramento foi feito com metanol 50% e ácido acético 5% por 5-10 minutos à temperatura ambiente. A membrana foi finalmente lavada com água deionizada e estocada a 10°C.

3.9.2 - DERIVATIZAÇÃO E ANÁLISE DOS AMINOÁCIDOS PROTÉICOS

Cada uma das bandas protéicas presentes na membrana de PVDF foi recortada, colocada em tubos de amostras (3 por tubo) e estes colocados em frascos de hidrólise contendo 200 µl de HCl 6N. Com o auxílio do "Work Station" (Waters), o oxigênio foi removido com nitrogênio alternado com vácuo e os frascos de reação aquecidos no forno do "Work Station" a 106°C por 24 horas. Após esse tempo, os frascos de hidrólise foram resfriados à tem-

peratura ambiente e o excesso de HCl removido sob vácuo.

Os aminoácidos foram extraídos da membrana com 200ul de uma solução de HCl 0,1N e metanol 30% por 3 vezes a intervalos de 5 minutos (LEGRENDE & MATSUDAIRA, 1989). Após completa secagem das amostras a vácuo em liofilizador, foram adicionados 20ul de uma mistura de Metanol-Acetato de sódio 1M-Trietilamina (TEA), em cada tubo, na proporção de 2:2:1 ("Redrying solution"). Os tubos foram agitados, centrifugados por um minuto e secados a vácuo com auxílio do "Work station". Para a derivatização dos aminoácidos foram adicionados aos tubos 20 ul da mistura de Metanol:Trietilamina:Água:Fenilisotiocianato (PITC) (7:1:1:1 V/V/V/V), sendo estes agitados por alguns segundos e deixados à temperatura ambiente por 20 minutos. Resíduos de PITC foram removidos a vácuo por 30-45 minutos e os derivados (feniltiocarbamil(PTC)-aminoácidos) dissolvidos com 200 ul de tampão de amostra (Na_2HPO_4 5mM pH 7,4 ajustado com H_3PO_4 10% e acetonitrila 5%) (Manual da Waters, nº 88140, 1990).

A solução contendo 250 pmol de cada aminoácido utilizado como padrão, foi derivatizada como descrito acima.

A composição das subunidades proteicas foi analisada por HPLC, utilizando-se o sistema de análise de aminoácidos PICO-TAG da Waters, equipado com uma coluna de 3,9 mm X 150 mm.

Os solventes utilizados foram Acetato de sódio 0,1M pH 6,4 ajustado com Ácido acético, 0,5 ml de TEA e 60 ml de Acetonitrila para 1 litro de água mili-Q (solvente A) e Acetonitrila 60% (solvente B). O programa de gradiente de eluição e flu-

os empregados estão descritos no quadro abaixo:

TEMPO (Min.)	FLUXO	%A	%B
Início	1,0	100	0
10,0	1,0	58	42
10,5	1,0	0	100
12,0	1,5	0	100
12,5	1,5	100	0
35,5	1,0	100	0

Foram aplicados 20 ul de cada amostra e 14 ul dos aminoácidos padrões.

Os aminoácidos das frações protéicas, detectados a 254 nm, foram quantificados pela comparação da altura dos picos das amostras com a altura dos picos dos aminoácidos usados como padrões.

3.10 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os dados foram analisados através de análise de variância e quando o valor "F" foi significativo, os valores das médias foram comparados entre si pelo teste de DUNCAN, ao nível de 5% de probabilidade (SNEDECOR e COCHRAN, 1967).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO.

O tamanho ideal para manutenção de cotilédones imaturos de soja em cultura (meio líquido) proposto por THOMPSON et al (1977) e HAGA (1982) está numa faixa de inicial acima de 20 mg, considerando-se o ganho de matéria seca. O ganho máximo em quantidade de proteínas é, no entanto, verificado quando os cotilédones estão numa faixa acima de 30 mg de matéria fresca (HAGA, 1982).

Como a síntese das proteínas de reserva de soja está sob controle temporal (OCHIAI-YANAGI et al., 1978, MEINKE et al., 1981, SPIELMANN et al., 1982, KONDO et al., 1986 e LADIN et al., 1987), o aparecimento dessas proteínas durante o desenvolvimento da semente, foi acompanhada por eletroforese em gel de poli-acrilamida, para melhor caracterizar as faixas de peso de matéria fresca inicial em termos qualitativos.

As proteínas de reserva de sementes de soja são compostas de duas principais proteínas, a Conglicinina e a Glicinina. A Conglicinina é uma molécula 7S trimérica consistindo de três principais subunidades: alfa' (83KDa), alfa (78KDa) e beta (53KDa) (TIERNEY et al., 1987 e HOLOWACH, et al., 1984a). A Gli-

cinica (11S) é composta de pelo menos 6 subunidades não idênticas e cada uma dessas subunidades contém um polipeptídeo ácido ligado a um polipeptídeo básico por uma ligação simples dissulfeto. O peso molecular das subunidades ácidas e básicas variam entre 37-42 KDa e 17-20 KDa, respectivamente (SATHE,1991).

Pelos resultados da eletroforese (Figura 1) foi verificado que, durante o desenvolvimento da semente, as bandas características das proteínas de reserva começam a aparecer em estádios diferentes. Os cotilédones com peso de matéria fresca em torno de 45-55 mg já apresentam as subunidades alfa' e alfa da fração 7S e as subunidades básicas da fração 11S. Pode-se observar ainda na Figura 1 que a subunidade beta só é detectada quando as sementes estão com peso de matéria fresca em torno de 130-140 mg e que as subunidades ácidas estão melhores definidas em cotilédones com peso de matéria fresca de 85-95 mg.

É sabido (MEINKE, et al., 1981), que a transição do período de morfogênese e divisão celular para o período de expansão das células ocorre quando os cotilédones estão com peso de matéria fresca entre 45-65 mg (estádio I). Neste estágio, a semente ainda está no início da maturação fisiológica (Figura 2). Esta é indicada pelo máximo de peso de matéria seca da semente, quando o conteúdo de água é menor do que 60% (TeKRONY et al., 1979), o que possibilita uma melhor avaliação do comportamento dos cotilédones em sistema de cultura. MILLERD et al. (1975) e CARASCO et al. (1978) têm ressaltado que o uso de peso de matéria fresca de cotilédones é mais válido que a idade como critério pa-

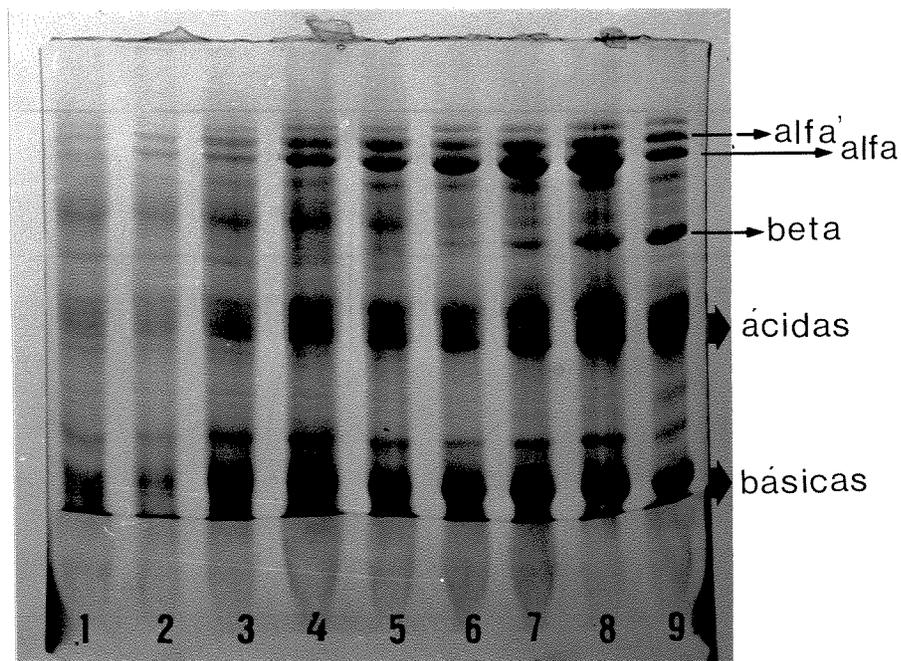


FIGURA 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol da farinha de cotilédones de soja (20mg/ml), com diferentes idades de maturação (peso fresco). Foram aplicados 10ul de cada amostra.

Amostras: 1- 10-20 mg; 2- 30-40 mg; 3- 45-55 mg;
 4- 70-80 mg; 5- 85-95 mg; 6- 130-140 mg;
 7- 160-170 mg; 8- 200-220 mg; 9- Quiescente

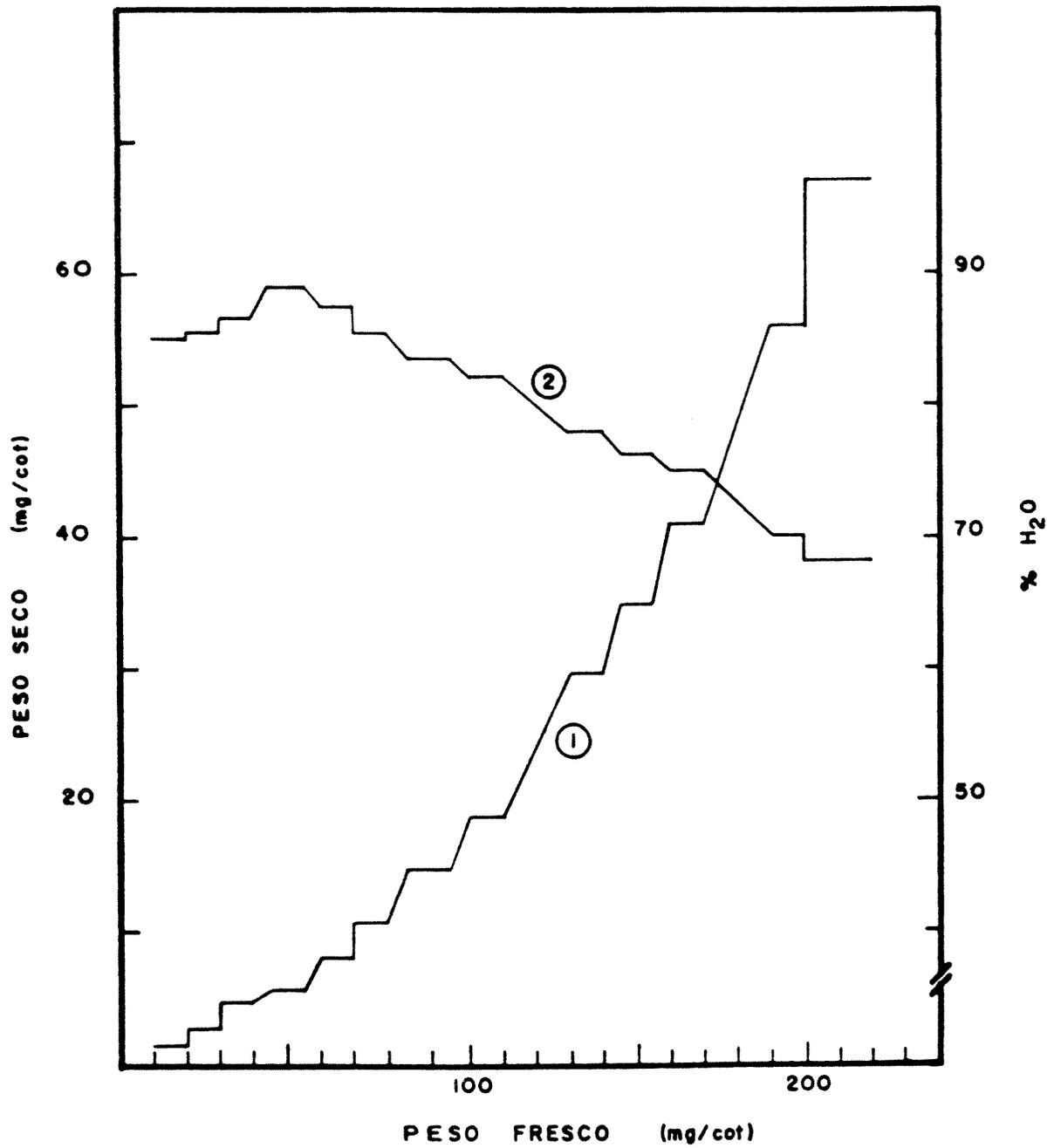


FIGURA 2 - Peso seco (1) e Percentagem do conteúdo de água (2) de cotilédones de soja durante o desenvolvimento em casa-de-vegetação.

na estágio de desenvolvimento. Sementes de Vigna unguiculata L. com pesos frescos iguais, embora idades diferentes, são similares em muitos aspectos fisiológicos (CARASCO, et al., 1978). Baseando-se nesses resultados e em trabalhos anteriores (HAGA, 1982 e MOSQUIM, 1989) foi escolhido cotilédones com pesos frescos variando entre 40-55 mg, que é o peso próximo do mínimo para crescimento normal em cultura.

4.2 - EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO.

4.2.1 - CULTURA DE COTILÉDONES ISOLADOS

Inicialmente, foi feita uma avaliação do crescimento dos cotilédones nos sistemas de cultura, na presença de três fontes de nitrogênio, Glutamina (GLN), Asparagina (ASN) e Alantoína (ALN). Foram utilizados, além do tratamento sem nitrogênio (S/N), os controles : dia zero e "in vivo". No primeiro, os cotilédones foram analisados antes de serem colocados no meio de cultura e no segundo os cotilédones foram mantidos na planta durante o período experimental de 7 dias e então analisados.

As variações em peso de matéria fresca, peso de matéria seca, proteínas e aminoácidos livres de cotilédones cultivados "in vitro" encontram-se na tabela 1 e figuras 3 e 4.

TABELA 1: EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO AO MEIO DE CULTURA SOBRE PESO DA MATÉRIA SECA, TEOR DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS LIVRES DE COTILÉDONES IMATUROS DE SOJA CULTIVADOS POR 7 DIAS

TRATAMENTOS	peso seco mg/cot	proteína mg/cot	A.A.livres umol/cot
Dia zero ²	9,7 ^{c*}	1,6 ^b	1,24 ^a
S/N	20,5 ^b	1,7 ^b	0,70 ^e
GLN	28,0 ^a	5,7 ^a	12,01 ^b
ASN	25,8 ^a	4,4 ^a	4,32 ^c
ALN	21,1 ^b	2,3 ^b	1,82 ^d
IN VIVO ³	27,0 ^a	5,3 ^a	1,30 ^a

- (1) * As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.
- (2) Valores obtidos antes de colocar os cotilédones no meio de cultura;
- (3) Valores obtidos após 7 dias de desenvolvimento dos cotilédones presos à planta.

Pode-se observar que houve aumento de peso de matéria fresca e seco (Figura 3) em todos os tratamentos quando se compara com o dia zero. O aumento em peso de matéria seca foi maior nos tratamentos com GLN e ASN, atingindo valores que se igualaram estatisticamente aos dos cotilédones que se desenvolveram na planta ("in vivo"). O crescimento dos cotilédones dos tratamentos S/N e ALN foi semelhante, não diferindo estatisticamente e foi inferior ao dos tratamentos com GLN e ASN. O aumento em matéria seca observado no tratamento S/N pode ser um reflexo da utilização da sacarose do meio. Embora cotilédones cultivados em meio sem nitrogênio tenham aumentado em peso de matéria seca, não foi observado aumento em teor de proteínas em relação ao dia zero (Figura 4). Isto confirma que proteínas não foram acumuladas e sugere que este incremento em peso de matéria seca pode ter resultado de um aumento em carboidratos e/ou lipídios.

Quando GLN e ASN foram adicionados ao meio, foi observado um aumento no teor de proteínas de cerca de 3 vezes, correspondendo às concentrações encontradas em cotilédones desenvolvidos "in vivo". No caso de ALN, porém, não foi observado incremento significativo no teor de proteínas em relação ao dia zero e ao tratamento S/N.

O total de aminoácidos livres presentes nos cotilédones, no final do período experimental diminuiu, em relação ao dia zero e ao tratamento "in vivo", quando os cotilédones foram cultivados sem nitrogênio no meio de cultura e aumentou na sua pre-

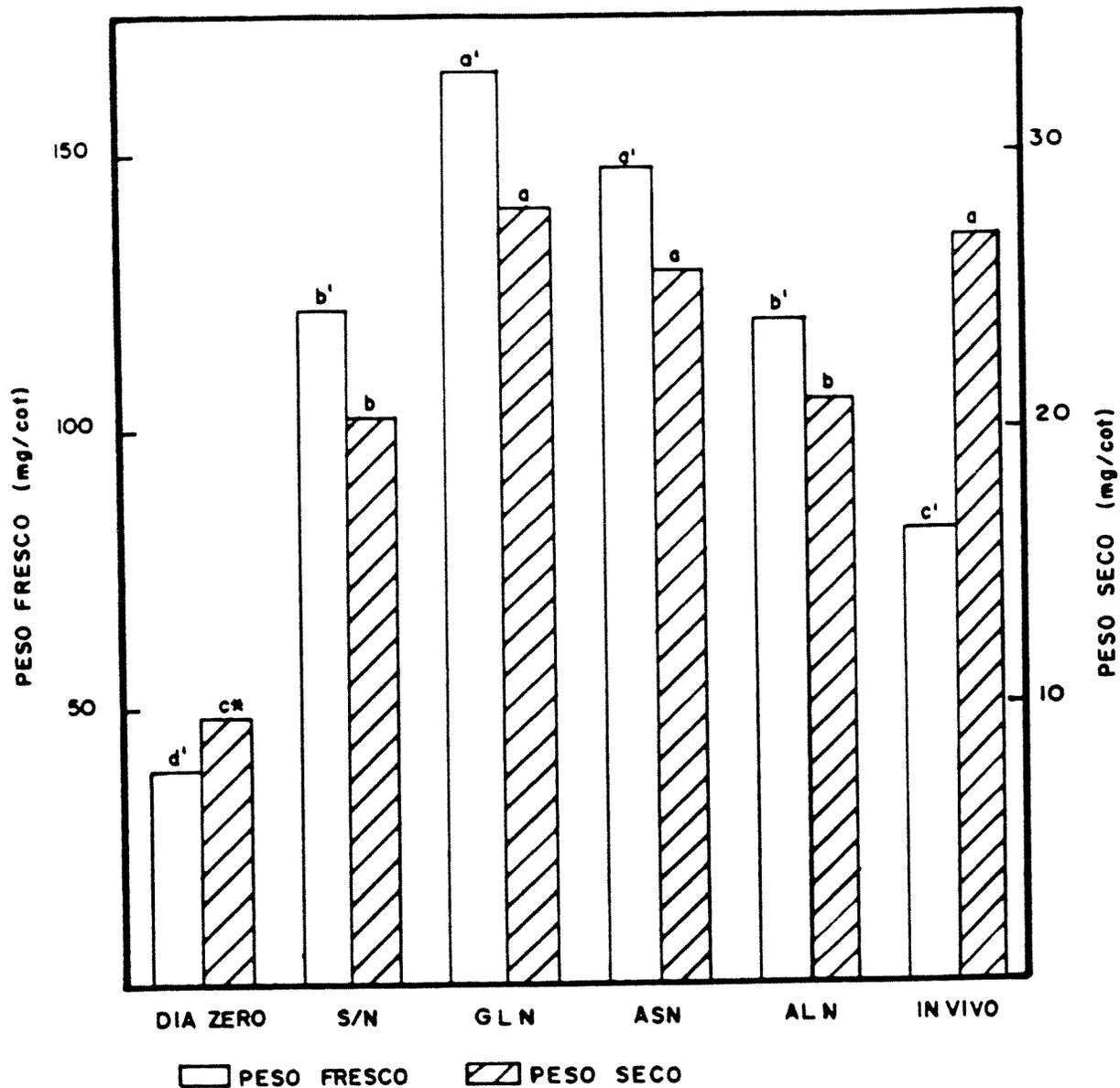


FIGURA 3 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento de cotilédones imaturos de soja, cultivados "in vitro" por 7 dias

Os tratamentos estão descritos na Tabela 1. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

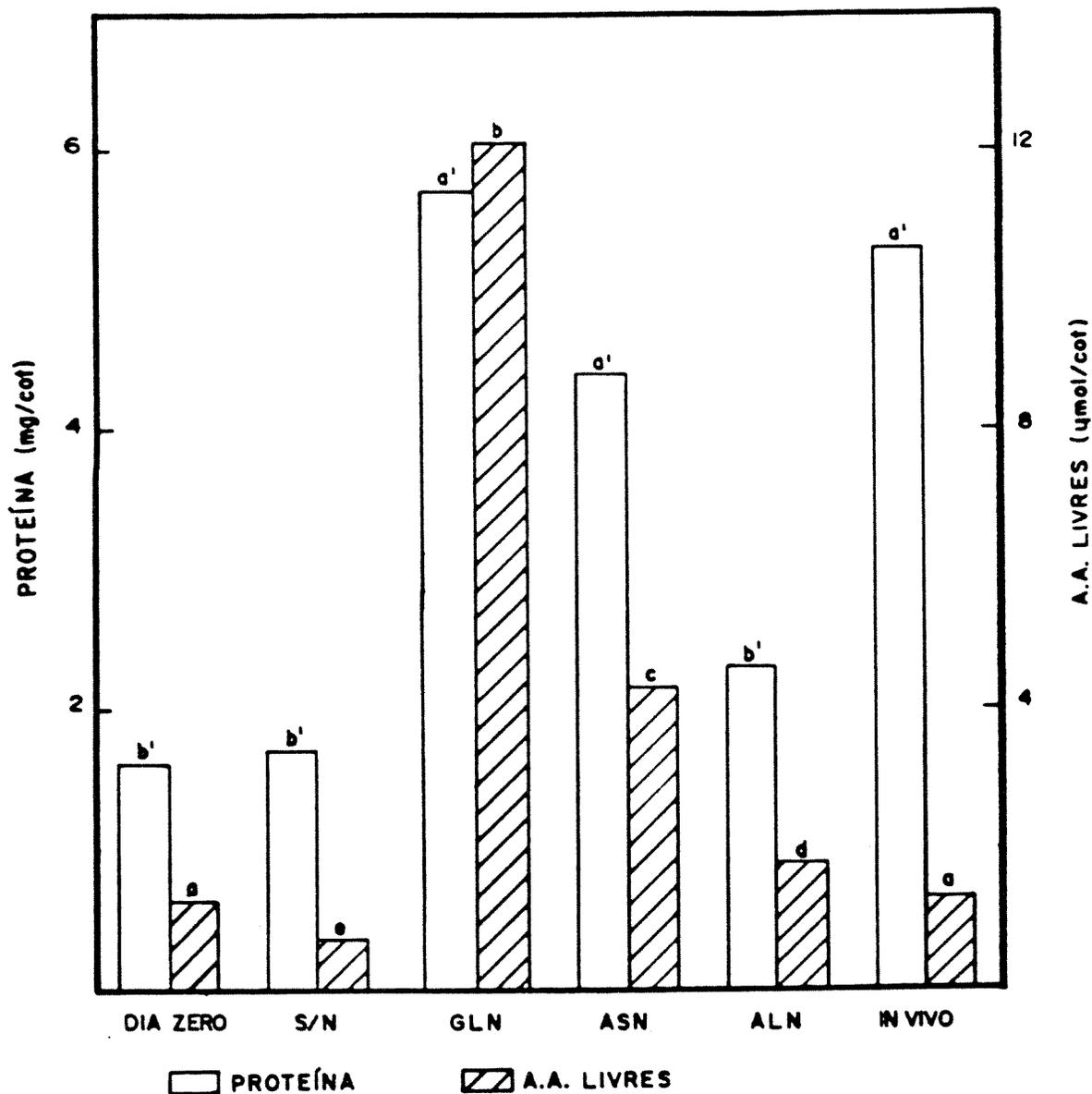


FIGURA 4 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre o teor de proteínas e aminoácidos livres totais de cotilédones imaturos de soja, cultivados "in vitro" por 7 dias.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

sença. Entretanto, este incremento variou muito, dependendo da fonte de nitrogênio suplementada. Quando GLN foi a fonte de nitrogênio, o teor de aminoácidos totais foi 3 vezes superior àquele observado no tratamento com ASN. Esta diferença não se deve somente à presença da GLN livre, pois verifica-se que o teor de todos os outros aminoácidos (Tabela 2a) superou àquele encontrado quando a fonte de nitrogênio foi a ASN. Embora o aumento em teor de proteínas nos cotilédones cultivados S/N (ca. 100 ug) não tenha sido significativo estatisticamente, foi compatível com o decréscimo do teor dos aminoácidos livres (ca.54 ug) quando comparados com o controle dia zero.

A análise do teor de aminoácidos livres (nmol/cot), determinados por HPLC, dos cotilédones isolados mantidos em cultura (tabela 2a e 2b), mostrou que no tratamento S/N houve um consumo significativo de vários aminoácidos, um aumento em alguns, enquanto outros mantiveram seu nível inicial em relação ao dia zero. Destaca-se o consumo de ASN (87,9%), GABA (80,5%), e SER (100%), o aumento em GLU de 2 vezes e o aparecimento de PHE quando se compara com o controle dia zero.

No tratamento com GLN, o teor de todos os aminoácidos aumentou, sendo mais acentuado o aumento de ARG (ca. 26x), ALA (ca. 14x) e GLU (ca. 11x), enquanto que com ASN como fonte de nitrogênio, os níveis desses aminoácidos aumentaram em menor proporção (GLU-3,6x, ALA-1,3x), ocorrendo uma queda de 28,3% da ARG, comparando-se com o dia zero. Nesse tratamento ocorreu ainda o desaparecimento de SER, GLY e PRO embora o valor inicial já não

TABELA 2a: AMINOACIDOS LIVRES DE COTILEDONES IMATUROS DE SOJA CULTIVADOS "in vitro" EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

AMINO ÁCIDOS	TEOR DE AMINOACIDOS (mol%)					
	DIA ZERO ¹	S/N	GLN	ASN	ALN	IN VIVO ²
ASN	42,4	9,1	9,3	78,3	2,9	24,4
GLN	nd ³	nd	39,7	nd	2,3	nd
ASP	2,8	3,4	2,2	1,2	15,0	1,9
SER	2,4	nd	nd	nd	10,2	nd
GLU	6,6	23,4	8,3	6,8	24,6	30,3
GLY	5,6	7,5	1,2	nd	6,2	4,1
ARG	6,4	13,0	16,9	1,3	5,1	2,5
ALA	9,7	13,8	14,4	3,7	4,1	18,5
GABA	16,3	5,6	5,1	4,3	17,8	8,6
PRO	1,8	6,7	1,0	< 1	3,0	2,7
VAL	2,2	5,7	1,9	1,1	3,4	2,4
PHE	nd	4,9	nd	nd	nd	nd
LYS	3,9	8,6	2,3	2,5	8,9	4,7

Obs.: Amônia livre (NH₃) foi detectada em todos os tratamentos, alcançando um valor 10 vezes maior (em área) quando se compara alantoina com o padrão.

- (1) Valores obtidos antes de colocar os cotilédones no meio de cultura;
- (2) Valores obtidos após 7 dias de desenvolvimento dos cotilédones presos à planta.
- (3) nd = não detectado

TABELA 2b: AMINOÁCIDOS LIVRES DE COTILÉDONES IMATUROS DE SOJA CULTIVADOS "in vitro" EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.

AMINO ACIDOS	TEOR DE AMINOÁCIDOS (nmol/cot.)					
	DIA ZERO ¹	S/N	GLN nMOL/cot	ASN	ALN	IN VIVO ²
ASN	526,0	63,7	1116,9	3382,0	52,4	317,1
GLN	nd ³	nd	4770,4	nd	41,7	nd
ASP	34,6	23,5	264,2	50,5	273,7	25,2
SER	29,4	nd	nd	nd	186,2	nd
GLU	81,7	163,9	993,2	292,9	447,7	394,0
GLY	69,4	52,3	141,7	nd	112,7	53,6
ARG	78,9	90,8	2032,1	56,6	92,5	32,1
ALA	120,8	96,8	1723,4	161,1	71,4	240,1
GABA	201,5	39,3	606,5	187,5	324,3	112,3
PRO	22,6	46,9	124,9	nd	54,2	34,5
VAL	26,7	40,1	228,2	45,4	62,6	30,6
PHE	nd	34,2	nd	nd	nd	nd
ILE+LEU	< 1	< 1	nd	nd	nd	nd
LYS	48,6	60,4	275,0	108,9	161,3	60,8

Obs.: Amônia livre (NH₃) foi detectada em todos os tratamentos, alcançando um valor 10 vezes maior (em área) quando se compara alantoina com o padrão.

- (1) Valores obtidos antes de colocar os cotilédones no meio de cultura;
- (2) Valores obtidos após 7 dias de desenvolvimento dos cotilédones presos à planta.
- (3) nd = não detectado

fosse alto. É interessante observar que enquanto GABA aumentou de 3 vezes no tratamento com GLN, houve pouca mudança no tratamento com ASN. Outra diferença entre os tratamentos foi em relação ao teor de ASP que aumentou apenas de 1,5 vezes no tratamento com ASN enquanto que com GLN esse aumento foi cerca de 8 vezes.

No tratamento com ALN, foi detectada GLN nos cotilédones, o que não foi observado nos outros tratamentos, a não ser quando GLN estava presente no meio de cultura. Foi observado ainda, queda no nível de ASN (90%) e ALA (40,9%) e um grande aumento de ASP (8x), SER (ca. 6x), GLU (5,5x) e LYS (ca. 3x). Embora ALN não tenha sido uma fonte de nitrogênio eficiente para síntese de proteínas, de alguma forma serviu como fonte para síntese e/ou interconversão dos aminoácidos livres. Amônia livre (NH_4^+) foi detectada em todos os tratamentos, principalmente quando ALN foi a fonte de nitrogênio, alcançando um valor 10 vezes maior (dados não apresentados) quando se compara com o padrão.

Quando se analisa o teor dos aminoácidos livres dos cotilédones das diferentes fontes de nitrogênio com relação àqueles desenvolvidos na planta ("in vivo"), pelo mesmo período, observa-se também diferenças significativas. A fonte que mais afetou os níveis dos aminoácidos foi mesmo GLN onde o teor de todos os aminoácidos superou àqueles de sementes desenvolvidas na planta. Quando a fonte de nitrogênio foi a ASN, enquanto ocorreu aumento de GLU de 3,6 vezes e de ALA 1,3 vezes, quando se compara com o dia zero, observou-se que o aumento desses mesmos aminoácidos (4,8x e ca.2x, respectivamente) foi maior quando os cotilédones

desenvolveram "in vivo". GLY e PRO foram totalmente metabolizados nesse tratamento, enquanto "in vivo" ocorreu um consumo de apenas de 22,8% de GLY e um aumento de 1,5 vezes de PRO. No caso de ALN como fonte, observou-se que a síntese de ASP foi bastante estimulada nesse tratamento (ca.8x) enquanto que nas sementes desenvolvidas na planta esse aminoácido diminuiu seu nível em 27,2%. É interessante observar que SER não acumula em cotilédones crescidos "in vivo" e em nenhum dos tratamentos, porém na presença de ALN sua síntese é estimulada.

A maior quantidade de ASN, GLU e ALA no "pool" dos aminoácidos de cotilédones crescidos "in vivo", sugere que estes devem estar ativamente envolvidos na síntese de proteínas de reserva durante o estágio de maturação das sementes. Isto é bastante coerente uma vez que ASN é o aminoácido transportado em maior abundância e GLU e ALA são os principais aminoácidos envolvidos em reações de transaminação e portanto os intermediários na transferência de N entre ASN e outros aminoácidos.

Para o cálculo das massas moleculares aparentes das diferentes subunidades das proteínas de reserva, por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol (PAGE-SDS), foram aplicadas amostras do extrato total liofilizado de sementes quiescentes e padrões de massas moleculares conhecidas (Figura 5). A partir da curva resultante (Figura 6), as massas moleculares aparentes dessas subunidades foram os seguintes: α' = 82 KDa, α = 76 KDa, β = 53 KDa, Ácidas = 43 KDa e

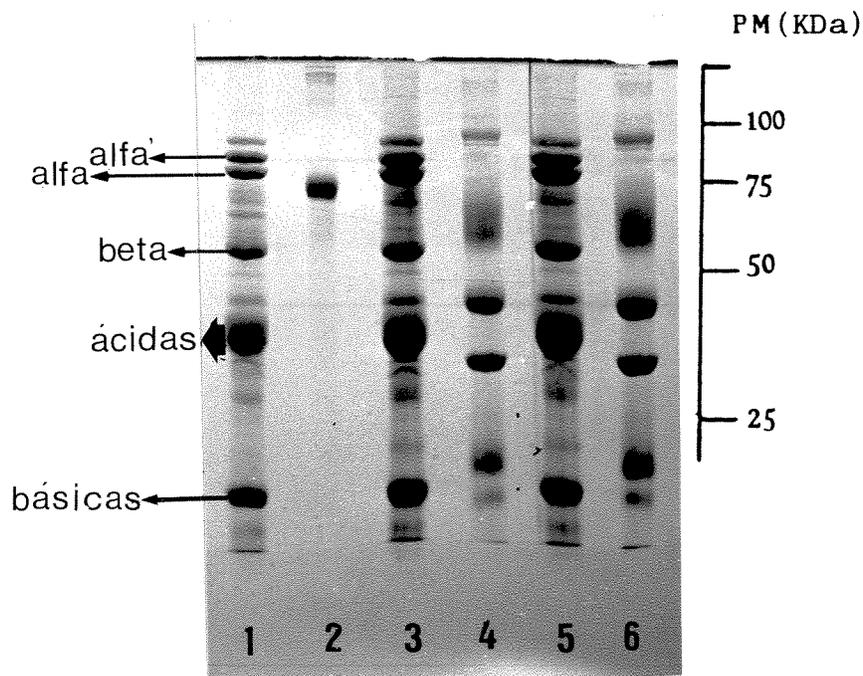


FIGURA 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol (PAGE-SDS) de extratos liofilizados (5 mg/ml) de sementes quiescentes de soja e padrões de pesos moleculares.

Amostras: 1,3,5- Extrato total de sementes quiescentes;
 2- BSA; 4,6- padrões (fosforilase b - 94 KDa,
 BSA - 67 KDa, ovoalbumina - 43 KDa, anidrase
 carbônica - 30 KDa, inibidor de tripsina de
 soja - 20,1 KDa,

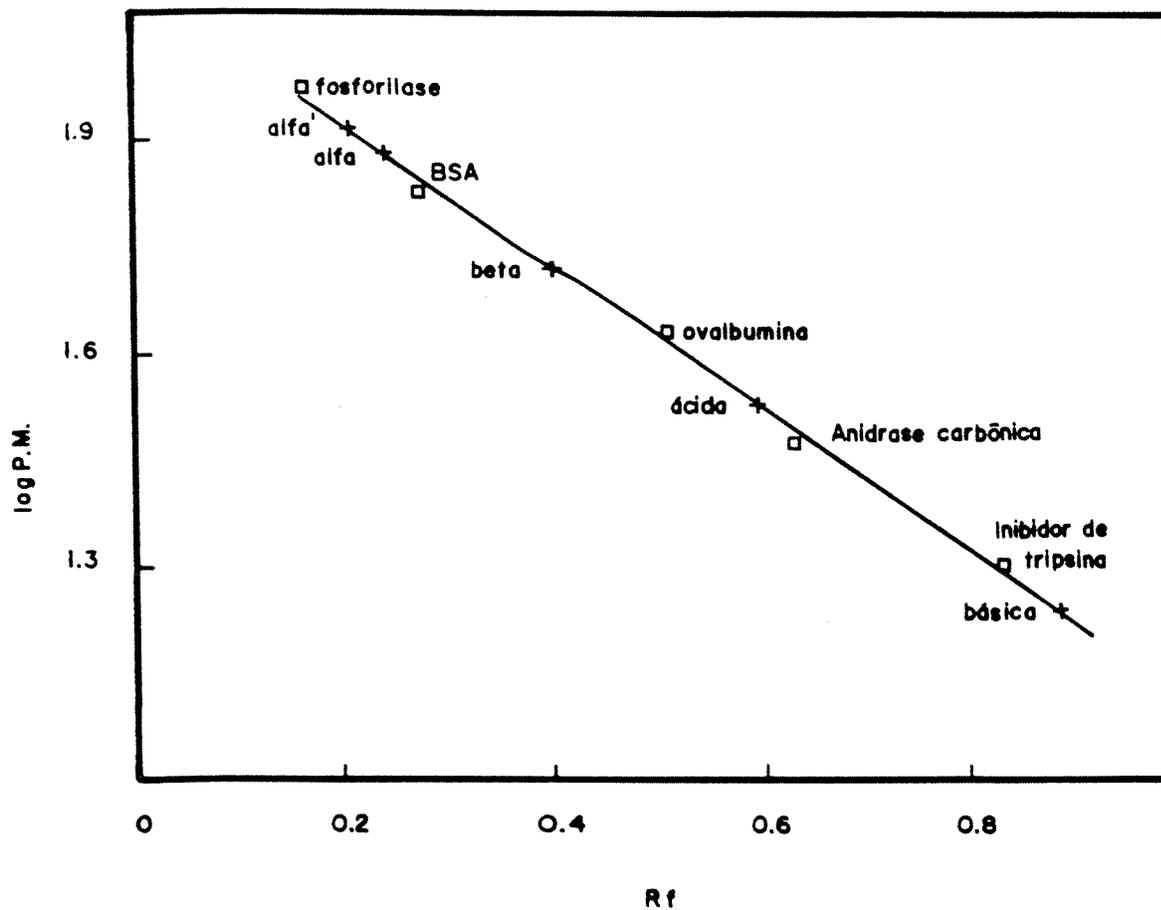


FIGURA 6 - Massas moleculares relativas das diferentes subunidades das proteínas de reserva de soja determinadas por PAGE-SDS

34 KDa (A₁ e A₂ respectivamente) e Básicas (Ba) = 17 KDa. Analisando-se dados da literatura, os pesos moleculares das diferentes subunidades das proteínas de reserva de soja estão bem próximos aos encontrados no presente trabalho. Esses valores variaram entre 76 e 83 KDa para a subunidade alfa', entre 72 e 78 KDa para a subunidade alfa, entre 51 e 53 KDa para a subunidade beta, entre 37 e 45 KDa para as subunidades ácidas e entre 17 e 22 KDa para as subunidades básicas (MOREIRA, et al., 1979; BEACHY, 1980; MOREIRA et al., 1981; HOLOWACH et al., 1984; BRAY & BEACHY, 1985; EINSENBURG & MASCARENHAS, 1985; SATHE, 1991.

As proteínas de reserva dos cotilédones cultivados "in vitro" foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol (Figura 7). Nos cotilédones inoculados no meio de cultura (dia zero, peso de matéria fresca entre 40 e 55 mg) foram encontrados as subunidades alfa' e alfa da fração 7S e uma menor quantidade das subunidades básicas da fração 11S (Figura 7). As subunidades ácidas dessa fração foram fracamente detectadas e a subunidade beta não foi detectada na fração 7S nesse estágio. Durante o desenvolvimento dos cotilédones "in vitro", com ASN e GLN como fonte de nitrogênio, as subunidades das proteínas de reserva da fração 7S foram sintetizadas com mais eficiência do que nas sementes desenvolvidas na planta pelo mesmo período. Pode-se observar na Figura 7 que a subunidade beta nesses tratamentos foi sintetizada, enquanto que nas sementes desenvolvidas "in vivo" apenas fracamente detectada. A síntese da subunidade beta ocorreu mais rapidamente quando os cotilédones

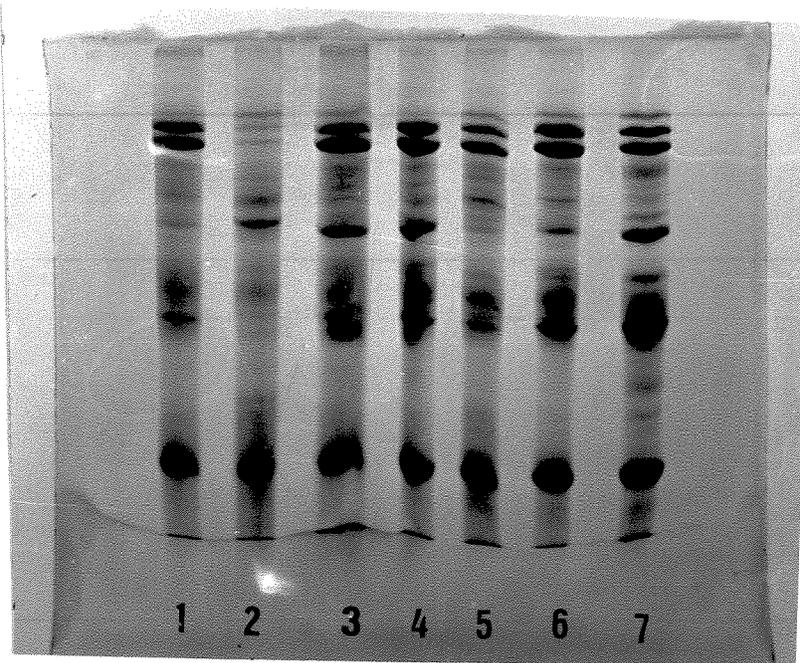


FIGURA 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol de extratos liofilizados (5mg/ml) de cotilédones imaturos de soja mantidos em cultura com diferentes fontes de nitrogênio. Foram aplicados 10 ul de cada amostra.

Amostras: 1- Dia Zero; 2- S/N; 3- ASN; 4- GLN; 5- ALN;
6- "In Vivo"; 7- Quiescente.

criaram no meio de cultura do que quando se desenvolveram na planta. As subunidades da fração 11S desses tratamentos acumularam em comparação ao dia zero, porém cotilédones crescidos em presença de GLN aparentemente acumularam mais subunidades ácidas do que com ASN, igualando-se àqueles crescidos "in vivo".

Como foi observado anteriormente, ALN não é uma fonte de N eficiente para acúmulo de proteínas de reserva em cotilédones isolados crescidos "in vitro". Isso foi confirmado quando estas proteínas foram analisadas por eletroforese. Pode-se observar que aparentemente não há diferenças no padrão eletroforético dessas proteínas quando se compara com as do dia zero. Na presença de ALN não ocorreu síntese da subunidade beta e nem das subunidades ácidas. Também não foi observado acúmulo das subunidades alfa' e alfa ocorrendo, aparentemente, uma diminuição nas suas concentrações. Por outro lado, embora ALN não tenha sido uma fonte de N eficiente para síntese das proteínas de reserva, de alguma maneira ela forneceu nitrogênio e/ou esqueleto carbônico para outros fins, já que não ocorreu, durante o período de cultivo, degradação das subunidades alfa' e alfa da fração 7S, como observada quando os cotilédones foram crescidos na ausência de nitrogênio. Quando nitrogênio foi omitido do meio (Figura 7), os cotilédones foram induzidos a degradar suas proteínas de reserva, preferencialmente as subunidades alfa' e alfa, resultando, com isso, aparecimento de bandas protéicas com massas moleculares menores. Uma dessas bandas tem massa molecular aparente próximo à da subunidade beta, mas é uma proteína distinta da mesma, como será de-

monstrado posteriormente.

4.2.2 - CULTURA DE EXPLANTES.

Nesse sistema de cultura de frutos foram também utilizados como fonte de nitrogênio a GLN, ASN e ALN e os mesmos controles citados anteriormente.

As variações em peso de matéria fresca, peso de matéria seca, proteínas e aminoácidos livres das sementes de explantes encontram-se na Tabela 3 e nas Figuras 8 e 9.

Como pode-se verificar (Figura 8), houve aumento de pesos da matéria seca e fresca em todos os tratamentos em relação ao controle (dia zero). O aumento em peso de matéria seca foi maior no tratamento com ALN, chegando a superar aos das sementes que se desenvolveram na planta. Não foi observado diferença significativa entre os outros tratamentos (GLN, ASN, e S/N) os quais chegaram a se igualar aos das sementes crescidas "in vivo". A maior contribuição para o aumento de peso de matéria seca no tratamento S/N foi, provavelmente, dada pela sacarose do meio que pode ter sido translocada e transformada em outros carboidratos e/ou lipídios, já que o aumento no teor de proteínas foi inferior aos dos outros tratamentos. Este aumento de proteínas observado no tratamento S/N pode ser devido a pré-existência de substâncias nitrogenadas nos caules e vagens que foram translocadas para as

TABELA 3: EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO AO MEIO DE CULTURA, SOBRE PESO DE MATÉRIA SECA, TEOR DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS LIVRES DE SEMENTES DE EXPLANTES DE SOJA CULTIVADOS POR 7 DIAS.

TRATAMENTOS	peso seco ¹ mg/2Cot	proteína mg/2cot	A.A.livres umol/2cot
Dia zero ²	15,5 ^d	1,6 ^e	3,5 ^a
S/N	41,4 ^b	4,4 ^d	1,0 ^d
GLN	47,9 ^a	7,9 ^a	3,5 ^a
ASN	44,8 ^{ab}	7,8 ^a	2,7 ^c
ALN	54,0 ^c	9,9 ^b	3,4 ^a
IN VIVO ³	47,1 ^{ab}	7,3 ^a	5,5 ^b

(1) Dentro de uma mesma coluna, as médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade;

(2) Valores obtidos antes de colocar os cotilédones no meio de cultura;

(3) Valores obtidos após 7 dias de desenvolvimento dos cotilédones presos à planta.

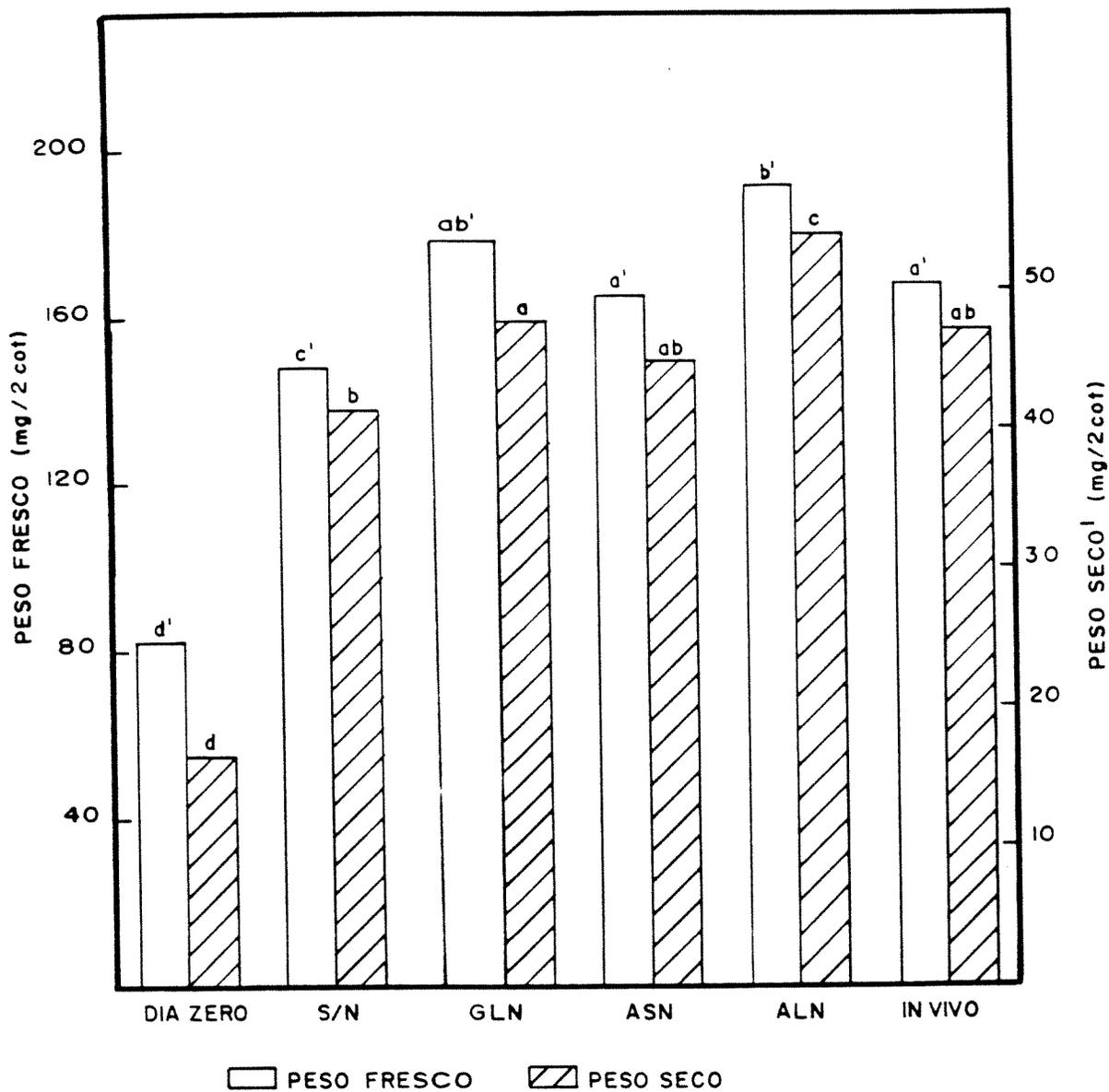


FIGURA 8 - Medidas de peso da matéria fresca e seca em sementes de explantes de soja, mantidos em cultura em diferentes fontes de Nitrogênio.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

sementes, já que segundo MOSQUIM (1989), caules e vagens aparentemente não mobilizam reservas de carboidratos. Um fato interessante a se registrar é que na cultura de explantes a ALN superou a GLN e ASN na produção de proteína, o que não foi observado em cultura de cotilédones isolados, onde a ALN foi uma fonte de nitrogênio ineficiente em relação às amidas. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de THOMPSON et al. (1977), HAGA & SODEK (1987) e MOSQUIM (1989).

Analisando-se sementes de explantes, independentemente da fonte de N, o teor de aminoácidos livres (Tabela 3) além de não atingir o teor encontrado "in vivo", não acumulou como aconteceu com o sistema de cultura de cotilédones isolados. Nesse caso, o sistema está mais próximo do "in vivo", e à medida que ocorre síntese dos aminoácidos estes estão sendo utilizados pelas outras partes do explante. Além disso, nos diferentes tratamentos, a quantidade de aminoácidos não supera àquela encontrada no dia zero, pelo contrário os níveis são até inferiores em alguns casos. Quanto ao tratamento S/N, a queda no nível de aminoácidos livres pode ser explicada em função do aumento do teor de proteínas. Este aumento, que foi aproximadamente 3 vezes maior do que o controle, foi até muito superior ao consumo de aminoácidos. Nesse sistema de cultura, as fontes GLN e ALN, resultaram em níveis de aminoácidos livres um pouco maiores do que ASN (Figura 9).

A análise de aminoácidos livres por HPLC das sementes de explantes mantidos em cultura (TABELA 4 e 4a), mostrou que no tratamento S/N houve consumo de quase todos os aminoácidos, sendo

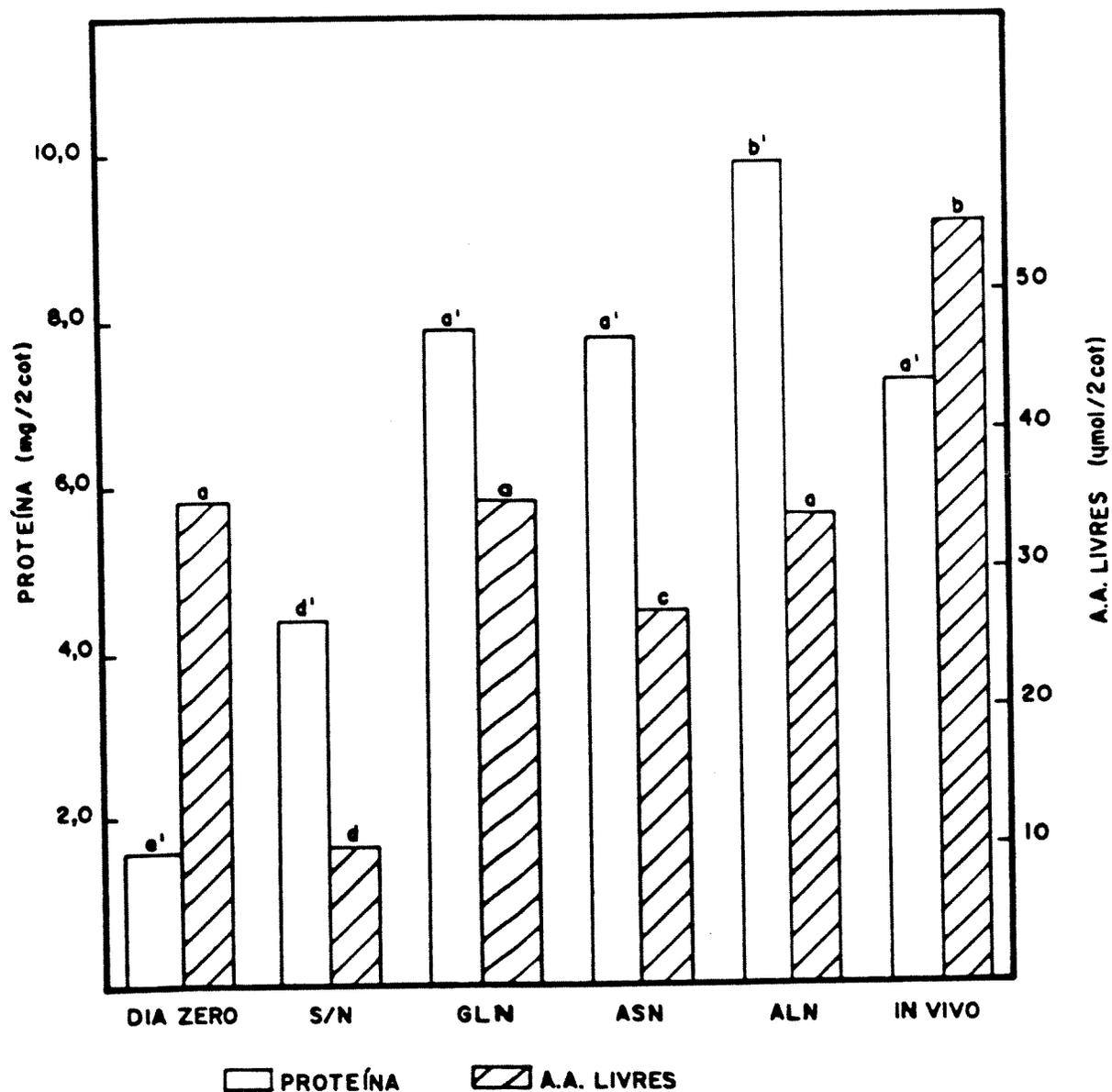


FIGURA 9 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre o teor de proteínas e aminoácidos livres totais de sementes de explantes de soja cultivados "in vitro".

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

mais significativo para ASN que apresentou uma queda superior a 90% além de ser o principal aminoácido no dia zero (68%). Outros aminoácidos como ALA, SER e ARG também mostraram quedas bastante acentuadas, embora os valores iniciais já fossem relativamente baixos. Porém, houve um aumento de GLY de 1,7 vezes quando se compara com o controle dia zero. Nesse sistema de cultura, o teor de ARG não aumentou no tratamento com GLN como foi observado em cultura de cotilédones isolados. Ao contrário, houve um consumo de 53% em relação ao controle dia zero. Esse aminoácido também diminuiu (71,7%) quando ASN foi a fonte de nitrogênio. É interessante observar que mesmo fornecendo ASN como fonte de nitrogênio não ocorreu acúmulo desse aminoácido, ao contrário, houve consumo de 54,6%, equivalente ao consumo (60,0%) no tratamento com GLN comparando-se com o dia zero. No caso de ALN foi observado decréscimo de ASN (50,6%), ARG (48,2%) e ASP (47,0%) e um aumento significativo de GLU (ca. 3 X), que foi equivalente ao aumento observado (3,9 X) quando GLN foi a fonte de nitrogênio. O aumento de GABA (70%) superou àquele observado nas outras fontes de nitrogênio quando se compara com o controle dia zero. Nesse sistema de cultura não foi observado acúmulo de ASP e nem foi detectada GLN livre na semente como observado no sistema de cultura de cotilédones isolados no tratamento com ALN.

Amônia livre foi detectada em todos os tratamentos, sendo que, nesse sistema, a liberação foi maior no tratamento com ASN.

TABELA 4a: AMINOÁCIDOS LIVRES DE COTILÉDONES DE EXPLANTES DE SOJA MANTIDOS EM MEIO DE CULTURA CONTENDO DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

AMINO ÁCIDOS	TEOR DE AMINOÁCIDOS (MOL%)					
	DIA ZERO ¹	S/N	GLN	ASN	ALN	IN VIVO ²
ASN	67,9	13,2	27,1	40,0	34,5	52,2
GLN	nd ³	nd	nd	nd	nd	nd
ASP	3,3	2,9	2,9	5,3	1,8	4,2
SER	4,0	nd	5,5	5,7	5,6	5,8
GLU	10,7	45,9	41,6	25,8	35,4	21,1
GLY	1,3	7,6	2,2	1,9	2,0	1,9
ARG	3,0	5,2	1,4	1,1	1,6	2,3
ALA	3,5	4,7	5,9	4,1	4,0	3,7
GABA	6,0	11,3	7,6	10,3	10,5	5,0
PRO	1,0	4,8	1,8	1,3	1,5	1,0
VAL	1,5	4,2	1,5	1,6	1,1	1,4
PHE	nd	nd	< 1	1,1	nd	nd
LYS	1,8	3,2	2,5	2,3	2,1	1,6

Obs.: Amônia foi detectada em todos os tratamentos, chegando a se comparar ao teor de ASN nos cotilédones crescidos em ASN e aproximadamente dez vezes maior no tratamento S/N.

- (1) Valores obtidos antes de colocar os cotilédones no meio de cultura;
- (2) Valores obtidos após 7 dias de desenvolvimento dos cotilédones presos à planta.
- (3) nd = não detectado

TABELA 4b: AMINOÁCIDOS LIVRES DE COTILÉDONES DE EXPLANTS DE SOJA MANTIDOS EM MEIO DE CULTURA CONTENDO DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

AMINO ÁCIDOS	TEOR DE AMINOÁCIDOS (nmol/2cot.)					
	DIA ZERO ¹	S/N	GLN	ASN	ALN	IN VIVO ²
ASN	2376,5	132,0	748,5	1080,0	1173,0	2871,0
ASP	115,5	29,0	101,5	143,1	61,2	231,0
SER	140,0	nd ³	192,5	153,9	190,4	319,0
GLU	374,5	459,0	1456,0	696,6	1203,6	1160,5
GLY	45,5	76,0	77,0	51,3	68,0	104,5
ARG	105,0	52,0	49,0	29,7	54,4	126,5
ALA	122,5	47,0	206,5	110,7	136,0	203,5
GABA	210,0	113,0	266,0	278,1	357,0	275,0
PRO	35,0	48,0	63,0	35,1	51,0	55,0
VAL	52,5	42,0	52,5	43,2	37,4	77,0
PHE	nd	nd	nd	29,7	nd	nd
LYS	63,0	32,0	87,5	62,1	71,4	88,0

Obs.: Amônia foi detectada em todos os tratamentos, chegando a se comparar ao teor de ASN nos cotilédones crescidos em ASN e aproximadamente dez vezes maior no tratamento S/N.

- (1) Valores obtidos antes de colocar os cotilédones no meio de cultura;
- (2) Valores obtidos após 7 dias de desenvolvimento dos cotilédones presos à planta.
- (3) nd = não detectado

Quando se compara o teor dos aminoácidos livres das sementes desenvolvidas na planta com os tratamentos, observa-se que o nível de todos os aminoácidos nos diferentes tratamentos, com exceção do ácido glutâmico, não supera àquele observado nas sementes crescidas "in vivo". A diferença mais notável foi em relação a ARG, onde o seu nível decresceu nas diferentes fontes de nitrogênio em relação ao dia zero, enquanto que na planta o seu teor aumentou de 20,5%.

As proteínas de reserva de cotilédones de explantes foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol (Figura 10). Comparando-se os diferentes tratamentos com o dia zero, pode-se observar que houve acúmulo das subunidades alfa' e alfa das conglucinininas (7S) em todos os tratamentos. Este acúmulo foi menor nas sementes crescidas sem a fonte de nitrogênio. Nestas condições a subunidade beta só foi fracamente detectada, enquanto que na presença de uma fonte de nitrogênio, essa subunidade foi sintetizada a níveis comparáveis com aquelas de sementes desenvolvidas na planta, durante o período experimental. Em relação às subunidades das glicinininas (11S) o acúmulo em sementes de explantes foi menor comparando-se com os outros tratamentos. As subunidades ácidas e básicas nas três fontes de nitrogênio, foram sintetizadas a níveis comparáveis aos das sementes crescidas "in vivo".

O sistema de cultura de explantes mostrou-se bastante eficiente para síntese de proteínas de reserva tendo como fonte de nitrogênio ALN, ASN e GLN.

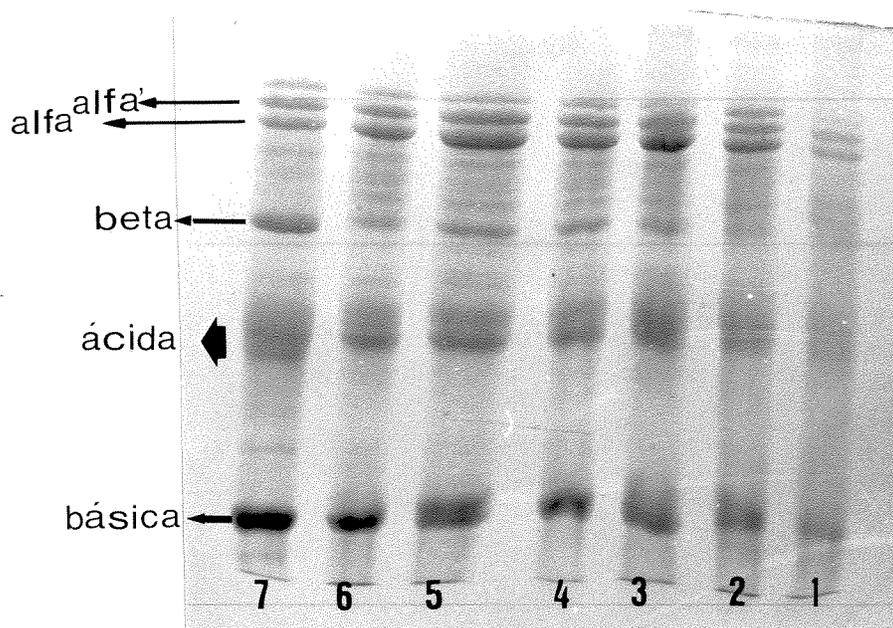


FIGURA 10- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol de extratos liofilizados (5mg/ml) de sementes de explantes de soja mantidos em cultura com diferentes fontes de nitrogênio. Foram aplicados 10 ul de cada amostra

Amostras: 1- Dia Zero; 2- S/N; 3- ALN; 4- ASN; 5- GLN;
6- "In Vivo"; 7- Quiescente.

4.3 - EFEITO DA FONTE DE ENXOFRE.

4.3.1 - CULTURA DE COTILÉDONES.

Neste experimento foi medido o efeito da adição de metionina e/ou ausência de sulfato no meio no crescimento de cotilédones isolados de soja cultivados "in vitro". Em todos os tratamentos GLN foi utilizada como fonte de nitrogênio.

Pelos resultados da tabela 5 e Figuras 11 e 12, pode-se observar que os cotilédones cresceram em relação ao controle dia zero.

Comparando-se os outros tratamentos com o meio básico (MB) pode-se observar que a suplementação de MET favoreceu mais o aumento do peso de matéria fresca (30% e 21%) do que o aumento em peso de matéria seca (16% e 13%). Isto pode indicar que a suplementação de MET aumentou a absorção e retenção de água mais do que o acúmulo de matéria seca. Não foi observada inibição do crescimento quando MET estava no meio deficiente de sulfato (MB-S+MET), ao contrário houve aumento em peso de matéria fresca, peso de matéria seca, proteínas e aminoácidos livres relativos ao meio básico. Isto demonstrou que metionina pode substituir sulfato como única fonte de enxofre e que o enxofre da metionina foi provavelmente mais rapidamente incorporado em outros compostos do que quando enxofre na forma de sulfato. O mesmo foi observado em cotilédones crescidos em meio com sulfato suplementado com MET

TABELA 5: EFEITO DA ADIÇÃO DE METIONINA NO MEIO DE CULTURA SOBRE O CRESCIMENTO, TEOR DE PROTEÍNAS E DE AMINOÁCIDOS LIVRES DE COTILÉDONES IMATUROS DE SOJA CULTIVADOS "IN VITRO".

TRATAMENTOS ¹	peso fresco mg/cot	peso seco mg/cot	proteína mg/cot	A.A.livres umol/cot
Dia zero	49,5e*	13,9 ^d	2,70 ^d	0,75 ^c
MB	283,0 ^b	42,4 ^c	10,34 ^c	32,49 ^b
MB + MET	343,0 ^a	48,0 ^a	11,70 ^b	54,87 ^a
(MB-S)+ MET	369,0 ^a	49,3 ^a	11,59 ^b	54,98 ^a
MB - S	202,0 ^c	30,6 ^b	4,43 ^a	34,39 ^b
IN VIVO	83,0 ^d	28,6 ^b	4,71 ^a	1,30 ^c

* Dentro de uma mesma coluna, as médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

(1) Dia zero (vide tabela 1); MB = meio básico contendo GLN como fonte de nitrogênio; MB+MET = meio básico mais metionina; MB-S+MET = meio básico sem enxofre mais metionina; MB-S = meio básico sem enxofre; "IN VIVO" (vide tabela 1).

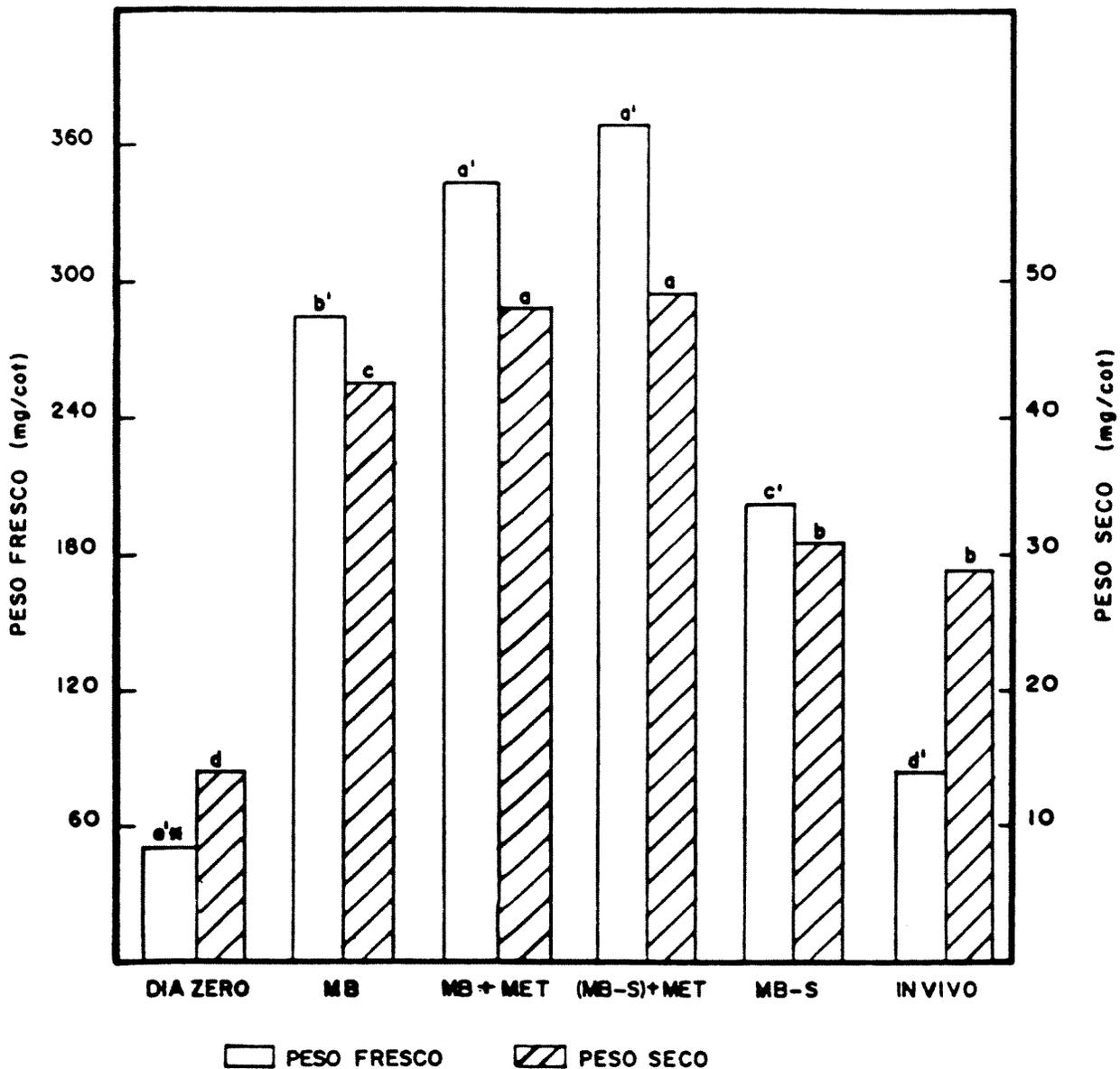


FIGURA 11- Efeito da metionina no crescimento de cotilédones imaturos de soja, cultivados "in vitro" por 7 dias.

Os tratamentos estão descritos na Tabela 5.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

(MB+MET). Não foi observado diferenças estatísticas entre esses dois tratamentos .

Cotilédones crescidos em meio deficiente em enxofre (MB-S), tiveram 71,4% do peso de matéria fresca e 72% do peso de matéria seca dos cotilédones crescidos com sulfato (MB). Neste tratamento, o teor de proteínas decresceu de 57% em relação ao meio básico, mas ainda assim alcançando o teor de proteínas das sementes desenvolvidas na planta pelo mesmo período.

Na determinação dos teores de aminoácidos livres totais, a presença de MET contribuiu para a síntese e/ou interconversão de outros aminoácidos. Este aumento não deve-se somente à presença de MET livre nos cotilédones, pois observando a tabela 6a, pode-se notar que o nível de todos os aminoácidos superou aquele do meio básico. Como será demonstrado posteriormente, a subunidade beta das conglucinininas (7S) não foi sintetizada na presença de MET, e isto pode ter contribuído para o aumento do teor de aminoácidos livres. Na ausência total de enxofre (MB-S), apesar do teor de proteínas ter decrescido em relação ao meio básico, não houve diferenças estatísticas no nível dos aminoácidos livres.

Pela análise dos aminoácidos livres por HPLC (Tabela 6a e 6b), pode-se observar que a fração de aminoácidos livres dos cotilédones em meio básico não continha quantidades detectáveis de metionina. Entretanto, com a suplementação de metionina ao meio, sua concentração aumentou, indicando que esse aminoácido foi rapidamente absorvido pelos cotilédones em desenvolvimento.

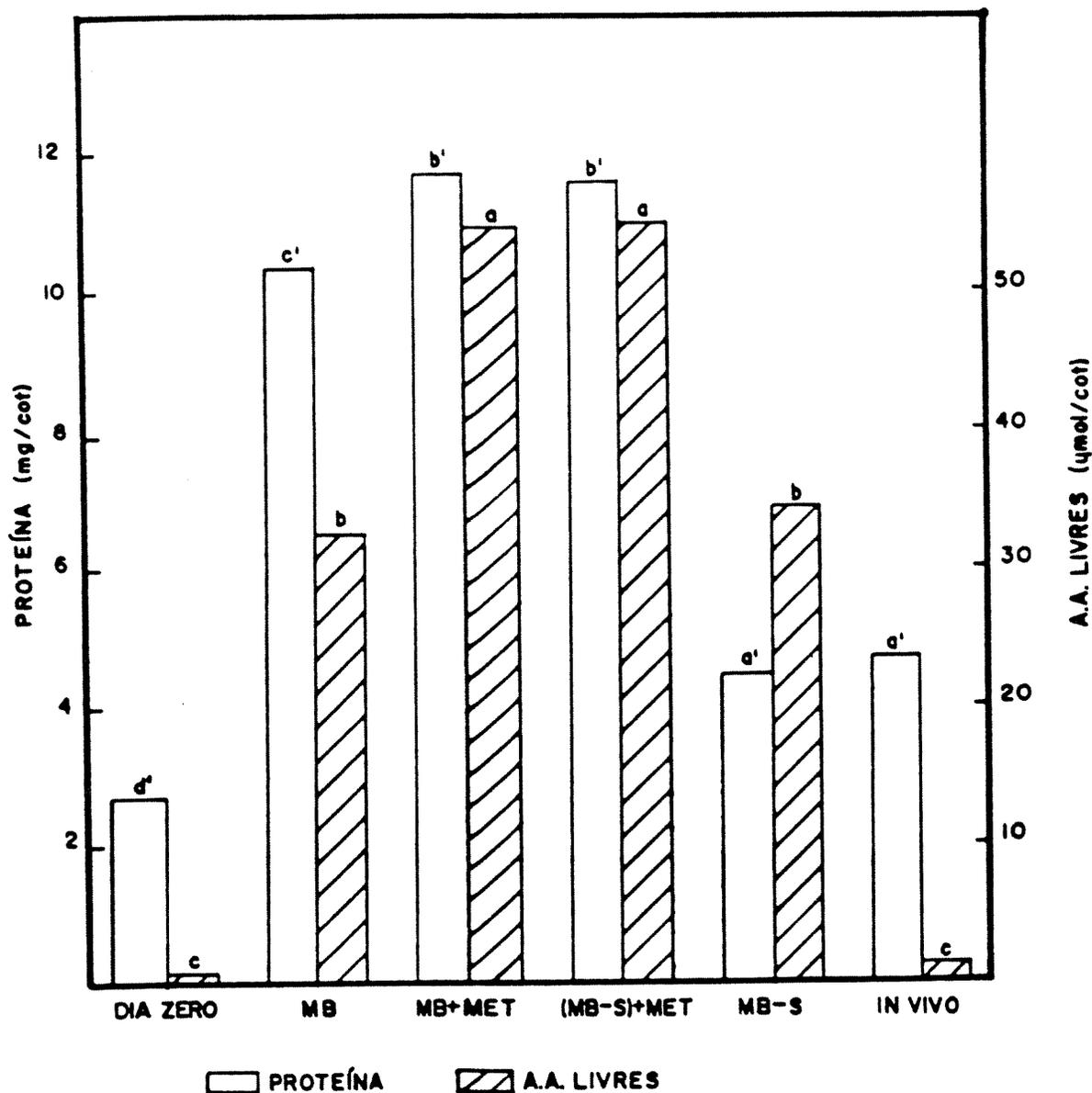


FIGURA 12 - Efeito da metionina sobre o teor de proteínas e aminoácidos livres totais de cotilédones imaturos de soja cultivados "in vitro" por 7 dias.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

Em todos os tratamentos, o nível da maioria dos aminoácidos aumentou em relação ao dia zero. Porém, o baixo teor de GLY e PRO observado no dia zero decresceu a níveis não detectáveis nos diferentes tratamentos, mas acumulou em sementes desenvolvidas na planta. Foi observado acúmulo de GABA nos tratamentos em que havia enxofre (MB e MB+MET), enquanto na sua ausência, mesmo suplementado com metionina, esse aminoácido foi consumido. A concentração de muitos aminoácidos, especialmente ALA, LYS, SER, VAL e GLU, aumentou com a presença de Metionina (MB+MET e MB-S+MET). O aumento observado no teor de ARG em todos os tratamentos foi mais acentuado à medida que os cotilédones foram mantidos em ausência total de enxofre. A ausência de sulfato no meio provocou um aumento de 2,6 vezes (MB-S) e de 1,7 vezes (MB-S+MET) no nível de ARG, enquanto que com a simples suplementação de MET ao meio básico esse aumento foi apenas de 9,1%.

Cotilédones crescidos em meio deficiente em enxofre (MB-S) revelaram outros efeitos na composição dos aminoácidos livres. Foi observado o aparecimento de SER, um aumento de 1,5 vezes de LYS e um decréscimo de ALA (73,9%), VAL (35,6%) e em menor proporção de ASN (22,7%), ASP (9,6%) e GLU (8%), comparando-se com o meio básico.

Como observado anteriormente, as subunidades das frações 7S e 11S das proteínas de reserva de cotilédones cultivados em meio básico por 7 dias, foram sintetizadas indistintamente das subunidades sintetizadas em sementes desenvolvidas na planta, quando comparadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com

TABELA 6a: AMINOÁCIDOS LIVRES DE COTILEDONES IMATUROS DE SOJA CULTIVADOS "in vitro" EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE METIONINA

AMINO ÁCIDOS	TEOR DE AMINOÁCIDOS (MOL%)					IN VIVO
	DIA ZERO	MB	MB+MET	MB-S+MET	MB-S	
ASN	46,1	8,9	5,9	6,2	6,5	10,5
GLN	nd ²	42,6	27,8	27,2	41,1	nd
ASP	4,3	4,1	3,0	3,5	3,5	7,2
SER	4,8	< 1	1,9	1,5	1,7	3,8
GLU	24,4	12,1	11,2	10,4	10,5	51,1
GLY	2,9	nd	< 1	nd	nd	3,1
ARG	2,7	11,3	7,3	11,6	27,3	3,2
ALA	2,9	13,0	18,0	17,6	3,2	3,6
GABA	3,7	1,6	1,5	nd	< 1	5,2
PRO	2,6	nd	nd	nd	nd	4,0
VAL	1,8	2,3	2,4	2,4	1,4	3,1
MET	nd	nd	16,4	15,6	nd	nd
LYS	4,5	3,2	4,1	3,7	4,5	5,2

Obs: Amônia livre (NH₃) foi detectada em todos os tratamentos, estando presente em maior proporção nos controles dia zero e "in vivo".

- (1) Dia Zero (vide Tabela 1); MB=Meio Básico; MB+MET= Meio Básico mais Metionina; MB-S+MET=Meio Básico sem Enxofre mais Metionina; MB-S= Meio Básico sem Enxofre; IN VIVO (vide Tabela 1).
 (2) nd = não detectado

TABELA 6b: AMINOÁCIDOS LIVRES DE COTILÉDONES IMATUROS DE SOJA CULTIVADOS "IN VITRO" EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE METIONINA

AMINO ÁCIDOS	TEOR DE AMINOÁCIDOS (nMol/cot.)					IN VIVO
	DIA ZERO	MB	MB+MET	MB-S+MET	MB-S	
ASN	345,8	2891,6	3237,3	3408,8	2235,4	136,5
GLN	nd ²	13840,7	15253,9	14954,6	14134,3	nd
ASP	32,3	1332,1	1646,1	1924,3	1203,7	93,6
SER	36,0	nd	1042,5	824,7	584,6	49,4
GLU	183,0	3931,3	6145,4	5717,9	3611,0	664,3
GLY	21,8	nd	nd	nd	nd	40,3
ARG	20,3	3671,4	4005,5	6377,7	9388,5	41,6
ALA	21,8	4223,7	9876,6	9676,5	1100,5	46,8
GABA	27,8	519,8	823,1	nd	nd	67,6
PRO	19,5	nd	nd	nd	nd	52,0
VAL	13,5	747,3	1316,9	1319,5	481,5	40,3
MET	nd	nd	8998,7	8576,9	nd	nd
LYS	33,8	1039,7	2249,7	2034,3	1547,6	67,6

- (1) Dia Zero (vide tabela 1); MB=Meio Básico; MB+MET=Meio Básico mais Metionina; MB-S+MET= Meio Básico sem Enxofre mais Metionina; MB-S=Meio Básico sem Enxofre; "In Vivo" (vide Tabela 1).
- (2) nd = não detectado

SDS e beta-mercaptoetanol (Figura 13). Quando o meio de cultura foi suplementado com metionina, não ocorreu síntese a níveis detectáveis da subunidade beta das conglucinininas (7S) durante o período experimental, mas nenhuma outra diferença foi observada nesses tratamentos (MB+MET e MB-S+MET). Cotilédones mantidos em meio deficiente em enxofre (MB-S) acumularam todas as subunidades das conglucinininas (7S) em razão similar ao ocorrido com cotilédones crescidos na presença de sulfato. Nesse tratamento as subunidades ácidas das glicinininas (11S) foram fracamente detectadas quando comparadas com o meio básico.

Nos experimentos com cotilédones isolados sem fonte de nitrogênio foi observado que as subunidades alfa' e alfa foram metabolizadas surgindo outras frações protéicas com massas moleculares aparentes próximos da subunidade beta. Para melhor verificar esse fato, foi feito um experimento em que utilizou-se cotilédones com peso de matéria fresca de 50 mg onde a subunidade beta não estava presente (igual aos experimentos anteriores) e com peso de matéria fresca de 100 mg onde essa subunidade estava presente. Foram feitos tratamentos com e/ou sem nitrogênio e metionina (Tabela 7) para verificar se na presença de MET mas na ausência de GLN as subunidades alfa' e alfa eram preservadas. Além disso, o experimento serviu também para verificar se a fração protéica proveniente da degradação dessas subunidades era distinta da subunidade beta e ao mesmo tempo, verificar se essa subunidade é estável na presença de metionina. Foram feitas também análise de peso de matéria seca e proteínas nos diferentes

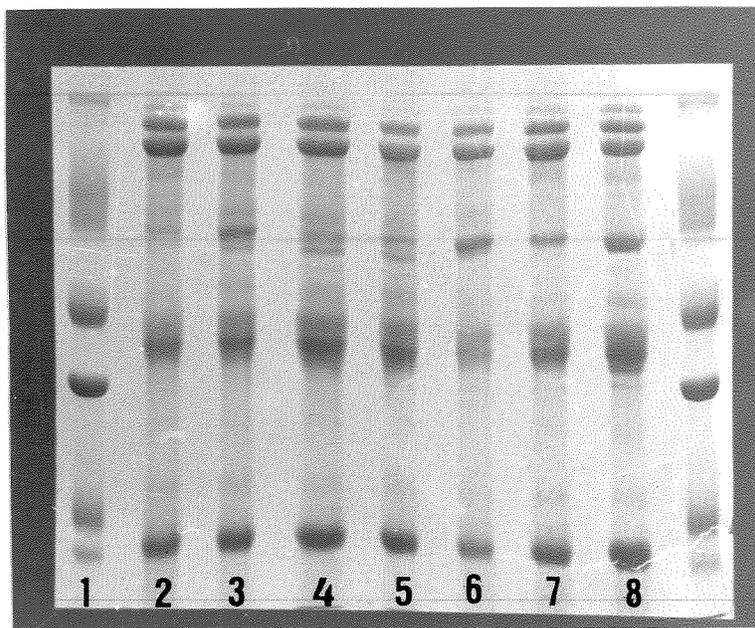


FIGURA 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol de extratos liofilizados (5mg/ml) de cotilédones imaturos de soja mantidos em cultura com e sem metionina no meio. Foram aplicados 10 ul de cada amostra.

Amostras: 1- Padrões; 2- Dia Zero; 3- MB; 4- MB+MET;
5- MB-S+MET; 6- MB-S; 7- "In Vivo"; 8- Quiescente.

tratamentos. Pode-se observar na Tabela 7 que na ausência de GLN (MB-N) ou na substituição desta por MET (MB-N+MET) os valores de pesos secos foram menores do que o observado para o meio básico (MB), na ordem de 29,9% e 61,9%, respectivamente. O teor de proteínas nestes dois tratamentos foi igual, porém foi menor em relação ao meio básico de aproximadamente 77%. A presença de MET no meio deficiente em nitrogênio, parece interferir na síntese de outros componentes do cotilédono, o que explicaria o maior decréscimo em peso de matéria seca. Esses decréscimos foram menores quando os cotilédones tinham peso de matéria fresca inicial de 100 mg. Com a adição de MET ao meio básico (MB+MET) os cotilédones acumularam mais matéria seca e proteína, o que já foi observado anteriormente.

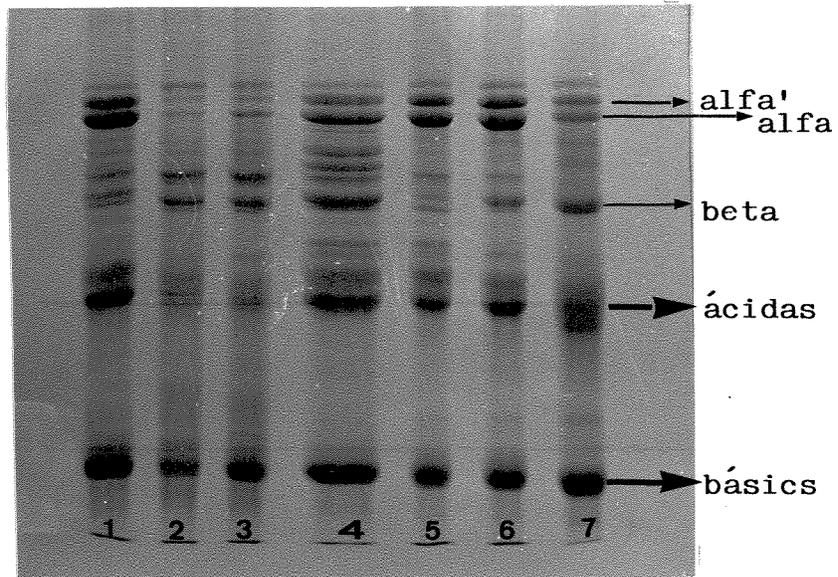
Neste experimento foi confirmado por PAGE-SDS (Figura 14) a degradação das subunidades alfa' e alfa da fração 7S na ausência de nitrogênio, tanto nos cotilédones com peso de matéria fresca inicial de 50 mg quanto naqueles com peso de matéria fresca inicial de 100 mg, mesmo na presença de MET. Pode-se observar que as bandas protéicas que aparecem em consequência dessa metabolização são distintas da subunidade beta. Este fato foi mais evidenciado quando esta subunidade já estava presente nos cotilédones. Observando-se o controle dia zero na Figura 14, pode-se notar que as subunidades ácidas são também degradadas na ausência de nitrogênio no meio. Foi confirmada a inibição da síntese da subunidade beta em presença de MET, mas esta mostrou-se estável quando presentes nos cotilédones. Isto é, a MET não impede o acú-

TABELA 7: EFEITO DA GLUTAMINA E DA METIONINA SOBRE O CRESCIMENTO E TEOR DE PROTEÍNAS DE COTILÉDONES DE SOJA EM DOIS ESTÁDIOS DE IMATURIDADE, CULTIVADOS "IN VITRO".

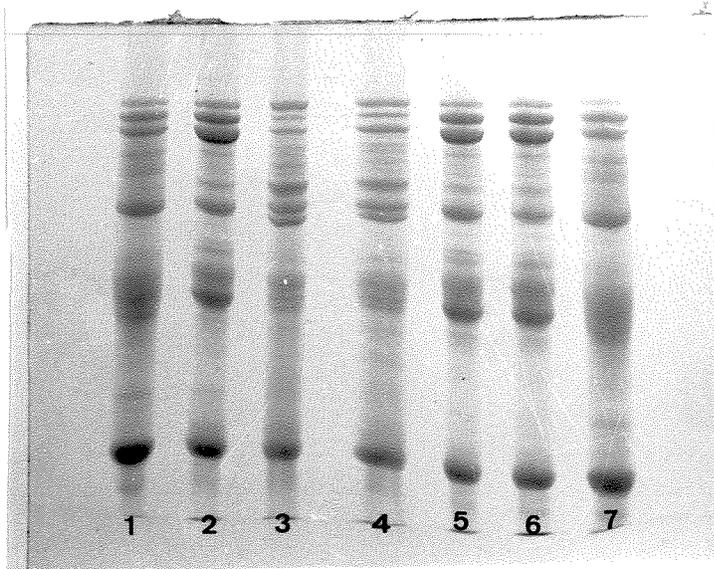
TRATAMENTOS ¹	Peso Fresco Inicial de 50mg/cot		Peso Fresco Inicial de 102mg/cot	
	Peso Seco mg/cot	Proteínas mgP/cot	Peso Seco mg/cot	Proteínas mgP/cot
DIA ZERO	12,23 ^{f*}	2,24 ^e	35,49 ^e	8,14 ^a
MB	57,50 ^b	12,91 ^c	70,23 ^b	14,77 ^c
MB-N	40,33 ^c	2,81 ^a	55,23 ^c	7,44 ^a
MB-N+MET	21,90 ^e	2,98 ^a	44,11 ^d	8,62 ^a
MB+MET	67,35 ^a	14,66 ^b	78,19 ^a	18,81 ^b
IN VIVO	30,50 ^d	7,14 ^d	-	-

Obs: As medias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

(1) DIA ZERO(Vide Tabela 1); MB= Meio Básico contendo Glutamina como fonte de Nitrogênio; MB-N= Meio Básico sem Glutamina; MB-N+MET= Meio Básico sem Glutamina mais Metionina; MB+MET= Meio Básico mais Metionina; IN VIVO(Vide Tabela 1).



A



B

FIGURA 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol de extratos liofilizados de cotilédones imaturos de soja (5mg/ml) mantidos em cultura com ou sem nitrogênio e metionina. Foram aplicados 10 ul de cada amostra.

A - Cotilédones com Peso Fresco Inicial de 50 mg.

B - Cotilédones com Peso Fresco Inicial de 100 mg.

Amostras: A1- Dia Zero; A2- S/N; A3- S/N+MET; A4- GLN;
A5- GLN+MET; A6- "In Vivo"; A7- Quiescente.
B1 e B7- Quiescente; B2- Dia Zero; B3- S/N
B4- S/N+MET; B5- GLN; B6- GLN+MET.

mulo da subunidade beta por aumentar a taxa de degradação desta subunidade.

4.3.2 - CULTURA DE EXPLANTES

No sistema de cultura de explante, foi também analisado o efeito da adição de MET e/ou ausência de Sulfato no meio no crescimento das sementes, durante um período de 7 dias.

Não foram observadas diferenças marcantes no crescimento e teor de proteínas entre os diferentes tratamentos, nesse sistema de cultura (Tabela 8 e Figuras 15 e 16). O aumento observado em peso de matéria fresca e peso de matéria seca com a adição de MET não foi significativo. Houve acúmulo de proteínas em todos os tratamentos em relação ao dia zero. No tratamento em que foi adicionado MET no meio houve inclusive um acréscimo de 8,4% em relação ao meio básico. Nos outros tratamentos, mesmo na ausência de enxofre, o teor de proteínas foi semelhante estatisticamente ao meio básico. Isto provavelmente se deve à presença das outras partes do explante que pode suprir essa ausência de sulfato pelo período experimental. Os resultados obtidos nos diferentes tratamentos, em termos de peso/proteína, não superou aqueles obtidos no controle "in vivo".

Com relação a aminoácidos livres totais observou-se que a adição de MET, tanto na ausência como na presença de enxofre

TABELA 8: EFEITO DA ADIÇÃO DE METIONINA NO MEIO DE CULTURA SOBRE O CRESCIMENTO, TEOR DE PROTEÍNAS E DE AMINOÁCIDOS LIVRES EM SEMENTES DE EXPLANTES DE SOJA CULTIVADAS "IN VITRO".

TRATAMENTOS ¹	Peso Fresco mg/2cot	Peso Seco mg/2cot	Proteína mg/2cot	A.A.livres umol/2cot
Dia zero	107,3 ^{c*}	26,8 ^c	4,5 ^c	4,2 ^a
MB	178,1 ^a	64,0 ^a	10,7 ^a	3,0 ^b
MB + MET	203,0 ^{ab}	71,0 ^{ab}	11,6 ^b	14,0 ^d
(MB-S)+ MET	226,3 ^b	75,0 ^b	10,5 ^a	15,3 ^c
MB - S	195,6 ^a	67,0 ^{ab}	10,7 ^a	4,3 ^a
IN VIVO	180,0 ^a	62,0 ^a	11,3 ^b	3,4 ^b

*As medias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

(1) DIA ZERO (vide Tabela 1); MB=Meio Básico contendo GLN como fonte de N; MB+MET=Meio Básico mais Metionina; MB-S+MET=Meio Básico sem enxofre mais Metionina; MB-S=Meio Básico sem enxofre; IN VIVO (vide Tabela 1)

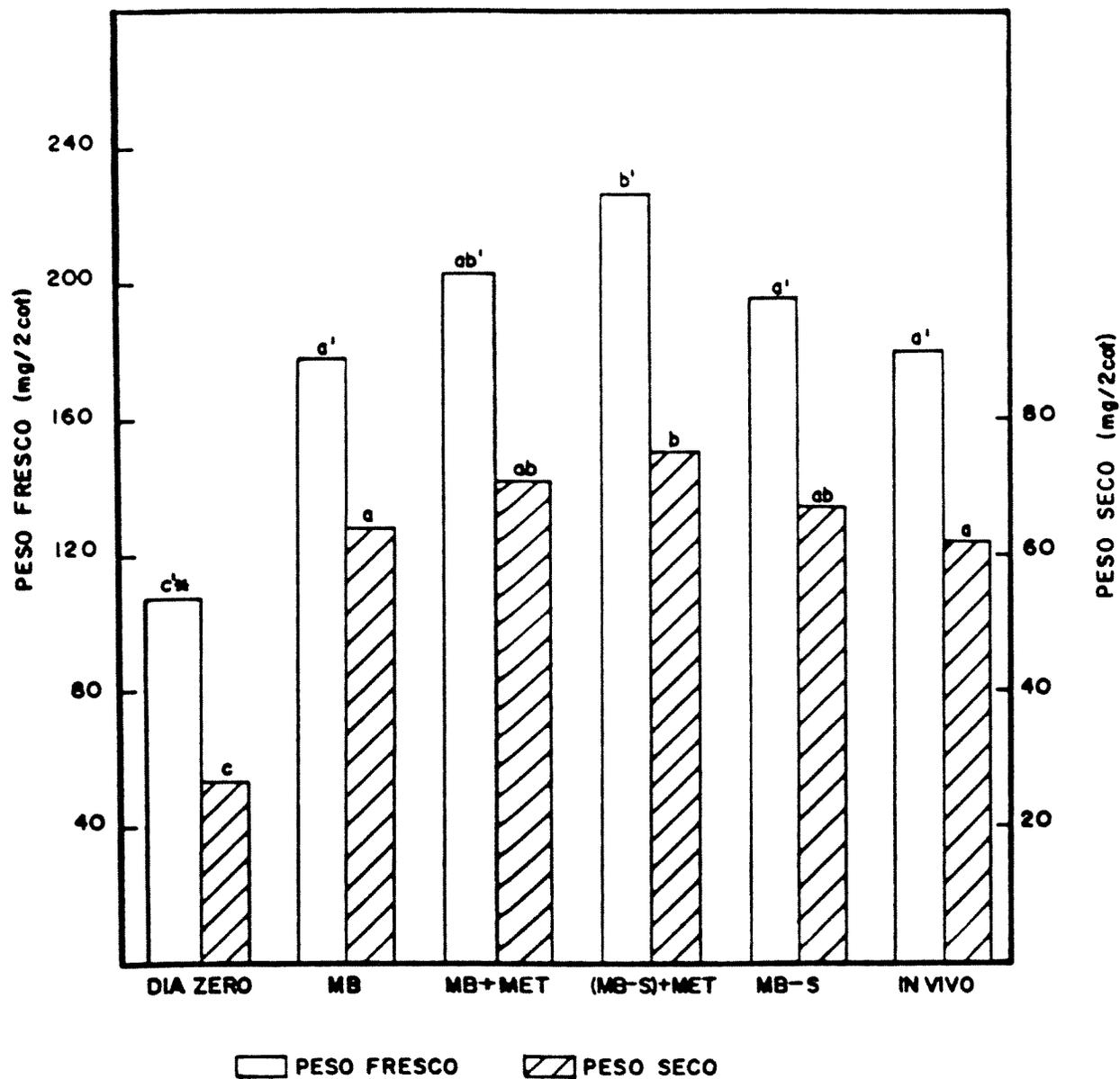


FIGURA 15 - Efeito da metionina no crescimento de sementes de ex-plantas de soja, cultivadas "in vitro" por 7 dias.

Os tratamentos estão descritos na Tabela 7. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

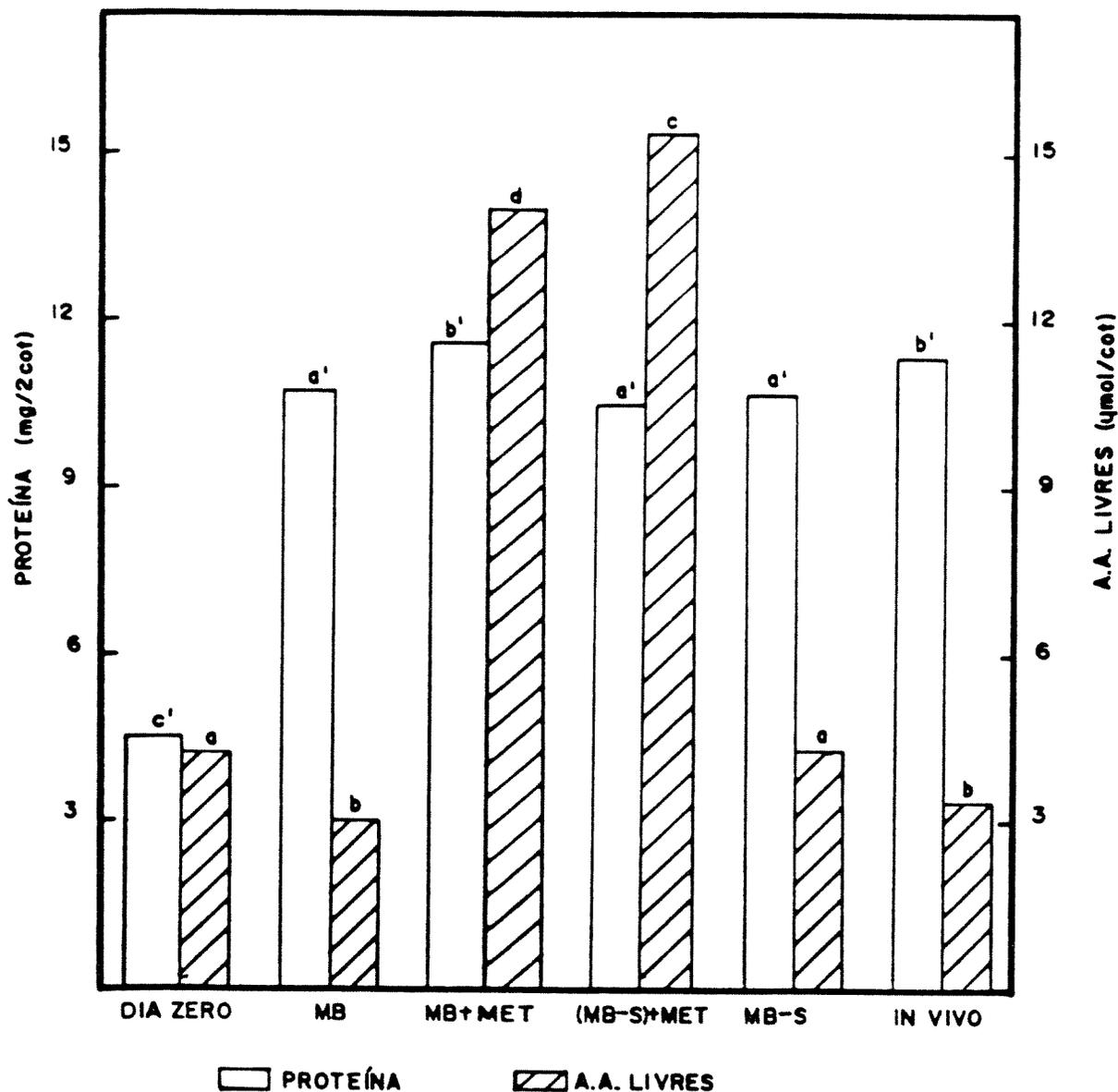


FIGURA 16- Efeito da metionina sobre o teor de proteínas e aminoácidos livres totais de sementes de explantes de soja cultivados "in vitro" por 7 dias.

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

acarreta aumento significativo no seu teor (Tabela 8). Na realidade, este aumento não se deve apenas à presença de MET livre nos cotilédones, mas à uma indução no acúmulo de outros aminoácidos (Tabela 9a). É interessante observar que o teor de aminoácidos livres totais no tratamento em MB decresce significativamente em relação ao dia zero, o que não acontece com o tratamento MB-S, apesar deste fato não afetar a síntese protéica (Figura 16).

A análise dos aminoácidos livres por HPLC está apresentada nas Tabelas 9a e 9b. Pode-se observar que MET foi translocada intacta até o fruto acumulando nos cotilédones em quantidades expressivas, chegando a representar o aminoácido mais abundante. Devido a grande concentração de ASN no controle dia zero, nesse experimento, provavelmente os cotilédones lançaram mão desse "pool" para a síntese e interconversão em outros aminoácidos. Porém quando as sementes de explantes cresceram em meio básico (MB), o consumo desse aminoácido foi maior (87,4%) do que nos tratamentos em que havia MET no meio (12,7% para MB+MET e 22,9% para MB-S+MET). Na ausência de enxofre (MB-S) esse decréscimo foi de 72%. Apesar disso, ASP acumulou de 6,5 vezes com a adição de MET e de 7 vezes com a substituição do enxofre por metionina em relação ao meio básico. Na ausência de enxofre esse acúmulo foi de 1,4 vezes. Na presença de MET ocorreu um acréscimo considerável no nível de SER e ARG (Tabela 9a), enquanto que na sua ausência (MB e MB-S) o nível desses aminoácidos decresceu em relação ao dia zero. Esse decréscimo foi maior quando os cotilédones cresceram em MB (60% e 47% respectivamente). A presença de

TABELA 9a: AMINOACIDOS LIVRES DE SEMENTES DE EXPLANTES DE SOJA CULTIVADOS EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE METIONINA

AMINO ÁCIDOS	TEOR DE AMINOÁCIDOS (MOL%)					
	DIA ZERO	MB	MB+MET	MB-S+MET	MB-S	IN VIVO
ASN	67,6	11,9	17,7	14,3	18,5	28,5
GLN	nd ²	nd	nd	nd	nd	nd
ASP	1,2	2,3	3,2	3,3	2,3	4,0
SER	3,4	1,9	14,6	13,5	2,2	4,7
GLU	12,2	52,1	13,5	18,1	49,0	40,8
GLY	1,4	1,9	1,5	1,9	1,8	nd
ARG	2,3	1,7	4,5	2,7	1,5	1,2
THR	< 1	nd	< 1	< 1	nd	nd
ALA	2,3	3,5	7,2	5,2	1,0	3,4
GABA	3,1	18,5	6,7	6,2	14,7	11,7
PRO	1,5	3,2	nd	1,1	2,4	1,8
VAL	1,8	nd	< 1	nd	nd	< 1
MET	nd	nd	26,3	29,3	nd	nd
LYS	2,4	3,1	3,6	2,7	3,5	3,5

Obs: Amônia livre (NH₃) foi detectada em todos os tratamentos, estando presente em maior proporção nas sementes mantidas em meio básico.

(1) Vide Tabela 6

(2) nd = não detectado

TABELA 9b: AMINOÁCIDOS LIVRES DE SEMENTES DE EXPLANTES DE SOJA CULTIVADOS EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE METIONINA.

AMINO ÁCIDOS	TEOR DE AMINOÁCIDOS (nMol/2cot.)					IN VIVO
	DIA ZERO	MB	MB+MET	MB-S+MET	MB-S	
ASN	2839,2	357,0	2478,0	2187,9	795,5	969,0
GLN	nd ²	nd	nd	nd	nd	nd
ASP	50,4	69,0	448,0	504,9	98,9	136,0
SER	142,8	57,0	2044,0	2065,5	94,6	159,8
GLU	512,4	1563,0	1890,0	2769,3	2107,0	1387,2
GLY	58,8	57,0	210,0	290,7	77,0	nd
ARG	96,6	51,0	630,0	413,1	64,5	40,8
THR	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ALA	96,6	105,0	1008,0	795,6	172,0	115,6
GABA	130,2	555,0	938,0	948,6	632,1	397,8
PRO	63,0	96,0	nd	168,3	103,2	61,2
VAL	75,6	nd	nd	nd	nd	nd
MET	nd	nd	3682,0	4482,9	nd	nd
LYS	100,8	93,0	504,0	413,1	150,5	119,0

(1) Vide Tabela 6

(2) nd = não detectado

MET, mesmo na ausência de enxofre, também favoreceu a síntese de ALA, cujo teor superou àquele dos cotilédones crescidos em meio básico. É interessante observar que LYS, um dos aminoácidos derivado do ácido aspartico, acumulou nos diferentes tratamentos enquanto que em meio básico permaneceu praticamente igual ao dia zero. O teor de todos os aminoácidos, com exceção da PRO, de sementes crescidas na presença de MET superou aquele de sementes crescidas em meio básico.

Analisando-se as proteínas de reserva por PAGE-SDS (Figura 17), pode-se observar que estas acumularam durante o período experimental. Porém, quando o meio de cultura foi suplementado com MET, não ocorreu a síntese da subunidade beta das conglucini-
nas (7S) a níveis detectáveis. A supressão dessa subunidade, pode aparentemente, ter alterado o teor relativo dos aminoácidos livres. Não foi observada diferenças entre as subunidades ácidas e básicas da fração 11S nesses tratamentos. A síntese das subunidades das proteínas de reserva em sementes de explantes de soja não foi afetada pela ausência de enxofre no meio. Nesse tratamento (MB-S), aparentemente, a concentração da subunidade beta superou àquela de sementes mantidas em MB.

Os resultados obtidos com cultura de cotilédones em relação à inibição da subunidade beta foram, portanto, confirmados com o sistema de cultura de explantes, onde MET do meio foi translocada pelos vasos vasculares até as sementes, causando o mesmo efeito.

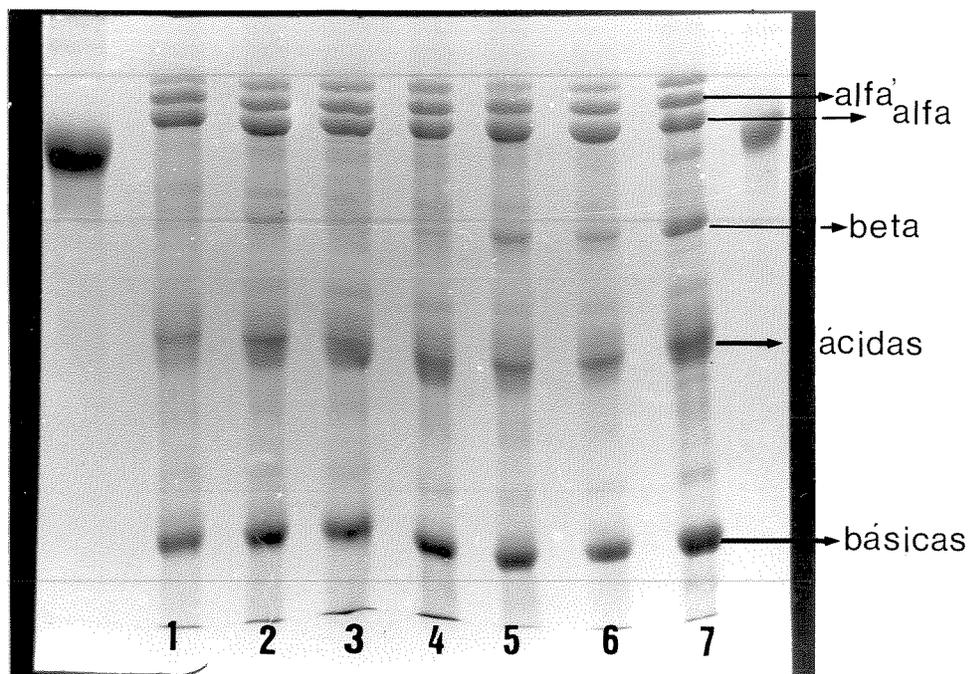


FIGURA 17 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol de extratos liofilizados (5mg/ml) de sementes de explantes mantidos em cultura com ou sem metionina no meio. Foram aplicados 10 ul de cada amostra.

Amostras: 1- BSA; 2- Dia Zero; 3- MB; 4- MB+MET;
5- MB-S+MET; 6- MB-S; 7- "In Vivo"; 8- Quiescente.

4.4 - COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DAS SUBUNIDADES DAS PROTEÍNAS DE RESERVA DE SOJA EM SEMENTES QUIESCENTES.

A composição de aminoácidos das subunidades das proteínas de reserva de sementes quiescentes está mostrada na Tabela 10.

Como é típico de muitas proteínas de sementes, os resíduos de GLU-GLN (GLX) e ASP-ASN (ASX) foram abundantes nestas proteínas. Em relação aos outros aminoácidos, na fração 7S predominam os resíduos de SER, GLY, ALA, LEU e LYS e em menor proporção ARG e VAL. As subunidades das conglucinininas (7S) diferem no conteúdo de alguns aminoácidos. Na subunidade alfa' o conteúdo de HIS é cerca de 3 vezes maior do que nas outras subunidades, na subunidade alfa os resíduos de PRO, MET, ILE, LEU e PHE predominam enquanto que a subunidade beta tem um mais alto conteúdo de ALA e LYS. A subunidade beta se destacou por possuir o nível mais baixo de MET.

A fração 11S, além dos resíduos GLX e ASX, é rica em SER, GLY, ALA e LYS. Comparando-se os polipeptídeos ácidos e básicos, pode-se observar que o primeiro contém proporcionalmente mais GLX e ASX, mas o último é mais rico em LEU, PHE e LYS. A Histidina, um aminoácido essencial, predomina na subunidade A₁ que, por outro lado, possui um menor conteúdo de Metionina.

TABELA 10: COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DAS PRINCIPAIS SUBUNIDADES DAS PROTEÍNAS DE RESERVA DE SEMENTES QUIESCENTES DE SOJA. AS ANÁLISES FORAM FEITAS A PARTIR DE 1,5mg DE EXTRATO LIOFILIZADO

AMINO ÁCIDOS	7 S			11 S		
	alfa'	alfa	beta MOL %	A ₁	A ₂	Ba
ASX	11,1	8,5	12,7	8,9	9,5	10,4
GLX	23,6	19,8	17,8	16,2	19,8	13,4
SER	8,7	6,6	9,3	10,2	8,9	8,7
GLY	7,5	6,1	8,6	15,5	14,6	11,5
HIS	3,5	0,9	1,3	2,1	1,4	1,1
ARG	6,2	5,6	5,7	3,6	4,9	3,5
THR	2,7	2,1	3,2	4,1	4,2	4,2
ALA	6,5	5,7	9,3	8,8	10,1	10,5
PRO	3,0	5,9	2,2	4,1	3,2	2,4
TYR	2,6	3,3	3,1	2,8	2,4	2,9
VAL	4,4	5,6	4,6	5,2	3,8	5,0
MET	0,6	1,2	0,3	1,0	1,2	1,4
CYS	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ILE	3,7	5,8	3,6	3,3	3,1	3,9
LEU	6,4	9,9	6,8	6,0	4,6	7,8
PHE	3,7	5,7	2,7	2,2	2,4	4,8
LYS	5,7	7,5	8,5	6,2	5,8	8,6

nd = não detectado

5 - DISCUSSÃO GERAL

Estudos de síntese de macromoléculas e acúmulo de produtos de reserva em sementes são mais facilitados quando empreendidos "in vitro" do que "in vivo". A introdução de compostos chaves desses processos, a definição e controle das condições ambientais e variações experimentais são todas mais facilmente conseguidas sob circunstâncias pré-estabelecidas. Entretanto, o valor experimental de sistemas de cultura é dependente da extensão pelo qual o crescimento e o desenvolvimento "in vitro" simula àquele "in situ".

Pelos resultados apresentados no presente trabalho pode-se verificar que os dois sistemas de cultura utilizados são viáveis para esses estudos, apesar de algumas limitações no sistema de cultura de cotilédones isolados.

5.1- EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO

As principais formas de transporte de nitrogênio para a síntese de proteínas de reserva em sementes de soja em desenvolvimento são a asparagina (ASN) e os ureídeos alantoína (ALN) e ácido alantóico (ALC). Entretanto, nesse trabalho, glutamina (GLN)

mostrou-se igualmente eficiente a ASN como fonte de nitrogênio (Tabelas 1 e 3) para ambos os sistemas de cultura, que mostraram ter concentrações de proteínas comparáveis as de cotilédones crescidos "in vivo". Porém, comparando-se os incrementos relativos dos teores de proteínas nos dois sistemas de cultura, considerando-se o aumento de proteínas no tratamento sem nitrogênio no caso de cultura de explantes, pode-se notar que o aumento real quando a fonte foi GLN, foi maior em cultura de cotilédones isolados (250%) do que em cultura de explantes (219%), enquanto que ASN como fonte de nitrogênio foi mais eficiente em cultura de explantes (213%) do que em cultura de cotilédones (169%). Esses resultados são os esperados se comparados com dados da literatura (THOMPSON et al., 1977, SKOKUT et al., 1982, COKER e SHAEFER, 1985, HAGA e SODEK, 1987, WETTLAUFER e OBENDORF, 1991 e MOSQUIM e SODEK, 1991).

Em sementes de ervilha cultivadas "in vitro", não houve diferença no aumento do teor de proteínas quando as únicas fontes de nitrogênio foram GLN ou ASN (LEA et al., 1979). MISRA e DAKS (1985) mostraram que quando GLN radioativa foi injetada no endosperma de grãos de milho cultivados "in vitro", a radioatividade, após 7 dias, estava distribuída entre aminoácidos, proteínas, e amido, indicando uma alta capacidade da GLN para conversão em aminoácidos e conseqüente incorporação em proteínas de reserva. Este fato foi também observado em sementes isoladas de Ricinus communis L. cultivadas "in vitro", onde um mais alto conteúdo de proteínas totais foi obtido quando GLN foi a única fonte de ni-

trogênio. Por outro lado, em sementes inoculadas em meio contendo ASN como única fonte de nitrogênio, o teor de proteínas foi significativamente inferior ao controle e ao do tratamento com GLN (AZARKOVICH e SOBOLEV, 1990).

Em relação a ALN, em cultura de cotilédones isolados, verificou-se que sua eficiência em promover crescimento e acúmulo de proteínas foi bastante inferior a ASN e GLN. Porém, em sistema de cultura de explantes, a ALN superou as outras fontes de nitrogênio, tendo um incremento de 344% no teor de proteínas. A alta eficiência da ALN no sistema de cultura de explantes e a ausência de ureídeos nos cotilédones (MOSQUIM, 1989), mesmo em plantas noduladas (GOMES e SODEK, 1984), reforçam as evidências de que "in situ" os ureídeos são degradados dentro do tegumento ou vagem e o nitrogênio resultante é convertido em GLN que depois é translocado para a semente (RAINBIRD et al., 1984, HSU et al., 1984 e COKER e SCHAEFFER, 1985). Resultados semelhantes foram encontrados em caupi (Vigna unguiculata) por ATKINS et al., (1982), onde ureídeos marcados foram recuperados em maiores proporções no caule e pecíolos, indicando estocagem preferencial de alantoína. Pedúnculos também aparentemente são sítios de estocagem de ureídeos, porém, em tecidos das vagens foi verificado um intenso metabolismo para outras formas de solutos, sugerindo que uma das funções das vagens é metabolizar ureídeos e transferir o nitrogênio para as sementes na forma de outros compostos.

Entretanto, WETTLAUFER e OBENDORF (1991) trabalhando com cultura de vagens isoladas de soja mergulhadas diretamente no

meio observaram que a alantoina ou o ácido alantoico não substituem as amidas GLN ou ASN, como única fonte de nitrogênio. Tal fato sugere que o menor crescimento das sementes se deva a reduzida absorção e o reduzido metabolismo dos ureídeos pelas vagens. De fato, ureídeos que são transportados dentro dos tecidos das vagens são metabolizados mais vagorosamente do que ureídeos que são transportados dentro dos tecidos das folhas, pecíolos e caules (RAINBIRD et al., 1984).

Os resultados do tratamento sem fonte de nitrogênio (Tabela 3), sugerem que ocorreu uma intensa mobilização de nutrientes das diferentes partes do explante para as sementes, já que houve um incremento de 2,8 mg de proteínas por semente nesse sistema de cultura. Isto foi confirmado por MOSQUIM (1989) e STASWICK (1989) que verificaram uma queda do teor de proteínas das vagens em cultura e durante o desenvolvimento das sementes "in vivo", respectivamente, indicando que proteínas de reserva vegetativa contribuem significativamente para o "pool" de nutrientes que são transportados para as sementes. Este fato é reforçado pelo sistema de cultura de cotilédones isolados, onde o teor de proteínas não aumenta em relação ao controle dia zero, na ausência de nitrogênio no meio (Figura 4). Apesar de não ocorrer síntese de proteínas, foi observado aumento em peso de matéria seca indicando que cotilédones de soja são hábeis em utilizar sacarose do meio como fonte de energia e como precursor para síntese de outros componentes celulares. MADISON et al. (1981) verificaram que quando sacarose foi omitida do meio, os cotilédones de

soja cresceram pouco e as proteínas não foram degradadas. Porém, quando GLN foi omitida, os cotilédones de soja foram induzidos a degradar suas proteínas de reserva e atingiram um peso final duas vezes maior do que cotilédones incubados sem sacarose. Em contraste, cotilédones isolados de ervilha cresceram muito mais na ausência de sacarose do que na ausência de uma fonte de nitrogênio (MADISON et al., 1981), porém o incremento de proteínas por órgão (3,04 mg/cot.) foi até superior ao encontrado em sementes de explante de soja (Tabela 3, LEA et al., 1979).

A metabolização das proteínas de reserva na ausência de nitrogênio no meio foi melhor evidenciada quando analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 7). Pode-se observar que no sistema de cultura de cotilédones isolados as subunidades alfa' e alfa das conglucinininas e as cadeias ácidas das glicinininas foram preferencialmente metabolizadas, enquanto que a subunidade beta das conglucinininas e as cadeias básicas das glicinininas não foram aparentemente afetadas durante o período experimental de 7 dias. Este processo foi melhor evidenciado em cotilédones com pesos frescos iniciais de 100 mg (Figura 14), em que se observou nitidamente a degradação das subunidades alfa', alfa e ácidas e o aparecimento de alguns polipeptídeos com pesos moleculares menores do que as subunidades alfa' e alfa. Vale ressaltar que este metabolismo diferenciado das subunidades das proteínas de reserva de soja foi também observado durante o processo de germinação. O conteúdo das cadeias ácidas decresceu a partir do 3º dia, enquanto que não houve decréscimo aparente das cadeias

básicas das glicininas até após 8 dias de germinação. O mesmo foi observado nos polipeptídeos das conglucinininas onde ambas as subunidades alfa' e alfa desapareceram completamente até o 6º dia, enquanto nenhum declínio no teor da subunidade beta foi notado antes de 6 dias de germinação (WILSON et al., 1986; QI et al., 1992).

É importante salientar que, na realidade, a estratégia alternativa utilizada pelos cotilédones em cultura para se adaptarem a carência de nitrogênio, é análoga ao que ocorre normalmente durante o processo germinativo, ou seja há uma metabolização diferenciada entre as proteínas de reserva, tanto em relação ao tipo de proteínas a ser metabolizada preferencialmente, como em relação ao tempo de metabolização das mesmas.

É interessante ressaltar que em situações desfavoráveis (ausência de nitrogênio, nos dois sistemas, e ALN no caso de cultura de cotilédones) a subunidade beta não foi sintetizada à níveis detectáveis (Figura 7 e 10). A síntese e estabilidade da subunidade beta é nitidamente diferente das alfa' e alfa no eixo e cotilédone durante o desenvolvimento (LADIN et al., 1987) e os níveis de mRNA e proteína da subunidade beta são afetadas por ácido abscísico (BRAY e BEACHY, 1985), tratamento com metionina (HOLLOWACH et al., 1986) e "stress" nutricional (GAYLER & SYKES, 1985) em cotilédones desenvolvidos em cultura.

Por outro lado, a comparação das proteínas de reserva de cotilédones cultivados "in vitro", nos dois sistemas, na presença de GLN ou ASN, com as proteínas de sementes mantidas na

planta pelo mesmo tempo e sementes maduras (Figuras 7 e 10), não revelou diferenças qualitativas entre elas. Porém, em termos quantitativos, a subunidade beta das proteínas de sementes cultivadas "in vitro" foi, aparentemente, mais rapidamente acumulada do que em sementes equivalentes crescidas "in vivo". Como sementes de soja mostraram uma expressão temporal e espacial dos mRNA que codificam as diferentes subunidades das conglucinininas (LADIN, et al., 1987), pode-se inferir, então, que em cultura o mRNA da subunidade beta foi mais rapidamente acumulado do que "in vivo". Foi também observado para cotilédones de ervilha em cultura, que os teores dos mRNA que codificam as proteínas de reserva (leguminas e vicilinas), foram maiores do que naqueles crescidos diretamente na planta (YANG, et al., 1990), confirmando assim, o maior teor de legumina e vicilina encontrado por DOMONEY et al. (1980) em cotilédones cultivados "in vitro".

Em endosperma de mamona cultivados "in vitro", GLN foi mais eficiente, em termos quantitativos, na síntese das diferentes subunidades das proteínas de reserva do que ASN, não ocorrendo diferenças em relação as proteínas de sementes que amadureceram na planta (AZARKOVICH and SOBOLEV, 1990).

Como relatado anteriormente, a ALN apesar de não ter sido uma boa fonte de nitrogênio para síntese de proteínas em cultura de cotilédones (Tabela 1 e Figura 7), os primeiros passos do metabolismo de ureídeos devem ter funcionado com bastante eficiência, já que, como observado por TONIN (1988), não houve acúmulo de ureídeos. Isto esta de acordo com o aumento na atividade

da Alantoinase, durante o período de incubação (TONIN, 1988). Embora ALN tenha sido utilizada no sistema, os caminhos metabólicos seguidos não resultaram na formação de aminoácidos como observado para as outras fontes de nitrogênio (Figura 4), mas sim num acúmulo de NH_4^+ (dados não mostrados), o que justificaria o baixo incremento no teor de proteínas. Por outro lado, HAGA e SODEK (1987) observaram que a síntese de proteínas a partir de ALN foi totalmente inibida em presença de MSO (Metionina Sulfoximina), sugerindo um envolvimento da amônia como intermediário da síntese de GLN via Glutamina Sintetase. O acúmulo de NH_4^+ juntamente com o efeito de MSO sugere que esta via de incorporação funciona precariamente, levando ao baixo aproveitamento de ALN como fonte.

Foi observado também (Tabela 2b) que os níveis de alguns aminoácidos, principalmente ASP, SER, GLU e LYS, aumentaram nos cotilédones neste tratamento, supostamente por conversão da ASN endógena que decresceu em 90% em relação ao controle. A enzima asparaginase foi detectada em cotilédones e tegumentos de frutos de soja em desenvolvimento por GOMES e SODEK (1984) e em cultura de cotilédones isolados na presença de ALN por TONIN e SODEK (1990).

Ao contrário, no sistema de cultura de explantes, a síntese de aminoácidos a partir da ALN deve ter ocorrido com eficiência já que houve formação de altos níveis de proteínas, e o teor de aminoácidos livres totais não foi diferente do controle dia zero, e bem maior do que no tratamento S/N (Figura 9). Essa metabolização dos ureídeos foi também evidenciada por MOSQUIM

(1989) quando verificou que nas diferentes partes do explante (caule, vagens e tegumento), além do aumento de proteínas, os teores de aminoácidos livres permaneceram constantes em relação ao controle "in situ". Isto sugere um metabolismo intenso e/ou mobilização dos aminoácidos nas diferentes partes do explante, os quais são enviados aos cotilédones para biossíntese de proteínas de reserva. PEOPLES *et al.* (1985) acompanhando o desenvolvimento de sementes de Vigna unguiculata, observaram que o catabolismo de ureídeos ocorreu principalmente nas vagens e tegumentos e que estes últimos liberaram nitrogênio para as sementes principalmente como HIS, ARG, GLN e ASN.

Embora existam controvérsias a respeito da utilização de ureídeos, parece evidente, pelo já exposto, que o nitrogênio liberado é preferencialmente incorporado para formação de GLN. Reforça este fato a composição de aminoácidos de sementes de explantes que, no geral, é bastante semelhante quando GLN e ALN são utilizados como fontes de nitrogênio (Tabela 4a). Além disso, com ALN como fonte nitrogenada, foi encontrado quantidades substanciais de GLN no caule, vagem e tegumento (MOSQUIM e SODEK, 1992).

Foram observados também alguns efeitos contrastantes no "pool" de aminoácidos livres entre os dois sistemas, no tratamento com ALN. Enquanto que em cultura de explantes o teor de ASP nos cotilédones decresceu em 47% e ALA aumentou em 10%, em cultura de cotilédones isolados ASP aumentou 8 vezes e ALA decresceu em 41%. O teor de SER também aumentou em proporções bastante elevadas (6 vezes) em cotilédones isolados.

Comparando-se a eficiência das amidas como fonte de nitrogênio para síntese de aminoácidos livres, pode-se verificar que, em cultura de cotilédones, GLN foi bem mais eficiente do que ASN (Figura 4). A mais baixa eficiência na utilização da ASN provavelmente não está relacionada com as atividades das principais enzimas envolvidas no metabolismo das amidas (ASNase, GOGAT, GS), uma vez que, TONIN (1988) verificou que essas atividades aumentaram durante o período de cultura.

Estudos mais detalhados tentando elucidar a metabolização do N amídico e aminico de ASN e GLN em cotilédones de soja em cultura, foram realizados por SKOKUT et al. (1982). De acordo com os autores os nitrogênios da ASN foram utilizados com um grau diferente de especificidade enquanto que os nitrogênios da GLN foram indiscriminadamente incorporados em proteínas. Durante os primeiros sete dias de cultura com ASN como única fonte nitrogenada, o N aminico contribuiu com aproximadamente duas vezes mais nitrogênio para síntese de proteínas do que o N amídico. Eles atribuíram este fato a reduzida atividade das enzimas que assimilam amônia nos tecidos dos cotilédones. Entretanto, HAGA & SODEK (1987) verificaram que amônia causou uma pequena redução na utilização da ASN, possivelmente por um efeito mais específico. Uma possibilidade é a inibição da ASNase pelo produto final ("feedback") como sugerido por SODEK et al., (1980). A esse respeito, foi observado em nossos experimentos, um maior acúmulo de amônia livre no tratamento com ASN (4 vezes) do que com GLN (dados não mostrados). Pelo exposto, a menor eficiência da ASN em relação a

GLN deve-se, provavelmente, a efeitos múltiplos, uma vez que, se as enzimas de assimilação de amônia não estão com suas atividades ótimas esta acumula causando, conseqüentemente, inibição da asparaginase.

É interessante observar que ALA e ASP acumularam em níveis bem superiores em presença de GLN, além do acúmulo de ASN, que não é observado nos outros tratamentos, a não ser quando este foi adicionado ao meio (Tabela 2b).

O ácido aspártico pode ser derivado diretamente da ASN ou por reação de transaminação como por exemplo, através da enzima glutamato-oxaloacetato transaminase que cataliza a interconversão entre glutamato e aspartato (GIVAN, 1980). A alanina (ALA) por sua vez, pode ser derivada do aspartato por uma reação de descarboxilação, embora seja menos comum do que a transaminação via ácido pirúvico (BRYAN, 1980). Foi mostrado ainda, que em ervilha o nitrogênio da ALA pode ser derivado diretamente da ASN, possivelmente por transaminação (BAUER *et al.*, 1977). Por outro lado, o acúmulo de ASN poderia ser explicado pela inibição da asparaginase em presença de GLN, como observado por TONIN e SODEK (1990), em cultura de coltiledones isolados.

No sistema de cultura de explantes, o teor de ALA também aumentou (70%) no tratamento com GLN, embora em menor extensão, enquanto que no tratamento com ASN houve pouca variação. Em relação ao teor de ASP, ocorreu a lógica esperada, isto é, acumulou mais em presença de ASN. Um dos efeitos mais interessantes foi em relação a ARG cujo teor aumentou 26 vezes no tratamento

com GLN em cultura de cotilédones isolados, enquanto que em explantes o teor de ARG decresceu em todos os tratamentos em percentuais bastante semelhantes. Provavelmente esse efeito foi ocasionado diretamente pela GLN, já que em explantes glutamina não foi encontrado nos cotilédones em níveis detectáveis (Tabela 4a).

Sabe-se que arginina é um importante composto de estocagem temporária de nitrogênio em muitas plantas superiores, desempenhando um importante papel na economia de nitrogênio, o qual, posteriormente, deve ser usado para síntese de outros aminoácidos durante o desenvolvimento da semente (DILWORTH & DURE III, 1978; THOMPSON, 1980, DE RUITER e KOLLOFFEL, 1982 e 1983, THORNE, 1985 e MICALLEF & SHELP, 1989c). Evidências sugerem que este aminoácido é sintetizado a partir de GLU via acetilglutamato e ciclo da urea (MORRIS e THOMPSON, 1977; DE RUITER e KOLLOFFEL, 1982, THOMPSON, 1980 e MICALLEF & SHELP, 1989b). Portanto, os resultados obtidos estão de acordo com a literatura, onde GLN foi convertida em ARG a partir de GLU, como uma maneira de estocar o excesso de nitrogênio.

Embora MICALLEF e SHELP (1989a,b) tenham relatado que ARG e ASN predominaram no "pool" de aminoácidos livres durante o desenvolvimento da semente de soja "in vivo" até 58 dias após a anteses, isto não está de acordo com os dados apresentados nas tabelas 2 e 4, onde "in vivo" o segundo aminoácido predominante foi GLU, mesmo quando os cotilédones tinham pesos frescos em torno de 45mg, que equivale a aproximadamente 20-25 dias após a floração. HSU et al. (1984) mostraram que toda GLN foi convertida a

GLU entre o tegumento e o apoplasto do embrião em razão equimolar, sendo este o principal aminoácido liberado para o embrião, durante o desenvolvimento da semente. Foi observado também, por MURRAY (1983) e MURRAY & CORDOVA-EDWARDS, 1984) em cotilédones de ervilha em desenvolvimento, que GLN decresceu em favor do aumento de GLU e ARG (24-25 dias após a antese) e que ARG não foi detectada a partir de 31 dias após a antese até cotilédones maduros. Uma outra explicação para a discrepância encontrada na literatura sobre o nível de ARG pode estar relacionada com problemas na análise de aminoácidos. Alguns aminoácidos são eluídos juntos ou próximos sendo necessário o emprego de diferentes pHs.

O teor de ácido aminobutírico (GABA), um aminoácido não proteico, também aumentou (3 vezes) no tratamento com GLN em cultura de cotilédones isolados. Esse aminoácido é sintetizado por descarboxilação do glutamato pela enzima glutamato-1-carboxilase (SATYA NARAYAN e NAIR, 1990).

Altos níveis de GABA encontrados em muitas plantas são ocasionados por uma variedade de condições. Acúmulo passivo de GABA tem sido observado em plantas em resposta a "stress" ambientais tais como anaerobiose, baixa temperatura e manipulação física (WALLACE et al., 1984) ou adição de amônia, GLN (KISHINAMI e OJIMA, 1980, KISHINAMI, 1987) e auxinas (KISHINAMI, 1988).

Um dos papéis atribuídos a este aminoácido é o de agir como um composto transportador de nitrogênio, uma vez que está presente em quantidades significativas no total de nitrogênio solúveis no floema de muitas plantas, particularmente soja (SATYA

NARAYAN e NAIR,1990). A conversão de GLU a GABA em plantas superiores é favorecida quando a conversão de GLN a GLU é impedida, quando ocorre proteólise (STEWART e LARHER,1980) ou os requerimentos das células por GLU e GLN são restritos (LAHDESMAKI, 1968). Assim, GABA também é visto como composto de estocagem temporária de nitrogênio para síntese de aminoácidos protéicos em plantas superiores (SELMAN e COOPER,1978).

Na análise de aminoácidos livres do controle dia zero (Tabela 2), GABA foi um dos aminoácidos mais abundantes, decrescendo quando as sementes se desenvolveram na planta ("in vivo"). Esse decrescimento foi superior quando os cotilédones foram submetidos a carencia de nitrogênio (81%). Assim, parece evidente que GABA foi utilizado para satisfazer necessidades nitrogenadas dos cotilédones.

É extremamente complexa as reações que envolvem síntese e degradação de aminoácidos, uma vez que, doadores comuns de grupos aminos em reações catalizadas pelas diversas aminotransferases podem, através dos diferentes precursores, diversificar os caminhos metabólicos de acordo com as necessidades, suprimento de nutrientes e estágio de desenvolvimento dos cotilédones o que dificulta uma análise mais realística e pormenorizada das interconversões metabólicas ocorridas.

5.2 - EFEITO DA FONTE DE ENXOFRE

Sabe-se que as proteínas de sementes de soja não contêm quantidades suficientes de aminoácidos sulfurados para satisfazer os requerimentos alimentares para os animais. Esforços têm sido feitos para aumentar a quantidade de enxofre nas proteínas de sementes de uma grande quantidade de plantas, aplicando-se altas concentrações de fertilizantes sulfurados no solo. Entretanto, o excesso de enxofre não aumenta a razão S:N na proteína total (RANDALL et al., 1979).

As globulinas 11S (glicininas) de soja contêm mais metionina do que a globulina 7S (conglucinas) e, inclusive, a subunidade beta da proteína 7S é desprovida de metionina (HOLLOWACH et al., 1984a) ou contêm quantidades insignificantes (Tabela 10). Foram obtidas duas cultivares de soja com elevada razão 11S:7S, contendo 15% mais metionina do que outras cultivares (KITAMURA & KAIZUMA, 1981). Assim, esforços para aumentar a razão 11S:7S ou diminuir o conteúdo da subunidade beta pode ser importante no melhoramento da qualidade nutricional das proteínas de sementes de soja.

Sob disponibilidade limitada de enxofre, proteínas de reserva de sementes com baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados acumulam mais do que aquelas com alto conteúdo (HIGGINS, 1984). Isto foi observado em muitas plantas incluindo Pisum sativum (RANDALL et al., 1979, EVANS et al., 1985), Lupinus angustifolius

(BLAGROVE et al., 1976), Oryza sativa (BAUDEF et al., 1986), Triticum aestivum (WRIGLEY et al., 1984, CASTLE & RANDALL, 1987), Hordeum vulgare (SHEWRY et al., 1983) e Glycine max (HOLLOWACH et al., 1984b, GAYLER & SYKES, 1985 e FUJIWARA et al., 1992). Assim, a similaridade das respostas observadas entre diferentes espécies de plantas sugerem ser este um fenômeno universal e que mudanças na proteína de reserva são reguladas a níveis de transcrição e pos-transcrição (SPENCER et al., 1990, FUJIWARA et al., 1992). Por outro lado, pouco é conhecido a respeito do efeito da metionina na síntese das proteínas de reserva entre diferentes espécies de plantas. Sabe-se que metionina afeta, especificamente, a síntese da subunidade beta das poucas variedades de soja estudadas (THOMPSON et al., 1981, HOLLOWACH et al., 1984a,b, GRABAU et al., 1986 e FUJIWARA et al., 1992) e que altera os níveis das leguminas e vicilinas de Vicia faba (BARRAT, 1984b). Portanto, é interessante ampliar estes estudos utilizando-se, inclusive, diferentes variedades de soja, principalmente aquelas obtidas no Brasil, uma vez que diferenças entre cultivares já foram observadas.

Nos dois sistemas de cultura utilizados no presente trabalho, a adição de metionina estimulou o crescimento e ocasionou variações na composição de aminoácidos livres, assim como, modificações qualitativas nas proteínas de reserva de cotilédones de soja.

Comparando-se os dois sistemas, pode-se verificar que em cultura de cotilédones isolados o aumento em peso de matéria

seca e proteínas por cotilédone foi maior do que em cultura de explantes, quando o meio básico foi complementado com metionina (Tabelas 5 e 8). Esse mesmo efeito foi observado quando metionina substituiu sulfato, indicando que o estímulo de crescimento não foi afetado pela deficiência em sulfato e que o enxofre da metionina foi, provavelmente, rapidamente utilizado na síntese de outros compostos. Entretanto, quando cotilédones isolados foram cultivados na presença de metionina mas na ausência de nitrogênio (MB-N+MET) não foi observado acúmulo de proteínas, mas um aumento substancial do peso de matéria seca, provavelmente pela utilização da sacarose do meio (Tabela 7). É interessante ressaltar que o aumento em peso de matéria seca foi bem maior quando MET estava ausente (MB-N), podendo indicar que de uma certa forma MET interfere no metabolismo dos carboidratos.

Pela análise dos aminoácidos livres (Tabela 6a), pode-se observar que metionina é rapidamente absorvida pelos cotilédones e que estes são capazes de metabolizar eficientemente esse aminoácido, uma vez que, o teor de proteínas foi 2 vezes superior em cultura de cotilédones isolados (Tabelas 5 e 8) e o nível da maioria dos aminoácidos nesses tratamentos foi superior aos do meio básico (Tabela 6a). Pode-se observar ainda que metionina é também translocada pelas vias condutoras normais chegando intacta às sementes (Tabela 9a), ao contrário do que foi observado para a GLN que não é detectada em sementes em cultura de explantes. HOLLOWACH et al., (1984a) também verificaram que suplementação de metionina em cultura de cotilédones de soja aumentou 60 vezes a

concentração intracelular de metionina livre. Entretanto, infusão de metionina em plantas intactas crescidas no campo não alterou a concentração de metionina livre nas sementes e em experimentos conduzidos em casa de vegetação o aumento foi apenas de 22,7% (GRABAU et al., 1986). Este fato foi também observado em Vicia faba, tanto em sementes cultivadas "in vitro" como em sementes crescidas "in vivo" (BARRAT, 1984a,b). Porém, o efeito da metionina observado em soja (Tabelas 5 e 8, THOMPSON et al., 1981) difere daquele observado por BARRAT (1984a) para cultura de cotilédones de Vicia faba. Neste caso a adição de metionina não estimulou crescimento ou síntese de proteínas nos cotilédones. Ao contrário, metionina a uma concentração de 1mM inibiu crescimento e síntese de proteínas nessas sementes. Inibição do crescimento foi também observada em Vigna unguiculata (DESSAUER & HANNAH, 1978), em cultura de callus de Zea mays (GREEN & PHILLIPS, 1974), em plântulas de Mimulus cardinalis (HENKE et al., 1974) e em Lemna minor (WONG & DENNIS, 1973).

Sabe-se que metionina, treonina e lisina são derivados do ácido aspártico e que as enzimas regulatórias estão sujeitas a inibição pelo aminoácido produzido ou por metabólitos estritamente relacionados (BRYAN, 1980; ROGNES et al., 1980). Devido a este fato, BARRAT (1984a) sugeriu que a inibição do crescimento de sementes de Vicia faba por metionina resultou possivelmente de uma regulação pelo produto final. É possível que a MET tenha inibido a ASP-quinase e portanto tenha faltado lisina e/ou treonina para a síntese de proteínas. Porém, atualmente, não se tem uma

explicação consistente para o fato da metionina não inibir o crescimento e síntese de proteínas em soja. Sabe-se que metionina é intermediário na síntese das poliaminas e que mudanças nos níveis dessas substâncias em cotilédones de soja foram correlacionadas com o crescimento (LIN et al., 1984). Entretanto, COKER III et al. (1987) não encontraram evidências de que o aumento de crescimento de cotilédones de soja em cultura na presença de MET tenha sido mediada por poliaminas, uma vez que MET não foi extensivamente convertida nessas substâncias. Os autores sugerem que MET deve aumentar o crescimento de cotilédones de soja não por aumento da síntese de um composto específico, mas por permitir que a síntese de uma variedade de compostos ocorram a taxas mais rápidas do que poderia ocorrer sem adição de MET. De qualquer maneira as bases bioquímicas para essas diferenças ainda não são conhecidas.

Quando as proteínas foram analisadas por eletroforese (Figuras 13, 14 e 17) observou-se que a adição de metionina (MB+MET, MB-S+MET e MB-N+MET) inibiu especificamente a síntese da subunidade beta da fração 7S não ocorrendo modificações detectáveis nas outras frações, nos dois sistemas de cultura. Este efeito também foi encontrado em outras variedades de soja (HOLLOWACH et al., 1984a,b e THOMPSON et al., 1981), inclusive com infusão direta da MET no caule de plantas intactas (GRABAU et al., 1986). Já está bem estabelecido que a inibição ocorre a nível de RNA mensageiro (CREASON et al., 1983; HOLLOWACH et al., 1986; FUJIWARA et al., 1992), podendo ser também um fator limitante, a formação

de metionil-tRNA, uma vez que foi observado um aumento específico desse RNA em cotilédones suplementados com MET (THOMPSON et al., 1981). HOLLOWACH et al. (1986) mostraram que esta inibição é reversível, ou seja, com a transferência de cotilédones crescidos em meio contendo MET para o meio básico, tanto mRNA como a subunidade beta acumularam a taxas comparáveis ao controle. Quando a transferência foi inversa, isto é, transferência dos cotilédones do meio básico para meio contendo MET, a quantidade de subunidade beta permaneceu constante, mostrando que esta subunidade é estável na presença de MET (HOLLOWACH et al., 1986). Este fato foi também verificado quando cotilédones mais velhos (100mg de peso de matéria fresca), que já continham subunidade beta, foram cultivados em presença de MET (Figura 14). Foi mostrado por MADISON et al. (1981) que proteínas de reserva de soja não sofrem "turnover" significativo durante a maturação da semente. Portanto, pode ser descartada a possibilidade de indução do aumento na taxa de degradação da subunidade beta pela metionina. Além disso, CREASON et al. (1985) verificaram que compostos análogos a metionina (p.ex. S-etilcisteína) também inibem a síntese da subunidade beta. Assim, é provável que a própria MET seja a molécula efetora nestes sistemas. Foi mostrado por CREASON et al. (1985), que a concentração de MET livre em sementes de soja em desenvolvimento decresce rapidamente na época em que a subunidade beta aparece normalmente na semente. Eles sugerem que o aparecimento tardio dessa subunidade em sementes em desenvolvimento poderia ser devido a presença de altos níveis de MET em sementes jovens.

Em plantas intactas de Vicia faba, metionina exógena injetada na base de cada vagem, causou um aumento relativo nas leguminas (11S) e um decréscimo nas vicilinas (7S) (BARRAT, 1984b). Resultados semelhantes foram obtidos por este autor, em cotilédones isolados cultivados em presença de metionina (BARRAT, 1984a). Entretanto, o autor não analisou possíveis mudanças a nível das subunidades, como foi verificado para soja.

Quando cotilédones isolados de soja foram submetidos a um meio deficiente em enxofre (MB-S), o teor de proteínas decresceu em relação ao meio básico, porém o teor de aminoácidos livres não variou sob estas circunstâncias (Tabela 5, Figura 12). Isto poderia indicar que absorção e síntese de aminoácidos ocorrem mesmo sob condições de deficiência de enxofre. BARRAT (1984a), observou que em cotilédones de Vicia faba cultivados em deficiência de enxofre ocorreu um decréscimo no teor de proteínas e um aumento no teor de aminoácidos livres. O decréscimo no teor de proteínas foi também observado por HOLLOWACH et al. (1984b) em cotilédones de soja (cv. Provar) crescidos "in vitro" em meio deficiente em enxofre. Entretanto, em várias espécies de Lupinus (GILLESPIE et al., 1978) e em Pisum sativum (RANDALL et al., 1979), os níveis de proteínas totais se mantiveram mesmo na ausência de enxofre, devido ao aumento do teor das proteínas deficientes em aminoácidos sulfurados. No caso de Pisum sativum, os dados indicam que o principal fator responsável pela diminuição do teor de leguminas (11S) sob deficiência de enxofre, foi a redução no nível do mRNA, uma vez que, quando sulfato foi suplemen-

tado em vagens isoladas o nível desse RNA foi restabelecido (CHANDLER et al., 1983 e CHANDLER et al., 1984). Porém, em cotilédones isolados, os autores não obtiveram esse padrão de recuperação mesmo adicionando outras fontes de enxofre.

No caso de cotilédones isolados de soja, todas as subunidades das conglucinininas (7S) acumularam em razão similar aos cotilédones crescidos na presença de sulfato, porém as subunidades ácidas das glicinininas (11S), as quais são ricas em aminoácidos sulfurados, foram fracamente detectadas em ausência de sulfato (figura 13). Pela eletroforese, pode-se observar nitidamente que, em relação ao controle dia zero, as subunidades ácidas, nesse tratamento, foram metabolizadas, uma vez que elas estavam presentes no controle. Apesar do efeito da ausência de sulfato ocorrer a nível de mRNA, não se pode descartar a possibilidade de mudanças nas taxas de "turnover" das proteínas sob estas circunstâncias.

HOLLOWACH et al. (1984b) não observaram mudanças na razão 11S:7S e nem síntese diferenciada entre as diferentes subunidades, na sua variedade de soja em deficiência de enxofre. Entretanto, FUJIWARA et al. (1992), trabalhando com plantas transgênicas, para observar o efeito da deficiência de enxofre na expressão dos genes das subunidades da fração 7S de soja, verificaram que estas plantas acumularam muitas vezes mais subunidade beta, enquanto que as subunidades alfa e alfa' foram poucas afetadas nesse tratamento.

Em cultura de explantes a ausência de enxofre não afetou o nível das proteínas totais, ocorrendo um pequeno aumento no teor de aminoácidos livres em relação ao meio básico (Figura 16). Foi observado, por alguns autores, que em plantas intactas, se nitrogênio é suficiente, deficiência de enxofre não inibe incorporação de nitrogênio em proteínas, ao contrário, ocorre aumento na proporção da fração proteica que não requer aminoácidos limitantes (BLAGROVE *et al.*, 1976; RANDALL *et al.*, 1979). Este fato foi confirmado em cultura de explantes, uma vez que, aparentemente a concentração da subunidade beta na ausência de enxofre superou aquela de sementes mantidas em meio básico (Figura 17). Por outro lado, as frações que requerem aminoácidos sulfurados acumularam ou não sofreram degradação, nesse sistema, quando se compara com o controle dia zero, ao contrário do que foi observado em cultura de cotilédones isolados. No caso de explantes, provavelmente, as reservas de enxofre são mobilizadas de outros tecidos para que se processe a maturação da semente e síntese de proteínas, mesmo não obtendo enxofre suficiente do meio de cultura.

Pela análise de aminoácidos livres, pode-se verificar que metionina exógena afetou significativamente a concentração de alguns aminoácidos, especialmente SER, ALA, LYS, ARG, ASP e GLU, que aumentaram em maiores proporções, nos dois sistemas (Tabelas 6a e 9a).

O catabolismo do grupo metil da metionina foi estudado em um grande número de plantas por SPLITTSTOESSER e MAZELIS (1967). Eles encontraram que 30% da radioatividade adicionada foi

convertida em ácidos orgânicos e pelo menos 45% permanecia na fração de aminoácidos. O mais interessante é que entre os aminoácidos, 50% da radioatividade foi encontrada na SER (MAZELIS, 1980). Sabe-se ainda que, 3-fosfoglicerato desidrogenase, uma das enzimas da possível rota de formação da SER, é ativada por metionina (MIFLIN e LEA, 1977). Por outro lado, ALA pode ser um importante doador de grupos aminos para o hidroxipiruvato dando origem a SER (KEYS, 1980). Esse efeito foi também observado em cultura de cotilédones isolados de Vicia faba, por BARRAT (1984a), onde a concentração de SER aumentou com a suplementação de metionina. Mais recentemente, COKER et al., (1987), investigando o metabolismo da D e L- metionina, marcada com N¹⁵, em cotilédones de soja imaturos crescidos em cultura, verificaram que 16% da L-metionina é incorporada intacta em proteínas, enquanto que 58% da L-metionina que entra nos cotilédones é degradado, sendo que o N aparece no "pool" de aminoácidos como evidenciado pela distribuição entre diferentes tipos de N (guanidino, amino e amida).

Em plantas intactas de soja GRABAU et al. (1986) também observaram aumento nos teores de SER, ALA, LYS e THR e, ao contrário do que foi observado nos dois sistemas em estudo, um decréscimo no teor de ARG em presença de MET. O mais interessante é que, em cultura de cotilédones isolados, o nível de ARG aumenta em maiores proporções à medida que enxofre está ausente do meio. Quando se compara o acréscimo de ARG nos dois sistemas, em relação ao meio básico, pode-se observar que em cultura de explantes este aumento foi maior (12,4x e 8x) do que em cultura de cotilé-

doneis isolados (1,1x e 1,7x), mas na ausência total de enxofre (MB-S) o incremento no teor de ARG foi maior em cultura de cotilédones isolados. O aminoácido ARG se destaca pelo número elevado de átomos de nitrogênio por molécula (= 4). Desta forma, é possível que o acúmulo de ARG na ausência de enxofre represente uma forma de armazenar o excesso de N solúvel gerado pela diminuída síntese de proteínas nestas condições.

É interessante observar também que o efeito da MET no teor de VAL foi diferente nos dois sistemas. Enquanto foi observado aumento no teor desse aminoácido em cultura de cotilédones isolados (1,8x), VAL não foi detectada em cultura de explantes em presença de MET. Nos experimentos de GRABAU *et al.* (1986), com infusão de MET em plantas intactas de soja, VAL também decresceu e em cotilédones isolados de Vicia faba, VAL aumentou significativamente com a adição de MET (BARRAT, 1984a).

Cotilédones isolados de soja crescidos em meio deficiente em enxofre, revelaram-se marcadamente afetados quanto à composição de aminoácidos livres, em relação a cotilédones crescidos em meio básico (Tabela 6a). Destacam-se, o aparecimento de SER, aumento em ARG e LYS e decréscimo em ALA, VAL e GABA. Em cotilédones de Vicia faba, a ausência de enxofre ocasionou um grande aumento em ALA, GABA e ARG e um decréscimo em VAL (BARRAT, 1984a). Já foi publicado que deficiência em enxofre afeta severamente a composição de aminoácidos livres em sementes de Pisum sativum em desenvolvimento, causando decréscimo em CYS e um grande aumento em ARG e ASN (MACNICOL, 1983). Em cultura de explantes

tes, ASN foi o unico aminoacido que decresceu significativamente em concentração com a ausência de enxofre, ocorrendo aumento no teor de todos os outros aminoacidos em relação ao meio básico (tabela 7a).

As bases metabólicas para as mudanças na composição de aminoacidos livres sob deficiência de enxofre, não são ainda conhecidas. Além disso, essas mudanças são variáveis, dependendo da espécie em estudo e das condições ambientais em que as plantas se desenvolvem.

6 - RESUMO

Nos dois sistemas de cultura utilizados no presente trabalho, cotilédones isolados e explantes, GLN e ASN foram igualmente eficientes em promover acúmulo de proteínas. Entretanto, a eficiência da ALN, em cotilédones isolados, foi bastante inferior a ASN e GLN. Já em cultura de explantes, a ALN superou as outras fontes de nitrogênio, uma vez que, segundo RAINBIRD et al., 1984), "in situ" os ureídeos são degradados dentro do tegumento ou vagem e o nitrogênio resultante é convertido em GLN e translocado para os cotilédones. Em ausência de N, observou-se incremento no teor de proteínas de sementes de explantes, enquanto em cotilédones isolados, apesar do aumento em peso de matéria seca, o teor de proteínas permaneceu o mesmo.

Por PAGE-SDS foi verificado que, em presença de GLN e ASN, as proteínas de reserva dos cotilédones foram sintetizadas com mais eficiência do que nas sementes crescidas "in vivo". Enquanto em sementes de explantes a ALN promoveu a síntese de todas as subunidades das proteínas de reserva, em cotilédones isolados, sua ineficiência foi confirmada. Na ausência de N, em cotilédones isolados, foi observado uma metabolização preferencial das subunidades alfa', alfa (7S) e cadeias ácidas (11S), não ocorrendo

síntese detectável da subunidade beta (7S).

Em todos os tratamentos, mudanças substanciais na composição de aminoácidos livres, foram observadas. Um dos efeitos mais interessantes foi com respeito ao teor de ARG. Enquanto que em sementes de explantes este teor decresceu igualmente em todos os tratamentos, em cotilédones isolados, GLN promoveu um aumento de 26 vezes. No sistema de cultura de explantes, não foi observado acúmulo de ASP e nem foi detectada GLN livre na semente como observado no sistema de cultura de cotilédones isolados, no tratamento com ALN.

A adição de metionina ao meio básico estimulou o crescimento e ocasionou variações na composição de aminoácidos livres e modificações qualitativas nas proteínas de reserva de cotilédones de soja. Em cotilédones isolados o aumento em peso de matéria seca e proteínas por cotilédones foi maior do que em sementes de explantes em presença de MET (MB+MET e MB-S+MET). Cotilédones crescidos em meio deficiente em enxofre (MB-S), teve 71,4% do peso de matéria fresca e 72% do peso de matéria seca dos cotilédones crescidos com sulfato (MB). Neste tratamento o teor de proteínas decresceu de 57% em relação ao MB, mas ainda alcançando o teor de proteínas das sementes desenvolvidas na planta pelo mesmo período. Em cultura de explantes, o teor de proteínas foi semelhante estatisticamente ao meio básico.

Por PAGE-SDS, observou-se que a adição de MET inibiu especificamente a síntese da subunidade beta da fração 7S não

ocorrendo modificações detectáveis nas outras frações, nos dois sistemas de cultura. HOLLOWACH et al. (1986) mostraram que esta inibição é reversível, ou seja, com a transferência dos cotilédones crescidos em meio contendo MET para o meio básico, a subunidade acumula a taxas comparáveis ao controle. Quando cotilédones mais velhos (100 mg de peso de matéria fresca) da variedade de soja estudada neste trabalho, que já continham subunidade beta, foram cultivados em presença de MET, a quantidade desta subunidade permaneceu constante, mostrando que esta é estável na presença de MET. Cotilédones isolados mantidos em meio deficiente em enxofre (MB-S) acumularam todas as subunidades das conglucinas (7S) em razão similar aos cotilédones crescidos na presença de sulfato. Nesse tratamento as subunidades ácidas das glicinas (11S) foram fracamente detectadas quando comparadas com o meio básico. Em sementes de explantes, a síntese das subunidades das proteínas de reserva não foi afetada pela ausência de enxofre no meio, porém, aparentemente, a concentração da subunidade beta superou aquela de sementes mantidas em meio básico.

Metionina exógena afetou significativamente a concentração de alguns aminoácidos, especialmente SER, ALA, LYS, ARG, ASP e GLU, que aumentaram em maiores proporções nos dois sistemas. Entretanto, o teor de VAL aumentou somente em cotilédones isolados, enquanto que em sementes de explantes este aminoácido não foi detectado. Na ausência de enxofre (MB-S), em cultura de cotilédones isolados, foi observado aparecimento de SER, aumento de LYS e ARG e um decréscimo em ALA, VAL e ASN quando comparados

com MB. Já em cultura de explantes foi observado um decréscimo em SER e ARG nesse tratamento.

Em relação a composição de aminoácidos das diferentes subunidades das proteínas de reserva de sementes quiescentes é interessante ressaltar que, na subunidade alfa' o conteúdo de HIS é cerca de 3 vezes maior do que nas outras subunidades e que a subunidade beta se destacou por possuir o nível mais baixo de metionina.

7 - BIBLIOGRAFIA

- AIKINS, C.A.; PATE, J.S.; RITCHIE, A. and PEOPLES, M.B. 1982. Metabolism and translocation of allantoin in ureide-producing grain legumes. *Plant Physiol.*, **70**: 476-482.
- AZARKOVICH, M.I. and SOBOLOV, A.M. 1990. Glutamine and asparagine as nitrogen sources for storage protein accumulation in isolated castor endosperm. *Sov. Plant Physiol.* **37**(1): 82-86.
- BARRAT, D.H.P. 1984a. Effects of nutrient supply on seed growth of field bean (Vicia faba L.). 1. Effects of different sulphur and methionine regimes on cotyledon growth, protein and uncombined amino acids in vitro. *Ann. Bot.*, **54**: 21-30.
- BARRAT, D.H.P. 1984b. Effects of nutrient supply on seed growth of field bean (Vicia faba L.). 2. Effects of exogenous methionine on growth, protein and uncombined amino acids in vivo. *Ann. Bot.*, **54**: 31-38.
- BAUER, A.; JOY, K.W. and URQUHART, A.P. 1977. Amino acids metabolism of pea leaves: labeling studies on utilization of amides. *Plant Physiol.*, **59**: 920-924.
- BAUDET, J.; HUET, J.C.; JOLIVET, E.; LESAIN, C.; MOSSE, J. and PERNOLLET, J.C. 1986. Changes in accumulation of seed nitrogen compounds in maize under conditions of sulfur deficiency. *Physiol. Plant.*, **68**: 608-614.

- BEACHY, R.N. 1980. In vitro synthesis of the alfa and alfa' subunits of the 7S storage proteins (conglycinin) of soybean seeds. *Plant Physiol.*, 65: 990-994.
- BIELESKI, L.R. and TURNER, N.A. 1966. Separation and estimation of aminoacids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and cromatography. *Anal. Biochem.*, 17: 278-293.
- HISHOP, L.R. 1930. The composition and determination of the barley proteins. *J. Inst. Brewing*, 36: 336-349, apud, PERNOLLET, 1985.
- BLAGROVE, R.J.; GILLESPIE, J.M. and RANDALL, P.J. 1976. Effects of sulphur supply on the seed globulin composition of Lupinus angustifolius. *Aust. J. Plant Physiol.*, 3: 173-184.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-251.
- BRADLEY, R.A.; ATKINSON, D.; HAUSER, H.; OLDANI, D. GREEN, J.P. and STUBBS, J.M. 1975. The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. *Biochem. Biophys. Acta*, 412(2): 214-228.
- BRAY, E.A. and BEACHY, R.N. 1985. Regulation by ABA of conglycinin expression in cultured developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.*, 79: 746-750.
- BRYAN, J.K. 1980. Synthesis of the aspartate family and branched chain amino acids. In BJ MIFLIN, ed., *The Biochemistry of Plants*, vol. 5, *Amino Acids and Derivates*. Academic Press, London, pp. 403.

CARASCO, J.F.; CROY, R.; DERBYSHIRE, E. and BOULTER, D. 1978. The isolation and characterization of the major polypeptides of the seed globulin of cowpea (Vigna unguiculata L. valp) and their sequential synthesis in developing seeds. *J. Exp. Bot.*, 29: 309-323.

CASTLE, S.L. and RANDALL, P.J. 1987. Effects of sulfur deficiency on the synthesis and accumulation of proteins in the developing wheat seed. *Aust. J. Plant Physiol.*, 14: 503 - 516.

CHANDLER, P.M.; HIGGINS, T.J.V.; RANDALL, P.J. and SPENCER, D. 1983. Regulation of legumin levels in developing pea seeds under conditions of sulfur deficiency. *Plant Physiol.*, 71: 47-54.

CHANDLER, P.M.; SPENCER, D.; RANDALL, P.J. and HIGGINS, T.J.V. 1984. Influence of sulfur nutrition on developmental patterns of some major pea seed proteins and their mRNAs. *Plant Physiol.*, 75: 651-657.

CHRISPEELS, M.J.; HIGGINS, T.J.V. and SPENCER, D. 1982. Assembly of storage protein oligomers in the endoplasmic reticulum and processing of the polypeptides in the protein bodies of developing pea cotyledons. *J. Cell Biol.*, 93: 306-313.

COATES, J.B.; MEDEIROS, J.S.; THANH, V.H. and NIELSEN, N.C. 1985. Characterization of subunits of conglitin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 243(1): 184- 194.

COKER III, G.T. and SCHAEFER, J. 1985. ¹⁵N and ¹³C NMR determination of allantoin metabolism in developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.*, 77: 129-135.

- COKER III, G.F.; GARBOW, J.R. and SCHAEFER, J. 1987. ^{15}N and ^{13}C NMR determination of methionine metabolism in developing soybean cotyledons. *Plant Physiol*, **83**: 698-702.
- CREASON, G.L.; HOLLOWACH, L.P.; THOMPSON, J.F. and MADISON, J.F. 1983. Exogenous methionine depresses level of mRNA for a soybean storage protein. *Biochem. Biophys. Res.*, **117**(3): 658-662.
- CREASON, G.L.; THOMPSON, J.F. and MADISON, J.T. 1985. Methionine analogs inhibit production of beta-subunit of soybean 7S protein. *Phytochemistry*, **24**(6): 1147-1150.
- DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J. and BOULTER, D. 1976. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, **15**: 3-24.
- DE RUITER, H. and KOLLOFFEL, C. 1982. Activity of enzymes of arginine metabolism in the cotyledons of developing and germinating pea seeds. *Plant Physiol.*, **70**: 313-315.
- DE RUITER, H. and KOLLOFFEL, C. 1983. Arginine catabolism in the cotyledons of developing and germinating pea seeds. *Plant Physiol.*, **73**: 525-528.
- DESSAUER, D.W. and HANNAH, C.L. 1978. Inhibition of cowpea seedling growth by methionine analogs. *Crop. Science*, **18**: 593-597.
- DILWORTH, M.F.; and DURE III, L. 1978. Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. *Plant Physiol.*, **61**: 698-702.

- DOLL, H. 1984. Nutritional aspects of cereal proteins and approaches to overcome their deficiencies. In L. FOWDEN & B.J. MIFLIN. eds., **Seed storage proteins**. The Royal Society, London.
- DOMONEY, C.; DAVIES, D.R. and CASEY, R. 1980. The initiation of legumin synthesis in immature embryos of Pisum sativum L. grown in vivo and in vitro. **Planta**, **149**: 454-460.
- DYER, D.J.; COTTERMAN, C.D. AND COTTERMAN, J.C. 1987. Comparison of in situ and in vitro regulation of soybean seed growth and development. **Plant Physiol.**, **84**: 298-303.
- EINARSSON, S.; JOSEFSSON, B. and LAGERKVIST, S. 1983. Determination of amino acids with 9-fluoronylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, **282**: 609-618.
- EISENBERG, A.J. and MASCARENHAS, J.P. 1985. Abscisic acid and the regulation of synthesis of specific seed proteins and their messenger RNAs during culture of soybean embryos. **Planta**, **166**: 505-514.
- EVANS, M.I.; GATEHOUSE, J.A. and BOULTER, D. 1985. Regulation of storage-protein synthesis in pea (Pisum sativum L.) cotyledons under conditions of sulphur deficiency. **Biochem. J.**, **232**: 261-265.
- FADER, G.M. and KOLLER, H.R. 1985. Seed growth rate and carbohydrate pool sizes of the soybean fruit. **Plant Physiol.**, **79**: 663-666.

- FOUNTAIN, D.W.; OUTRED, H.A.; HOLDSWORTH, J.M. and THOMAS, R.G. 1989. Seed development in Phaseolus vulgaris L. cv. seminole. I. Developmental independence of seed maturation. **Plant Physiol.**, 89: 333-340.
- FUJIWARA, T.; HIRAI, M.Y.; CHINO, M.; KOMEDA, Y. and NAITO, S. 1992. Effects of sulphur nutrition on expression of the soybean seed storage protein genes in transgenic petunia. **Plant Physiol**, 99: 263-268.
- ~~GATHOUSE, I.; EVANS, M.; BOWN, D.; CROY, R.R.D. and BOULTER, D. 1982. Control of storage protein synthesis during seed development in pea (Pisum sativum L.). **Biochem. J.**, 208: 119-127.~~
- GAYLER, K.R. and SYKES, G. 1981. Conglycinins in developing soybean seeds. **Plant Physiol.**, 67: 958-961.
- GAYLER, K,R. and SYKES, G.E. 1985. Effects of nutritional stress on the storage proteins of soybeans. **Plant Physiol**, 78: 582-585.
- GIFFORD,R.M. and THORNE, J.H. 1986. Phloem unloading in soybean seed coats: dynamics and stability of efflux into attached "empty ovules". **Plant Physiol.**, 80: 464-469.
- GILLESPIE, J.M., BLAGROVE, R.J. and RANDALL, P.J. 1978. Effects of sulphur supply on the seed globulin composition of various species of Lupin. **Aust. J. Plant. Physiol.**, 5: 641-650.
- GIVAN, C.V. 1980. Aminotransferases in higher plants. In B.J. MIFLIN, ed. **The Biochemistry of Plants**, vol.5: **Amino Acids and Derivates**. Academic Press, London, pp. 329.

- GOLDBERG, R.B.; BARKER, S.J. and PEREZ-GRAU, L. 1989. Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell*, **56**: 149-160.
- GOMES, M.A.F. and SODEK, L. 1984. Allantoinase and asparaginase activities in maturing fruits of nodulated and non-nodulated soybeans. *Physiol. Plant.*, **62**: 105-109.
- GRABAU, L.J.; BLEVINS, D.L. and MINOR, H.C. 1986. Stem infusions enhanced methionine content of soybean storage protein. *Plant Physiol*, **82**: 1013-1018.
- GREEN, C.E. and PHILLIPS, R.L. 1974. Potential selection system for mutants with increased lysine, threonine and methionine in cereal crops. *Crop. Science*, **14**: 827-830.
- HAGA, K.I. 1982. *Nutrição Nitrogenada do Cotilédone Imaturo de Soja*. Tese de Mestrado. Inst. de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP.
- HAGA, K.I. and SODEK, L. 1987. Utilization of nitrogen sources by immature soybean cotyledons in culture. *Ann. Bot.*, **59**: 597-601.
- HARADA, J.J.; BARKER, S.J. and GOLDBERG, R.B. 1989. Soybean conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and post-transcriptional processes. *Plant Cell*, **1**: 415-425.
- HENKE, R.R.; WILSON, K.G.; McCLURE, J.W. and TREICK, R.W. 1974. Lysine-methionine-threonine interations in growth and development of *Minulus cardinalis* seedlings. *Planta*, **116**: 333-345.

HIGGINS, T.J.V. 1984. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **35**: 191-221.

HILL, J.E. and BREIDENBACH, R.W. 1974. Proteins of soybean seeds. I. Isolation and characterization of the major components. *Plant Physiol.*, **53**: 742-746.

HIRANO, H. ; KAGAWA, H.; KAMATA, Y. and YAMAUCHI, F. 1987. Structural homology among the major 7S globulin subunits of soybean seed storage proteins. *Phytochemistry*, **26**(1): 41-45.

HOAGLAND, D.R. and ARNON, D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Exp. Sta. Circ.* **347**

HOLLOWACH, L.; THOMPSON, J.F. and MADISON, J.T. 1984a. Effects of exogenous methionine on storage protein composition of soybean cotyledons cultured in vitro. *Plant Physiol.*, **74**: 576-583.

HOLLOWACH, L.; THOMPSON, J.F. and MADISON, J.T. 1984b. Storage protein composition of soybean cotyledons grown in vitro in media of various sulfate concentrations in the presence in the absence of endogenous L-methionine. *Plant Physiol.*, **74**: 584-589.

HOLLOWACH, L.; MADISON, J.T. and THOMPSON, J.F. 1986. Studies of mechanism of regulation of the mRNA level for a soybean storage protein subunit by exogenous L-methionine. *Plant Physiol.*, **80**: 561-567.

HSU, F.C.; BENNETT, A.B. and SPANSWICK, R.M. 1984. Concentrations of sucrose and nitrogenous compounds in the apoplast of developing soybean seed coat and embryos. *Plant Physiol.*, **75**: 181-186.

IRELAND, R.J. and JOY, K.W. 1981. Two routes for asparagine metabolism in Pisum sativum L. *Planta*, **151**: 289-292.

KEIS, A.J. 1980. Synthesis and interconversion of glycine and serine. In B.J. MIFLIN, ed. *The Biochemistry of Plants*, vol.5: Amino Acids and Derivates. Academic Press, London, pag. 359.

KISHINAMI, I. 1987. Accumulation of gama-aminobutyric acid due to ammonium in various cultured plant cells. *Plant Cell Physiol.*, **28**(8): 1459-1464.

KISHINAMI, I. 1988. *Plant Cell Physiol.*, **29**: 581, apud SATYA-NARAYAN & NAIR, 1990.

KISHINAMI, I. and OJIMA, K. 1980. Accumulation of gama-aminobutyric acid due to adding ammonium or glutamine to cultural rice cells. *Plant Cell Physiol.*, **21**: 581-589.

KITAMURA, K. and KAIZUMA, N. 1981. Mutant strains with low level of nutrients of 7S blogulin in soybean (Glicine max Men.) seed. Apud GRABAU et al., 1986.

KITAMURA, K.; TAKAGI, T. and SHIBASAKI, K. 1976. Subunit structure of soybean 11S globulin. *Agric. Biol. Chem.*, **40**: 1837-1844.

KITAMURA, K.; TOYOKAWA, Y. and HARADA, K. 1980. Polymorfism of of glycinin in soybean seeds. *Phytochemistry*, **19**: 1841-1843.

KONDO, K.; SUGIMOTO, T. and KIOKO SAIO. 1986. Changes in storage protein components of developing soybean seeds (Glicine max Erei.) *Agric. Biol. Chem.*, **50**(30): 581-587.

- KOSHIYAMA, I. 1983. Storage proteins of soybean. In W.GOTTSCHALK & H.P.MULLER, eds., **Seed Proteins**. Junk Publishers, The Hague. 427-450.
- LADIN, B.F.; TIERNEY, M.L.; MEINKE, D.W.; HUSAGADI, P.; VEITH, M. and BEACHY, R.N. 1987. Developmental regulation of conglycinin in soybean axis and cotyledons. **Plant Physiol.**, **84**: 35-41.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t₄. **Nature**, **227**: 680-685.
-
- LAHDESMÄKI, P. 1968. The amount of gamma-aminobutyric acid and the activity of glutamic decarboxylase in ageing leaves. **Physiol. Plant.**, **21**: 1322-1327.
- LARKINS, B.A. 1981. Seed storage proteins: Characterization and biosynthesis. In A. MARCUS, ed., **The Biochemistry of Plants**, vol.6: **Proteins and Nucleic Acids**. Academic Press, LONDON, pp. 449.
- LEA, P.J.; HUGHES, J.S. and MIFLIN, B.J. 1979. Glutamine and asparagine-dependent protein synthesis in maturing legume cotyledons cultured in vitro. **J. Exp. Bot.**, **30**(116): 529-537.
- LEGENDRE, N. and MATSUDAIRA, P. 1989. Purification of proteins and peptides by SDS-PAGE. IN. **A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing**. Millipore Corporation, Academic Press, Massachusetts.
- LIN, P.P.C.; EGLI, D.B.; and MECKEL, L. 1984. Polyamine titer in the embryonic axis and cotyledons of Glicine max (L.) during seed growth and maturation. **Plant Physiol.**, **76**: 366-371, **apud COKER III et. al.**, 1987.

- LINSMAIER, E.M. and SKOOG, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **18**: 100-127.
- LUTHE, D.S. 1987. Storage protein synthesis during oat (Avena sativa L.) seed development. *Plant Physiol.*, **84**: 337-340.
- MACNICOL, P.K. 1983. Developmental changes in the free amino acid of pea cotyledons (Pisum sativum L.). *Plant Physiol.*, **72**: 492-497.
-
- MADISON, J.T.; THOMPSON, J.F. and MUENSTER, A.E. 1981. Turnover of storage protein in seeds of soya bean and pea. *Ann. Bot.*, **47**: 65-73.
- MATSUDAIRA, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.*, **262**(21): 10035-10038.
- MAZELIS, M. 1980. Amino acid catabolism. In B.J. MIFLIN, ed., *The Biochemistry of Plants*, vol 5: Amino acids and derivatives. Academic Press, LONDON, pp. 542.
- MEINKE, D.W., CHEN, J. and BEACHY, R.N. 1981. Expression of storage-protein genes during soybean seeds development. *Planta*, **153**: 130-139.
- MICALLEF, B.J. and SHELP, B.J. 1989a. Arginine metabolism in developing soybean cotyledons. I. Relationship to nitrogen nutrition. *Plant Physiol.*, **90**: 624-630.
- MICALLEF, B.J. and SHELP, B.J. 1989b. Arginine metabolism in developing soybean cotyledons. II. Biosynthesis. *Plant Physiol.*, **90**: 631-634.

- MICALLEF, B.J. and SHELP, B.J. 1989c. Arginine metabolism in developing soybean cotyledons. III. Utilization. **Plant Physiol.**, 90: 170-174.
- MIFLIN, B.J. and LEA, P.J. 1977. Amino acid metabolism. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, 28: 299-329.
- MILLERD, A. 1975. Biochemistry of legume seed protein. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, 26: 53-72.
-
- MILLERD, A.; SPENCER, D. DUDMAN, W.F. and STILLER, M. 1975. Growth of immature pea cotyledons in culture. **J. Plant Physiol.**, 2: 51-90.
- MISRA, S. and OAKS, A. 1985. Glutamine metabolism in corn kernels cultured in vitro. **Plant Physiol.**, 77: 520-523.
- MOREIRA, M.A.; HERMODSON, M.A. LARKINS, B.A. and NIELSEN, N.C. 1979. Partial characterization of the acid and basic polypeptides of glicinin. **J. Biol. Chem.**, 254(19): 9921-9926.
- MOREIRA, M.A.; HERMODSON, M.A. LARKINS, B.A. and NIELSEN, N.C. 1981. Comparison of the primary structure of the acids polypeptides of glicinin. **Arch. Biochem. Biophys.**, 210(2): 633-642.
- MORRIS, C.J. and THOMPSON, J.F. 1977. Formation of N-acetylglutamate by extracts of higher plants. **Plant Physiol.** 59: 684-687.
- MOSQUIM, P.R. 1989. Cultura "In Vitro" de "Explants" de Soja (Glicine Max L. Merrill): Desenvolvimento da Técnica e Avaliação de Diferentes Fontes de Nitrogênio. Tese de Doutorado. Inst. de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP.

MOSQUIM, P.R. and SODEK, L. 1991. Culture of soybean fruit explants: growth conditions and efficiency of nitrogen sources for reserve protein synthesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 27(1): 71-76.

MOSQUIM, P.R. and SODEK, L. 1992. Partitioning of nitrogen in soybean fruit explants cultured with glutamine, asparagine or allantoin. *Plant Physiol. Biochem.*, 30(4): 451-457.

MURRAY, D.R. 1983. Changes in free amino acids and amide composition during fruit and seed development of garden pea, *Pisum sativum* L. *New Phytol.*, 93: 33-41.

MURRAY, D.R. and CORDOVA-EDWARDS. 1984. Amino acid and amide metabolism in the bulbs and seeds of developing fruits of garden pea, *Pisum sativum* L. *New Phytol.*, 97: 243-252.

NASHOLM, T.; SANDBERG, G. and ERICSSON A. 1987. Quantitative analysis of amino acids in conifer tissues by high-performance liquid chromatography and fluorescence-detection of their 9-fluorenylmethylchloroformate derivatives. *J. Chromatogr.* 396: 225-236.

NIELSEN, N.C. 1984. The chemistry of legume storage proteins. In L. FOWDEN & B.J. MIFLIN, ed., *Seed storage proteins*. The Royal Society, London, pp. 287-297.

NIELSEN, N.C.; DICKINSON, C.D.; CHO, T.J.; THANH, V.H.; SCALLON, B.J.; FISHER, R.L.; SIMS, T.L.; DREWS, G.N. and GOLDBERG, R.B. 1989. Characterization of the glycinin gene family in soybean. *Plant Cell*, 1: 313-328.

- OBENDORF, R.L.; TIMPO, E.E.; BYRNE, M.C.; TOAI, T.V.; RYTKO, G.T. HSU, F.C. and ANDERSON, B.G. 1984. Soya bean seed growth and maturation in vitro without pods. *Ann. Bot.*, 53: 853 - 863.
- OCHIAI-YANAGI, S.; FUCAZAWA, C. and HARADA, K. 1978. Formation of storage proteins components during soybean seed development. *Agric. Biol. Chem.*, 42(4): 697-702.
- OHYAMA, T. and KUMAZAWA, K. 1979. Assimilation and transport of nitrogenous compounds originated from $^{15}\text{N}_2$ fixation and $^{15}\text{NO}_3$ absorption. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25: 9-19.
-
- PATE, J.S. and HOCKING, P.S. 1978. Phloem and xylem transport in the supply of minerals to a developing legume (Lupinus albus L.) fruit. *Ann. Bot.*, 42: 911-921.
- PATRICK, J.W. and McDONALD, R. 1980. Pathway of carbon transport within developing ovules of Phaseolus vulgaris L. *Austr. J. Plant Physiol.*, 7: 671-684.
- PERNOLLET, J.C. 1985. Biosynthesis and accumulation of storage proteins in seeds. *Physiol. Vég.*, 23(1): 45-59.
- PEOPLES, M.B.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. and MURRAY, D.R. 1985. Nitrogen nutrition and metabolic interconversions of nitrogenous solutes in developing cowpea fruits. *Plant. Physiol.*, 77: 382-388.
- QI, X.; WILSON, K.A. and TAN-WILSON, A.L. 1992. Characterization of the major protease involved in the soybean conglycinin storage protein mobilization. *Plant Physiol.*, 99: 725-733.

- RAINBIRD, R.M.; THORNE, J.H. and HARDY, R.W. 1984. Role of amides, amino acids and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. *Plant Physiol.*, **74**: 329-334.
- RANDALL, P.; THOMSON, J.A. and SCHROEDER, H.E. 1979. Cotyledonary storage proteins in Pisum sativum. IV. Effects of sulfur, phosphorus, potassium and magnesium deficiencies. *Aust. J. Plant Physiol.*, **6**: 11-24.
- ROCHAT, C. and BOUTIN, J.P. 1991. Metabolism of phloem-borne amino acids in maternal tissues of fruit of nodulated or nitrate-fed pea plants (Pisum sativum L.). *J. Exp. Bot.*, **42**(235): 207-214.
- ROGNES, S.E.; LEA, P.J. and MIFLIN, B.S. 1980. S-adenosylmethionine - a novel regulator of aspartate kinase. *Nature*, **287**: 357-359.
- SATHE, S.K. 1991. Isolation and characterization of the protein that co-purifies with soybean (Glycine max L.) glycinin. *J. Food Biochem.*, **15**: 33-49.
- SATYA-NARAYAN, V. and NAIR, P.M. 1990. Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry*, **29**(2): 367-375.
- SELMAN, I.W. and COOPER, P. 1978. Changes in free amino compounds in young tomato plants in light and darkness with particular reference to 4-aminobutyric acid. *Ann. Bot.*, **42**: 627-636.
- SHEWRY, P.R.; FRANKLIN, J.; PARMAR, S.; SMITH, S.J. and MIFLIN, B.J. 1983. The effects of sulphur starvation on the amino acid and protein compositions of barley grain. *J. Cereal Sci.*, **1**: 21-31.

SHEWRY, P.R.; MIFLIN, B.J. and KASARDA, D.D. 1984. The structural and evolutionary relationships of the prolamin storage proteins of barley, rye and wheat. In L.FOWDEN & BJ MIFLIN, eds., **Seed Storage Proteins**. The Royal Society, London.

SKOKUT, T.A.; VARNER, J.E.; SCHAEFER, J.; STEJSKAL, E.O. and MCKAY, R.A. 1982. (¹⁵N)NMR determination of asparagine and glutamine nitrogen utilization for synthesis of storage protein in developing cotyledons of soybean in culture. **Plant Physiol.**, 69: 308-313.

SNEDECOR, G.W. and COCHRAN, W.G. 1967. **Statistical Methods**. 6th ed., Iowa State University Press, Ames.

SODEK, L.; LEA, P.J. and MIFLIN, B.J. 1980. Distribution and properties of a potassium-dependent asparagine isolated from developing seeds of Pisum sativum and other plants. **Plant Physiol.**, 65: 22-26.

SPENCER, D. 1984. The physiological role of storage proteins in seeds. In L. FOWDEN & B.J. MIFLIN, ed., **Seed Storage Protein**. The Royal Society, LONDON, pp. 275-285.

SPENCER, D.; RERIE, G.W.; RANDALL, P.J. and HIGGINS, T.J.V. 1990. The regulation of pea seeds storage protein genes by sulfur stress. **Aust. J. Plant Physiol.**, 17: 355-363.

SPIELMANN, A.; SCHURMANN, P. and STUTZ, E. 1982. Gel electrophoretic characterization of protein fractions from soybean during seed development. **Plant Sci. Lett.**, 24: 137-145.

SPLITTSTOESSER, W.E. and MAZELIS, M. 1967. **Phytochemistry**, 6: 39-47; **Apud MAZELIS**, 1980.

- THANH, V.H. and SHIBASAKI, K. 1977. Conglycinin from soybean proteins isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. **Biochem. Biophys. Acta**, 490(2): 370-384.
- THANH, V.H. and SHIBASAKI, K. 1978. Major proteins in soybean seeds subunits structure of conglycinin. **J. Agric. Food Chem.**, 26(3): 692-695.
- THOMAS, R.J. and SCHRADER, L.E. 1981a. Ureide metabolism in higher plants. **Phytochemistry**, 20: 361-371.
- THOMAS, R.J. and SCHRADER, L.E. 1981b. The assimilation of ureide in shoot tissues of soybeans. 1. Changes in allantoinase activity and ureide contents of leaves and fruits. **Plant Physiol.**, 67: 973-976.
- THOMPSON, J.F. 1980. Arginine synthesis, proline synthesis and related processes. In B.J. MIFLIN, ed., **The Biochemistry of Plants**, vol 5: **Amino Acids and Derivates**. Academic Press, London, pp. 375-402.
- THOMPSON, J.F.; MADISON, J.T. and MUENSTER, A.M.E. 1977. In vitro culture of immature cotyledons of soya bean (Glycine max L. Men). **Ann. Biol.**, 41: 29-39.
- THOMPSON, J.F.; MADISON, J.T.; WATERMAN, M.A. and MUENSTER, A.M. E. 1981. Effect of methionine on growth and protein composition of cultured soybean cotyledons. **Phytochemistry**, 20(5): 941-945.
- THORNE, J.H. 1979. Assimilate redistribution from soybean pod walls during seed development. **Agron. J.**, 71: 812-816.

- STASWICK, P.E. 1989. Preferential loss of an abundant storage protein from soybean during seed development. *Plant Physiol.*, **90**: 1252-1255.
- STASWICK, P.E.; HERMODSON, M.A. and NIELSEN, N.C. 1984. Identification of the cysteines which link the acidic and basic components of the glycinin subunits. *J. Biol. Chem.*, **259**: 13431-13435.
- STASWICK, P.E. and NIELSEN, N.C. 1983. Characterization of a soybean cultivar lacking certain glycinin subunits. *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**: 1-8.
- STASWICK, P.E.; HERMODSON, M.A. and NIELSEN, N.C. 1981. Identification of the acidic and basic subunit complexes of glycinin. *J. Biol. Chem.*, **256**(16): 8752-8755.
- STEWART, G.R. and LARHER, F. 1980. Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. In B.J. MIFLIN, ed., *The Biochemistry of Plants*, vol.5, **Amino Acids and Derivatives**. Academic Press, London, pp.609.
- SUN, S.M.; MUTSCHLER, M.A.; BLISS, F.A. and HALL, T.C. 1978. Protein synthesis and accumulation in bean cotyledons during growth. *Plant Physiol.*, **61**: 918-923.
- SYKES, G.E. and GAYLER, K.R. 1981. Detection and characterization of a new beta-conglycinin from soybean seeds. *Archs. Biochem. Biophys.*, **210**(2): 525-530.
- TEKRONY, D.M.; EGLI, B.D.; BALLE, J.; PFEIFFER, T. and FELLOWS, R.J. 1979. Physiological maturity in soybean. *Agron. J.*, **71**: 771-775.

- THORNE, J.H. 1980. Kinetics of ^{14}C -photosynthase uptake by developing fruit. *Plant Physiol.*, 65: 975-979.
- THORNE, J.H. 1985. Phloem unloading of C and N assimilates in developing seed. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 36: 317-343.
- THORNE, J.H. and RAINBIRD, R.M. 1983. An in vivo technique for the study of phloem unloading in seed coats of developing soybean seeds. *Plant Physiol.*, 72: 268-271.
- TIERNEY, M.L.; BRAY, E.A.; ALLEN, R.D.; DROWG, R.F.; SLINGHTOM, J. and BEACHY, R.N. 1987. Isolation and characterization of a genomic clone encoding the beta-subunit of conglycinin. *Planta*, 172: 356-363.
- TONIN, G.S. 1988. **Influência da Fonte de Nitrogênio na Atividade de Enzimas Envolvidas no Processo de Assimilação de Amidas e Ureídeos em Cotilédones Imaturos de Soja Mantidos em Cultura.** Tese de Doutorado, Inst. Biologia, UNICAMP, Campinas, SP.
- TONIN, G.S. and SODEK, L. 1990. Asparaginase, allantoinase and glutamine synthetase activities in soybean cotyledons growth in vitro. *Phytochemistry.*, 29(9): 2829-2831.
- TUMER, N.E.; THANH, V.H. and NIELSEN, N.C. 1981. Purification and characterization of mRNA from soybean seeds. Identification of glycinin and conglycinin precursors. *J. Biol. Chem.*, 256(16): 8756-8760.
- TUMER, N.E.; RICHTER, J.D. and NIELSEN, N.C. 1982. Structural characterization of the glycinin precursors. *J. Biol. Chem.*, 257(8): 4016-4018.

- WALLADE, W. ; SECOR, J. and SCHRADER, L. 1984. Rapid accumulation of gamma-aminobutyric acid and alanin in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation. *Plant Physiol.*, 75: 170-175.
- WAREMBOURG, F.R. and FERNANDES, M.P. 1985. Distribution and remobilization of symbiotically fixed nitrogen in soybean (Glycine max). *Physiol. Plant.*, 65: 281-286.
- WETTLAUFER, S.H. and OBENDORF, R.L. 1991. Ureides and amides as nitrogen sources of soybean growth and maturation in vitro. *Crop. Science* 1: 1319-1323.
- WILSON, K.A.; RIGHTMIRE, B.R.; CHEN, J.C. and WILSON, A.L. 1986. Differential proteolysis of glycinin and conglycinin polypeptides during soybean germination and seedling growth. *Plant Physiol.*, 82: 71-76.
- WOLF, W.J. and BRIGGS, D.R. 1956. Ultracentrifugal investigation of the effect of neutral salts on the extraction of soybean proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 63: 40-49, apud HILL & BREIDENBACH, 1974.
- WOLSWINKEL, P. and DE RUITER, H. 1985. Amino acid release from the seed coat of developing seeds of Vicia faba and Pisum sativum. *Ann. Bot.*, 55: 283-287.
- WONG, K.F. and DENNIS, D.T. 1983. Aspartokinase in Lemna minor L. *Plant Physiol.*, 82: 327-331.
- WRIGHT, D.J. and BOULTER, D. 1972. The characterization of vicilin during seed development in Vicia faba (I). *Planta*, 105: 60-65.

WRIGLEY, C.W.; CROS, D.L.; FULLINGTON, J.G. KASARADA, D.D. 1984. Changes in polypeptides compositions and grain quality due to sulfur deficiency in wheat. *J. Cereal Sci.*, 2: 15-24.

YAMAUCHI, F. and YAMAGISHI, I. 1979. Carbohydrate sequences of a soybean 7S protein. *Agric. Biol. Chem.*, 43: 505-510.

YANG, L. J.; BARRATT, D.H.P.; DOMONEY, C.; HEDLEY, C.L. and WANG, T.L. 1990. An analysis of seed development in *Pisum sativum* X. Expression of storage protein genes in cultured embryos. *J. Exp. Bot.*, 41(224): 283-288.

YEMM, E.M. and COOKING, E.C. 1955. Estimation of amino acids by ninhydrin. *Analyst*, 80: 209-213.