



ANGELA PIERRE VITÓRIA 833

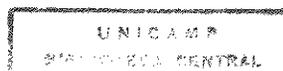
PROPRIEDADES DA ASPARAGINASE E DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS EM ALGUMAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Crotalaria*

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a) Angela Pierre Vitória e aprovada pela Comissão Julgadora. 12
08
94

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

Orientador: Prof. Dr. Ladaslav Sodek †

CAMPINAS, SP, 1994



118 114

Ofereço este trabalho ao meu orientador Sodek e aos meus pais Angelo e Irma.

*"...E assim
chegar e partir
São só dois lados da mesma viagem
O trem que chega é o mesmo trem da partida
A hora do encontro é também despedida
A plataforma desta estação
É a vida desse meu lugar
É a vida desse meu lugar
É a vida..."*

"Milton Nascimento"

AGRADECIMENTOS

Aos professores do curso de Biologia Vegetal pelos ensinamentos transmitidos e aos funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP pelo auxílio constante.

Ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP pelo uso dos equipamentos.

Aos professores da pré-banca e da banca pelas sugestões e colaborações que deram a este trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao Leandro pela ajuda na escolha das espécies e ao Professor Jorge Tamashiro pela identificação das mesmas.

Ao professor Santoro, ao Mauro e a Maristela pelo auxílio com as fotos.

Ao Claudio pela paciência e ajuda na confecção dos gráficos.

A todos os colegas do Departamento de Fisiologia pela convivência e pelo constante bom humor.

Aos queridos amigos Alexandra, Cláudia, Cláudio, Cyntia, Fernandinha, Luciana, Maristela, Mauro e Roberta pelo apoio, carinho e atenção que sempre tiveram comigo e com meus ideais.

Aos meus maravilhosos irmãos Daniel e Marcos pelos poucos, mas excelentes finais de semana que passamos juntos, agradeço todo carinho e alegria que sempre me deram.

À minha grande amiga Eliana pelo convívio diário, pelas gargalhadas, pela paciência, por ter tornado o meu ambiente de trabalho um lugar aconchegante e principalmente pela boa vontade que sempre teve em me ensinar as coisas dentro e fora do laboratório.

Ao meu querido orientador Professor Dr. Ladaslav Sodek por toda atenção, paciência e estímulo que sempre dedicou a mim. Por todos os ensinamentos destes anos e principalmente por ter me dado a oportunidade deste trabalho em conjunto.

Aos meus queridos pais Angelo e Irma por todas as oportunidades que me proporcionaram, pela formação, compreensão, estímulo e dedicação. Peço desculpas pela ausência em todos estes anos e agradeço tudo que fizeram por mim. "Quando eu crescer quero ser igual a vocês !"

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE TABELAS	IV
ÍNDICE DAS FIGURAS	V
RESUMO	VII
SUMMARY	IX
1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVO	14
3.MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1-ESPÉCIES ESTUDADAS	15
3.2-DETERMINAÇÃO DA DEPENDÊNCIA DE K ⁺ PARA ASPARAGINASE (ASNase).....	16
3.2.1-Cultivo das plantas	16
3.2.2-Extração de ASNase	16
3.2.3-Dosagem de ASNase.....	17
3.2.4-Characterização da ASNase	17
3.3-ENSAIO IMUNOQUÍMICO.....	19
3.3.1-Cultivo das plantas	19
3.3.2-Preparação das amostras	19
3.3.3-Eletroforese em gel de poliacrilamida	20
3.3.4- Eletrotransferência e ensaio imunoquímico.....	22
3.3.5- Imunodifusão	24

3.4-DOSAGEM DE AMINOÁCIDOS E UREÍDEOS EM EXUDATO	
DO XILEMA.....	25
3.4.1-Cultivo das plantas.....	25
3.4.2-Extração do exudato.....	27
3.4.3-Dosagem de ureídeos.....	28
3.4.4-Dosagem de aminoácidos livres totais.....	28
3.5-CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	30
3.5.1-Derivação dos aminoácidos.....	30
3.5.2- Separação e quantificação dos aminoácidos.....	31
4-RESULTADOS.....	32
4.1-DEPENDÊNCIA DA ENZIMA ASNase AO ÍON K ⁺	32
4.2-ENSAIOS IMUNOQUÍMICOS.....	37
4.2.1-IMUNODIFUSÃO.....	37
4.2.2-ELETROFORESE E TRANSFERÊNCIA DAS BANDAS.....	37
4.3-UREÍDEOS.....	40
4.4-AMINOÁCIDOS.....	43
4.4.1- Aminoácidos livres totais.....	43
4.4.2- Composição de aminoácidos livres.....	46

5-DISCUSSÃO	49
5.1-DEPENDÊNCIA DA ENZIMA ASNase AO ÍON K ⁺	49
5.2-ENSAIOS IMUNOQUÍMICOS	51
5.2.1-IMUNODIFUSÃO	52
5.2.2-TESTE IMUNOLÓGICO EM MEMBRANA DE NITROCELULOSE	53
5.3-UREÍDEOS E AMINOÁCIDOS	54
6-BIBLIOGRAFIA	58

ÍNDICE DAS TABELAS

TABELA 1- Distribuição das formas de ASNase dependente e independente de K^+ em sementes imaturas de leguminosas do gênero *Crotalaria* 33

TABELA 2- Porcentagem de aminoácidos na seiva xilemática de algumas espécies de *Crotalaria* em diferentes tipos de tratamento e estágio de desenvolvimento. 47

ÍNDICE DAS FIGURAS

FIGURA 1-Esquema de montagem da placa de eletrotransferência com o gel e a membrana	22
FIGURA 2-Aspecto da raiz não nodulada de <i>Crotalaria juncea</i>	26
FIGURA 3-Aspecto da raiz nodulada de <i>Crotalaria juncea</i>	26
FIGURA 4-Coleta do exsudato do xilema.....	27
FIGURA 5- Morfologia foliar (unifoliolada) de <i>Crotalaria spectabilis</i>	34
FIGURA 6- Morfologia foliar (trifoliolada) de <i>Crotalaria zanzibarica</i>	34
FIGURA 7 -Atividade de ASNase dependente de K^+ obtido em sementes imaturas de <i>Crotalaria</i>	35
FIGURA 8 - Atividade de ASNase independente de K^+ obtido em sementes imaturas de <i>Crotalaria</i>	36
FIGURA 9- Membrana de nitrocelulose mostrando a reação positiva do anticorpo produzido a partir da enzima ASNase purificada de <i>Lupinus polyphyllus</i> com o extrato bruto de sementes imaturas de <i>Crotalaria juncea</i>	38
FIGURA 10-Membrana de nitrocelulose mostrando a reação positiva do anticorpo produzido a partir da enzima ASNase purificada de <i>Lupinus polyphyllus</i> com o extrato bruto de sementes imaturas de <i>Crotalaria striata</i>	39
FIGURA 11- Membrana de nitrocelulose mostrando a reação positiva do anticorpo produzido a partir da enzima ASNase purificada de <i>Lupinus polyphyllus</i> com o extrato bruto de sementes imaturas da mesma espécie	39

FIGURA 12 - Teor de ureídeos do exsudato de espécies de *Crotalaria* não noduladas em estádios de desenvolvimento vegetativo e floral 41

FIGURA 13 - Teor de ureídeos do exsudato de espécies de *Crotalaria* noduladas e não noduladas e em estádios de desenvolvimento vegetativo e floral 42

FIGURA 14 - Teor de aminoácidos livres do exsudato de todas as espécies de *Crotalaria* noduladas e não noduladas e em estádios de desenvolvimento vegetativo e floral. 44

FIGURA 15 - Teor de aminoácidos livres do exsudato de espécies de *Crotalaria* noduladas e não noduladas e em estádios de desenvolvimento vegetativo e floral. 45

RESUMO

O aminoácido asparagina (ASN) é um dos principais compostos nitrogenados transportado pelos vasos condutores das plantas, principalmente nas leguminosas. O nitrogênio (N) que constitui este aminoácido é reutilizado nos órgãos em formação da planta (órgãos dreno) para a síntese de proteínas e compostos nitrogenados em geral. No entanto, existe a necessidade de metabolização da ASN para que este N apresente-se na forma livre e portanto possa ser reutilizado.

São conhecidas duas enzimas capazes de metabolizar a ASN: Asparagina Transaminase e Asparaginase (ASNase). A presença da enzima ASNase é de extrema importância, pois apresenta um papel regulatório na metabolização da ASN, como por exemplo neste trabalho, em que se estudou sementes imaturas, onde este aminoácido é degradado no início do desenvolvimento, quando a necessidade de nutrientes é maior e a atividade desta enzima é alta.

Existem duas formas de ASNase, uma dependente e outra independente do íon potássio (K^+), porém as duas formas nunca foram encontradas juntas numa mesma espécie. Deste modo, investigou-se treze espécies do gênero *Crotalaria*, uma leguminosa tropical, para a determinação das formas enzimáticas de cada espécie. Com base nos estudos sobre as formas enzimáticas e observações morfológicas, sugerimos que exista uma relação entre a forma enzimática e a morfologia foliar para as espécies deste gênero, pois as cinco espécies que apresentaram ASNase dependente de K^+ eram unifolioladas, e as independentes, sempre trifolioladas.

A partir do anticorpo produzido para a enzima ASNase independente de K^+ purificada de *Lupinus polyphyllus* pôde-se fazer um estudo imunoquímico para tentar

estabelecer similaridades entre as moléculas das duas formas enzimáticas. Neste estudo constatamos que o reconhecimento por parte do anticorpo não se dá em função da dependência do cofator K^+ pela enzima. Por isto sugerimos que a porção da molécula da enzima onde se liga o anticorpo não seja a mesma porção que determina a dependência ao K^+ .

Foi determinado também quais compostos nitrogenados compunham a seiva xilemática destas plantas a partir de dois tratamentos que permitiam ou não a formação de nódulos. Para isto foram dosados ureídeos e aminoácidos, que são normalmente os principais compostos nitrogenados do exsudato do xilema de leguminosas. Pelos dados obtidos observamos que os ureídeos não são utilizados pelas espécies de *Crotalaria* como transportadores de N mesmo nas plantas do tratamento com nodulação, onde esta classe de composto é mais frequentemente encontrada. Constatamos também que os aminoácidos são os compostos nitrogenados transportados preferencialmente na seiva das espécies estudadas de *Crotalaria*. A ASN representou mais de 50 % dos aminoácidos detectados na seiva, sendo o principal produto composto transportador de N nestas plantas. O ASP (ácido aspartico) foi o segundo aminoácido encontrado em maior quantidade. A partir desta afirmação ressaltamos a crucial importância da enzima ASNase na metabolização de ASN, uma vez que sua utilização é fundamental para o crescimento da planta.

SUMMARY

The amino acid Asparagine (ASN) is one of the principal forms of nitrogen found in the vascular transport system of plants, principally of legumes. The nitrogen (N) contained in this amino acid is reutilized in developing organs of the plant (sinks) for the synthesis of proteins and nitrogenous compounds in general. However, the liberation and consequent reutilization of this nitrogen depends upon the metabolism of ASN.

Two enzymes capable of metabolizing ASN are known: Asparagine Transaminase and Asparaginase (ASNase). The presence of ASNase is of extreme importance, in view of its regulatory role in ASN metabolism, such as in this study with immature seeds where the amino acid is degraded in the early stages of development when the demand for nutrients is greater and activity of the enzyme higher.

Two forms of ASNase are known, one dependent and the other independent of potassium. However, the two forms have never been found together in the same tissue. Thirteen species of the genus *Crotalaria*, a tropical legume, were investigated to determine the form of ASNase present in each species. Based on this study coupled with morphological observations, we found a relationship between the enzyme form and leaf morphology, since the five species that contain the K⁺ dependent ASNase were unifoliate and the remaining K⁺ independent species were all trifoliate.

Using the antibody specific for the K⁺ independent ASNase of *Lupinus pollyphylus*, an immunochemical study was carried out in an attempt to establish homologies among the two enzyme forms. This study showed that the antibody reaction was not related to K⁺ dependence this leads us to suggest that the molecular-binding site for the antibody is not involved in the determination of potassium dependence.

We also determined which nitrogenous compounds were present in the xylem juice of these plants, using two treatments that produced nodulated and non-nodulated plants. The levels of ureides and amino acids, normally the main forms of nitrogen found in xylem exudates, were determined here. The data show that only traces of ureides are found in the transport stream of *Crotalaria* species, even in nodulated plants where this class of compound is usually found. The data also show that amino acids are the main forms of nitrogen transport in the *Crotalaria* species under study. ASN represented more than 50 % of the xylem amino acids, and therefore the main transport compound for nitrogen in these plants. ASP (aspartic acid) was the second most abundant amino acid. This finding reinforces the importance of the enzyme ASNase in the metabolism of nitrogen in the developing seed.

1-INTRODUÇÃO

O gênero *Crotalaria* L. tem seu nome derivado do grego "Krotalon" (chocalho) (MILLER, 1967). Popularmente as espécies são conhecidas como guiso-de-cascavel, chocalho ou chique-chique pelo ruído produzido pelas sementes no interior do fruto seco (BASTA e BASTA, 1982). Este gênero, com distribuição geográfica Pan-Tropical, compreende aproximadamente 600 espécies de leguminosas, nativas ou introduzidas, da família *Phabaceae* (LEWIS, 1987).

Muitas espécies são altamente tóxicas, contendo alcalóides pirrolisidínicos causadores de hemorragias internas e lesões hepáticas (GENTCHUJINICOV, 1976), mas de acordo com vários autores, sua toxicidade apresenta-se apenas quando se encontra na fase de frutificação, podendo ser usada como forrageira durante a fase vegetativa (GIURNOS, 1985).

As espécies deste gênero possuem uma grande capacidade de colonização de áreas perturbadas, ocorrendo em vários tipos de ambientes. São consideradas invasoras pois são plantas cujas populações são capazes de se introduzir em habitats cultivados, fortemente perturbados ou ocupados pelo homem, desvalorizando ou substituindo potencialmente as populações residentes, que são plantas cultivadas ou de interesse ecológico (NAVAS, 1991). As espécies invasoras representam um componente altamente bem sucedido e importante para seus ambientes (RADOSEVICH e HOLT, 1984), possuindo características biológicas específicas que as tornam capazes de se difundir e competir com sucesso (AULD *et al.*, 1987). São espécies de grande importância econômica e agrônômica, sendo utilizadas no controle de nematóides em culturas (LEITÃO FILHO *et al.*, 1975; MIRANDÁ, 1981), como forrageira (RIZZINI e MORAIS, 1976), no combate à erosão, adubação verde e fonte de fibras (MILLER, 1967).

Muitos estudos com leguminosas são desenvolvidos no que se refere ao metabolismo de nitrogênio (N). Isto se deve basicamente ao alto nível protéico de suas sementes e sua capacidade para fixação de N_2 atmosférico quando noduladas.

Este elevado teor protéico nas sementes é devido em grande parte às proteínas de reserva, que são armazenadas neste órgão para posteriormente serem hidrolisadas e servirem como fonte de nutrientes durante a germinação. As sementes de leguminosas têm aproximadamente de 20 a 25 % de sua massa seca representada por proteínas de reserva. É um nível bastante alto quando comparado por exemplo às sementes de cereais, onde este composto representa somente de 10 a 15 % da massa seca (DERBYSHIRE, *et al* 1976). A síntese destas proteínas se dá no retículo endoplasmático rugoso, sendo depositadas nos corpúsculos protéicos onde permanecem compactadas e inalteradas até a germinação. As proteínas de reserva de leguminosas em geral são ricas em aspartato, glutamato, leucina, aminoácidos básicos e amidas (PERNOLLET e MOSSE, 1983).

Porém, para que ocorra esta síntese protéica nos frutos de leguminosas, é necessário que estes sejam supridos com uma fonte de N. Este N é transportado até os órgãos dreno na forma de nitrato (NO_3^-) ou fazendo parte de algum composto nitrogenado da seiva. O suprimento do N que chega até os frutos tem que ser feito por uma fonte orgânica, uma vez que os frutos têm pouca ou nenhuma capacidade para reduzir o NO_3^- . A baixa capacidade para reduzir o NO_3^- parece ser geral nos frutos de leguminosas (SCHLESIER, 1977; MORI e SODEK, 1983). Segundo MORI e SODEK (1983), ocorre uma dependência quase que total por parte dos frutos de soja em relação aos outros órgãos da planta para o suprimento do N reduzido. Esta função de suprir o N nos frutos pode ser dividida entre as raízes e as folhas, órgãos que reduzem facilmente o NO_3^- devido a alta atividade em seus tecidos da Redutase de Nitrato (CRAFTS-BRANDER e HARPER, 1981).

Mais especificamente na síntese de proteínas, além dos esqueletos de carbono (C) vindos via floema dos órgãos fotossintetizantes (órgãos fonte), ocorre também o transporte do N que pode ser feito via xilema passando para o floema durante o percurso, ou vir diretamente pelo floema. Interessante ressaltar a baixa relação C:N que é uma característica geral dos compostos que transportam N.

Os compostos nitrogenados mais abundantes nas seivas são os aminoácidos. Somente em algumas leguminosas tropicais (espécies pertencentes à tribo *Phaseolae*) ocorre também o transporte de ureídeos (alantoina e ácido alantóico). Tanto os aminoácidos como os ureídeos são transportados durante todo o período vegetativo e reprodutivo da planta.

Os ureídeos utilizados por estas espécies são sintetizados nas raízes e representam um dos produtos formados pela utilização do N derivado da fixação de N_2 graças à capacidade da maioria das leguminosas, de formar associações simbióticas que levam à fixação de N_2 atmosférico. OHYAMA e KAMAZAWA (1979), trabalhando com *Glycine max* (soja), postularam uma relação entre fixação de N_2 e formação de ureídeos quando verificaram que o $^{15}N_2$ era incorporado na forma de ureídeo e o $^{15}NO_3$ principalmente na forma de asparagina (ASN). Assim sendo, observou-se que alantoina e ácido alantóico são produtos específicos da fixação simbiótica do nitrogênio. Outras evidências apoiam esta idéia. SCHUBERT (1986) trabalhando com plantas de soja não noduladas e utilizando NO_3^- como fonte de N, observou na seiva apenas traços de ureídeos.

Porém, a solubilidade dos ureídeos é baixa, o que implica numa necessidade de transporte de grandes volumes de água. Segundo SPRENT (1980), a quantidade de água necessária para transportar ureídeos é 2,6 vezes maior que a quantidade de água necessária para transportar o mesmo número de átomos de N na forma de asparagina (ASN). Deste modo fica clara a maior ocorrência desta classe de compostos nitrogenados se dar em plantas tropicais, onde a taxa transpiratória é alta e eles são carregados com maior facilidade, além da

elevada temperatura ambiente, que possibilita um aumento de sua solubilidade na seiva do xilema destas plantas.

No entanto existem espécies, como por exemplo a ervilha (*Pisum sativum*), que embora possam apresentar nodulação, não produzem, e conseqüentemente, não utilizam os ureídeos como composto para o transporte de N (MURRAY e CORDOVA-EDWARDS, 1984)

Como foi dito anteriormente, além da utilização de ureídeos por parte de algumas plantas, os aminoácidos representam os principais compostos nitrogenados translocados pela planta. Estes aminoácidos podem ser transportados pelo xilema (se produzidos na raiz) e passarem para o floema ao longo do percurso até chegarem ao órgão dreno, ou virem diretamente pelo floema, caso tenham sido produzidos na folha.

Quanto à síntese dos aminoácidos que serão translocados ou utilizados no local de sua formação, sabe-se que eles possuem uma origem comum. O primeiro a ser formado pela incorporação do amônio (NH_4^+) aos esqueletos de C é a glutamina (GLN), que posteriormente origina os demais através de processos enzimáticos.

De todos os compostos nitrogenados translocados pelos vasos condutores de leguminosas, o aminoácido ASN é o mais encontrado. A ASN foi o primeiro aminoácido identificado em plantas há quase duzentos anos e é utilizada na forma não metabolizada em algumas sementes, ou pela sua incorporação em proteínas (PATE *et al.*, 1974/1975). Este aminoácido é sintetizado à partir de GLN pela Asparagina Sintetase. O N requerido para a síntese de ASN pode ser obtido pela fixação de N (STREETER, 1973), pela degradação de proteínas (ROGNES, 1975), ou pela redução do nitrato (LEA e FOWDEN, 1975). A ASN representa um dos principais componentes com N da seiva (PATE, 1980; SCHUBERT, 1986) podendo chegar até a 80% de todos os aminoácidos que a constituem. Em alguns gêneros é o composto nitrogenado dominante transportado pela planta. Um fato importante quando se utiliza ASN como composto transportador de N é a economia de esqueletos de C para o

transporte de átomos de N, em situações normais ou quando o suprimento de C é limitado (BRAY, 1983). A condução deste aminoácido pelo xilema constitui uma importante fonte de N que será acumulado nas estruturas vegetativas durante o ciclo do crescimento e florescimento da planta (ATKINS *et al.*, 1975).

Em suma, os compostos nitrogenados (ureídeos e aminoácidos) translocados pelos vasos condutores, têm como função o suprimento de N nos diferentes órgãos dreno da planta. Entre eles, um dos mais importantes são os frutos. FARDER e KOLLER (1985) trabalhando com soja, verificaram que quando a produção de assimilados era suficiente, a massa, tanto da semente quanto das paredes das vagens, aumentava. De acordo com estes autores, nestas plantas os frutos podem funcionar como fonte-dreno. Desta forma, quando a taxa de assimilados exportados para os frutos era inferior à necessidade metabólica do mesmo, as paredes da vagem atuavam como fonte, aumentando a massa da semente em detrimento do declínio da sua própria massa.

No entanto, quando as condições de nutrição da planta são satisfatórias, a via mais comum para o suprimento de nutrientes das sementes é através de descarregamento dos solutos via floema. O primeiro local do fruto que recebe os compostos nitrogenados é a vagem, que os armazena para posterior distribuição (THORNE, 1979). No descarregamento, os solutos que chegam aos frutos através do floema e são levados para a semente seguem até um terminal vascular reticulado, cuja extensão pode variar de acordo com a espécie. O descarregamento propriamente dito ocorre numa combinação de membranas de tubos crivados, células companheiras normais ou modificadas e vários tipos de células do parênquima vascular que possuem seu simplasto interconectado por plasmodêsmos (THORNE, 1985). Neste trabalho também observou-se que os vasos condutores que translocam os solutos fazem o descarregamento somente em tecido materno, não havendo conexão direta entre a semente e os vasos condutores da planta mãe.

Após o descarregamento os assimilados que chegam à semente são rápida e circunferencialmente distribuídos nas células do tegumento (THORNE, 1980; PATRICK e MACDONALD, 1980), de onde seguem via apoplasto para o espaço entre o tegumento e o cotilédone, no qual penetram gradualmente pela superfície, seguindo para o seu interior por difusão. Como veremos mais adiante, durante a passagem simplástica dos compostos pelo tegumento, parte da metabolização dos solutos ocorre devido a presença de enzimas nesta estrutura. Na próxima etapa, após os compostos serem transportados via apoplasto até o cotilédone (o segundo sítio catalítico) ocorre a metabolização dos solutos que ainda não foram alterados pelas enzimas do tegumento. Isto é o que ocorre com a ASN que não foi totalmente metabolizada na testa, ela segue para o embrião que possui as enzimas necessárias para este processo (THOMPSON *et al.*, 1977 ; LEA *et al.*, 1978 ; HAGA e SODEK, 1987).

Uma técnica que permite a visualização de parte desta rota de substâncias é a técnica do "tegumento vazio", desenvolvida por THORNE e RAINBIRD (1983) em plantas de soja. Segundo esta técnica, é feita uma secção na parede da vagem para possibilitar o acesso à semente. Posteriormente, a semente é submetida a um corte horizontal e o embrião removido com cuidado, deixando intacta a porção do tegumento que liga a semente à vagem. Desta forma, estabelece-se um reservatório onde os compostos vindos do tegumento ficam retidos e são removidos para análise, podendo-se detectar então quais os compostos que passariam para os cotilédones. Com o auxílio desta técnica, RAINBIRD *et al.* (1984) verificaram que em plantas noduladas de soja, a quantidade de ureídeos que passavam para o cotilédone era insignificante e a GLN era o composto nitrogenado em maior escala (cerca de 52% de todo o nitrogênio estava na forma deste aminoácido). Os demais aminoácidos apresentavam-se em proporções muito inferiores: asparagina 19%, arginina 5% e histidina 4%. Os outros 20% de N eram constituídos basicamente por amônia e outros aminoácidos. Deste modo, parece haver

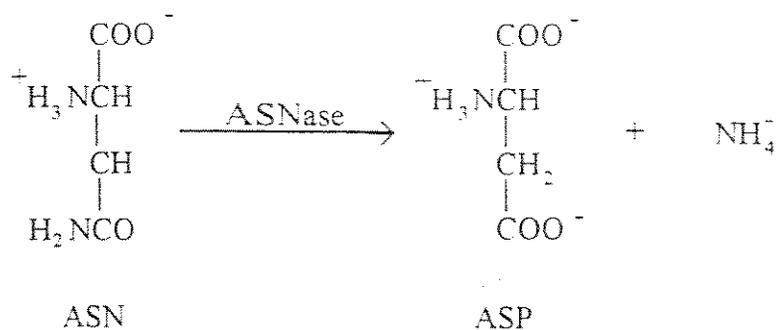
uma conversão dos ureídeos em outras formas de compostos nitrogenados antes ou durante o descarregamento no fruto.

Ocorrem também diversas variações na constituição da seiva que passa para o cotilédone devido a idade do fruto ou à atividade enzimática do tegumento. Em ervilha, ROCHAT e BOULTIN (1991), trabalhando com plantas que apresentavam ou não nodulação, verificaram um aumento na concentração de ASN e concomitantemente uma diminuição no nível de GLN que passava para o cotilédone após o 20º dia de desenvolvimento da semente. Isto foi explicado como sendo um processo de remobilização de N, já que nesta fase a testa provavelmente está entrando em senescência. Além da remobilização de N, um outro ponto importante é a presença da enzima ASNase na testa. A atividade de ASNase nesta estrutura é bastante elevada na fase anterior a 20 dias, porém ocorre uma queda brusca em seu nível após o 20º dia de desenvolvimento da semente (SODEK *et al.*, 1980). A maior concentração de ASN encontrada no cotilédone após 20 dias pode estar relacionada também à fraca atividade de ASNase na testa nesta fase do desenvolvimento.

Como foi exemplificado acima, após o descarregamento nos órgãos drenos, os compostos nitrogenados sofrem a ação de muitas enzimas que possibilitam a utilização dos elementos que os constitui. A presença destas enzimas é um fato importante para a metabolização do N verificada no processo de redistribuição dos compostos estocados na vagem (PEOPLES *et al.*, 1985; STOREY e BEEVERS, 1978; GOMES e SODEK, 1984), já que as paredes das vagens funcionam primeiramente como um órgão de armazenamento temporário onde o N é acumulado (ROCHAT e BOULTIN, 1989). Este N é reutilizado no cotilédone para a formação de outros compostos nitrogenados por ação de outras enzimas como asparaginase (ASNase), asparagina aminotransferase (ASN aminotransferase), urease, alantoinase, glutamina sintetase e piruvato aminotransferase, que têm pico de atividade coincidente com a fase de enchimento dos grãos (PEOPLES *et al.*, 1985).

São conhecidas duas enzimas capazes de metabolizar a ASN : ASN transaminase e ASNase. A primeira foi encontrada em vagens, porém sua atividade enzimática é principalmente verificada na folha (STREETER, 1977). O mesmo autor verificou que não foi observada atividade da ASN transaminase em nódulos. A presença da enzima ASNase é de extrema importância, pois apresenta um papel regulatório no metabolismo da ASN, como por exemplo no caso das sementes, onde este aminoácido é degradado no início do desenvolvimento, quando a necessidade de nutrientes é maior e obviamente quando a atividade da ASNase é grande.

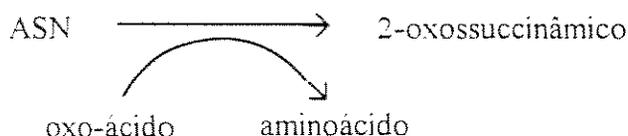
Algumas vias são propostas para a catálise da ASN, sendo a mais aceita a que propõe a utilização de ASNase para hidrolizar o grupo amida da ASN e formar aspartato (ASP) e NH_4^+ (SIECIECHOVICZ *et al.*, 1988).



Existem órgãos que utilizam esta via como sendo a principal responsável pelo metabolismo de ASN, como foi observado por IRELAND e JOY (1981) nos frutos imaturos de ervilha e nas folhas em estádios iniciais de desenvolvimento. Neste último órgão, foi observado uma queda brusca no nível de ASNase durante o crescimento da folha. Conseqüentemente, uma outra rota metabólica torna-se a responsável pela utilização do N que chegar até a folha na forma de ASN. No mesmo trabalho os autores confirmaram a ocorrência de uma aminotransferase como sendo a enzima envolvida na utilização da ASN depois que a

folha já atingiu um certo grau de desenvolvimento. Esta é a segunda via proposta para a hidrólise deste aminoácido.

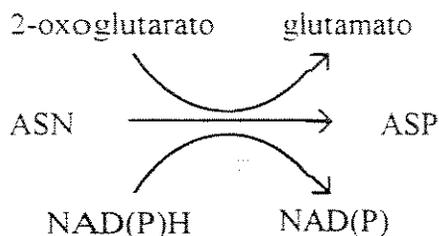
Nesta outra rota ocorre uma transaminação na ASN na presença de um oxo-ácido, principalmente piruvato ou glioxilato, produzindo ácido 2-oxossuccinâmico e aminoácido.



Estas duas reações parecem ser as principais vias de metabolização de ASN em plantas superiores.

Entretanto, outras duas hipóteses foram propostas:

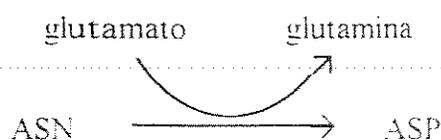
A primeira envolve a transaminação redutiva da ASN com 2-oxoglutarato pela oxidação de ASN dependente de NAD(P)H (DOUGALL, 1974; FOWLER *et al.*, 1974).



Porém os dados obtidos por MIFLIN e LEA (1975) discordam desta hipótese. Neste trabalho, desenvolvido com extrato de raízes de ervilha, eles discutem a possibilidade da estimulação da oxidação da ASN por nucleotídeos nicotinamidicos, na presença de α -oxoglutarato, ter sido quase que certamente devido à contaminação por aspartato (ASP) da

ASN comercial que foi usada. Esta reação mostrou ser dependente da adição de redutores e ser inibida por inibidores de transaminases, o que não foi observado quando se usou ASN purificada.

A outra hipótese envolve a transferência do grupo amino da ASN para glutamato (GLU), formando glutamina através da síntese reversa de ASN sintetase (LERMAN, 1960 apud SIECIECHOVICZ *et al.*, 1988).



Além da formação direta de ASP, alguns autores sugerem que o N da alanina (ALA) possa ser derivado diretamente da ASN (LLOYD e JOY, 1978; BAUER *et al.*, 1977).

Entretanto a via que utiliza a ASNase para a degradação da ASN é a mais importante conhecida, principalmente em sementes imaturas.

Da reação de metabolização da ASN, obtém-se o N- amino que é utilizado como doador geral de N para síntese de outros compostos nitrogenados, necessários principalmente nos órgãos em formação, onde geralmente se tem a atividade da enzima. A maior necessidade de N nas sementes se dá no início do desenvolvimento das vagens, onde o consumo de N é maior. É nesta fase, quando a semente ainda está num estágio imaturo, que ocorre a maior taxa de síntese das proteínas de reserva e, conseqüentemente, é quando a atividade da ASNase atinge o pico máximo (SODEK *et al.*, 1980). Deste modo, a atividade da ASNase na semente pode variar de acordo com a idade e local no fruto (tegumento ou cotilédone).

A presença da ASNase já foi amplamente verificada em sementes imaturas de várias leguminosas (ATKINS *et al.*, 1975; LEA *et al.*, 1978; SODEK *et al.*, 1980; IRELAND e

JOY, 1981; GOMES e SODEK, 1984). Também em frutos imaturos de leguminosas foram encontradas as duas formas existentes desta enzima. Uma dependente de potássio (K^+) (SODEK *et al.*, 1980) e outra independente do íon (LEA, 1978), porém as duas nunca foram encontradas numa mesma espécie. A forma independente de K^+ foi encontrada em algumas espécies de tremoço (*Lupinus*): (*L. polyphyllus*, *L. angustifolius* e *L. arboreus*), sendo exceção dentro do gênero, que é constituído basicamente por espécies cuja enzima ASNase é dependente do íon. A massa molar desta forma enzimática, isolada de *L. polyphyllus*, é de 72.000 g/mol (LEA *et al.*, 1978). A forma dependente, além de ter sido encontrada em *Lupinus* foi verificada também em ervilha (*Pisum sativum*) e *Vicia faba*, todas espécies de clima temperado. Foi observado que os íons sódio (Na^+) e rubídio (Rb^+) podem substituir o K^+ em ervilha, embora com menor eficiência (SODEK *et al.*, 1980). IRELAND e JOY (1981) sugerem que baixas concentrações de NH_4^+ também teriam esta mesma função em relação ao K^+ . A massa molar desta forma difere da outra, sendo esta de 68.000 g/mol (isolado de sementes de ervilha) (SODEK *et al.*, 1980).

Uma outra diferença marcante a ser ressaltada entre as duas formas enzimáticas é quanto à comparação imunológica. Estudos imunológicos feitos com extrato de sementes de quatro espécies de *Lupinus* (*L. albus*, *L. polyphyllus*, *L. angustifolius* e *L. arboreus*) contendo ASNase, sugerem que a forma dependente de K^+ de *L. albus* não tem em comum a porção do epitopo com a ASNase independente do íon das outras três espécies de *Lupinus* (LOUGH *et al.*, 1992). Deste modo, os anticorpos produzidos a partir da enzima purificada independente de K^+ não reconhecem a forma dependente do íon.

A ASNase foi detectada também em animais e microorganismos, onde seu estudo tem sido extensivo devido ao seu potencial na atividade antineoplásica (WRISTON *et al.*, 1973). Ainda neste trabalho foi observada uma diferença marcante entre a enzima que ocorre em

plantas e em animais e microorganismos. Trata-se da incapacidade da ASNase vegetal em hidrolisar a GLN.

Em tecidos de sementes em desenvolvimento, quando a atividade da ASNase foi detectada, observou-se também atividade da Glutamato Sintetase (GS), Glutamato Desidrogenase (GDH) e Glutamato Oxo-Glutarato Amino Transferase (GOGAT). Porém a atividade máxima destas enzimas assimiladoras de NH_4^+ ocorreu alguns dias após o pico de atividade de ASNase (LOUGH *et al.*, 1992).

Quanto ao NH_4^+ produzido pela ação da ASNase, em virtude da metabolização da ASN, sugere-se que este seja reassimilado pelas vias competentes (MURRAY e KENNEDY, 1980), formando novos compostos nitrogenados a partir do N liberado da ASN.

Mesmo sendo comprovada a existência de duas formas enzimáticas para ASNase, nada se sabe sobre as bases moleculares que determinam a dependência ou não de K^+ da enzima. Um esclarecimento a nível molecular poderia ser feito com base na comparação das duas formas enzimáticas. Para isto o melhor seria a purificação das duas formas enzimáticas obtidas a partir de uma única espécie, para minimizar as influências genéticas que porventura poderiam ocorrer no caso de espécies distintas ou taxonomicamente afastadas.

A existência de um gênero que possui em suas espécies as duas formas de ASNase já havia sido citado em literatura (SODEK *et al.*, 1980; CHANG e FARDEN, 1981). Neste gênero (*Lupinus*), a maioria das espécies apresentam ASNase dependentes de K^+ , porém em três espécies (*L. polyphyllus*, *L. angustifolius* e *L. arboreus*) a forma enzimática é a independente. Entretanto, dados preliminares obtidos em nosso laboratório mostraram que, devido ao fato destas espécies temperadas não estarem adaptadas ao clima tropical, seu cultivo e principalmente a obtenção de seus frutos torna-se uma prática extremamente difícil.

Em estudos preliminares em nossos laboratórios, foi descoberta a existência de um gênero de leguminosa tropical (*Crotalaria*) em que existem espécies dependentes e

independentes de K^+ . Tendo em vista o fato da melhor adaptação destas espécies ao clima tropical e da existência de um grande número de espécies disponíveis na região, o material vegetal escolhido para o desenvolvimento deste trabalho foram as espécies do gênero *Crotalaria*. Outro elemento que apoiou a idéia de se trabalhar com um gênero tropical foi o fato de que pesquisas na área de metabolismo de ASN em geral são desenvolvidas com espécies temperadas. Assim sendo, um estudo com *Crotalaria* terá um valor adicional no sentido de amenizar o desequilíbrio de informações existentes entre plantas temperadas e tropicais.

2-OBJETIVOS

Considerando-se o papel fundamental da enzima ASNase na utilização do N translocado pela planta, este trabalho teve por objetivos:

1-elucidar quais as formas enzimáticas de ASNase (dependente ou não de K^+) são encontradas em algumas espécies de *Crotalaria*.

2-estabelecer quais compostos nitrogenados são translocados em plantas de *Crotalaria* cultivadas que apresentam ou não nodulação.

3.MATERIAS E MÉTODOS

3.1- ESPÉCIES ESTUDADAS

No presente trabalho foram estudadas as seguintes espécies do gênero *Crotalaria*:

C. grantiana Harv.

C. juncea L.

C. paulina Scharank

C. retusa L.

C. spectabilis Roth.

C. striata D.C.

C. usaramoensis Bak

C. anagyroides Kunth

C. estipularia Desv.

C. incana L.

C. lanceolata E. Mey

C. mucronata Desv.

C. zanzibarica Benth

As sementes das sete primeiras espécies foram cedidas pela seção de leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas e as outras seis espécies coletadas na região e identificadas pelo professor Jorge Tamashiro do Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Campinas.

3.2-DETERMINAÇÃO DA DEPENDÊNCIA DE K⁺ PARA ASPARAGINASE

3.2.1-CULTIVO DAS PLANTAS

As leguminosas estudadas foram cultivadas em casa de vegetação e em canteiros .Os vasos da casa de vegetação tinham como substrato vermiculita previamente lavada e foram regadas com solução nutritiva completa de HOAGLAND duas vezes por semana, 250 ml por vez.

3.2.2- EXTRAÇÃO DE ASNase

A extração da enzima foi feita no estágio de maior atividade enzimática, ou seja, quando o endosperma ainda encontrava-se viscoso. Este estágio foi determinado como sendo o de maior atividade após ter sido dosada a atividade em diversos estádios.

A enzima foi extraída conforme metodologia previamente descrita (SODEK *et al.*,1980). De acordo com este método, o tampão de extração é composto de TRIS HCl; 50 mM; pH 8,0 contendo KCl 50 mM; DTT (ditiotreitól) 1 mM e glicerol 10% (v/v) e o extrato feito por maceração em mortár previamente gelado, na razão de 5 ml por g de massa fresca. O extrato foi centrifugado a 10.000 rpm durante 15 min em centrífuga refrigerada e uma aliquota de 1 ml foi dessalinizada em coluna de Sephadex G25 (1 cm de diâmetro x 8 cm de comprimento) e equilibrada previamente com tampão de extração. A fração protéica foi coletada e usada para a dosagem de atividade enzimática.

3.2.3- DOSAGEM DE ASNase

A metodologia adotada para a dosagem de ASNase seguiu o procedimento novo desenvolvido por SODEK e LEA (1993). Segundo este método, a quantidade de NH_4^+ liberada da ASN pela ação da enzima é dosada como medida da atividade.

O meio de ensaio era composto de ASN 30 mM em Tampão TRIS 50 mM pH 8,0 (50 μl) e extrato (até 100 μl), em volume final de 150 μl . A mistura, em tubo de 1,5 ml tipo "Eppendorf", foi incubada a 35°C durante 1 hora. Para terminar a reação e dar início a difusão da NH_3 do meio, o tubo recebia 500 μl de K_2CO_3 50% e era imediatamente fechado com tampa própria com uma gota (5 μl) de H_2SO_4 concentrado do lado interno da tampa. Desta forma, a gota de ácido ficava suspensa na tampa, permitindo a captação de NH_3 liberada do meio e formando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A difusão de NH_3 se completava até o dia seguinte à temperatura ambiente.

Após completado o período de difusão, a tampa com a gotícula de ácido era removida do tubo e colocada em outro tubo para dosagem de NH_3 pelo método de McCULLOUGH (1977). Este continha 500 μl do reagente de fenol (2,5 g de fenol e 12,5 mg de nitroprusiato de sódio em 250 ml de H_2O). Após agitação para misturar este reagente com o ácido, o tubo era aberto e 100 μl de NaOH 2N (para neutralizar o ácido) e 500 μl do reagente de HOCl (formado por uma mistura de 1,25 g de NaOH; 13,4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e 2,5 ml de NaHOCl em 250 ml de H_2O) foram colocados no tubo. O tubo foi incubado durante 45 min. a 37°C, e as frações monitoradas em espectrofotômetro a 630 nm.

Como controle (tempo zero) outro ensaio idêntico era montado, mas a reação interrompida imediatamente com 500 μl de K_2CO_3 50% após adição do extrato. A atividade foi calculada a partir do aumento na leitura entre o tempo zero e o incubado, e transformada em $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1}$ de NH_3 formado através de curva padrão de NH_4^+ . A quantificação da ASNase

foi feita por cálculos baseados num padrão de 50 nmoles de NH_4^+ , e os valores da atividade da enzima também foram expressos nesta unidade.

3.2.4- CARACTERIZAÇÃO DA ASNase

Para determinar a dependência ou não da enzima do ion K^+ , o extrato era dessalinizado em coluna de Sephadex G25, conforme já mencionado, porém equilibrada com tampão de extração sem o K^+ .

Foram realizados dois ensaios simultaneamente. No primeiro o extrato era incubado com ASN na presença de K^+ adicionando-se KCl na concentração final de 50 mM, e no segundo era incubado com ASN sem K^+ . Após comparar as atividades nos dois ensaios, foi possível determinar a dependência que a enzima possui do ion K^+ .

3.3-ENSAIOS IMUNOQUÍMICOS

3.3.1- CULTIVO DAS PLANTAS

As sementes das treze espécies de *Crotalaria* estudadas foram semeadas em terra, em vasos com capacidade para 3 litros. Semeou-se também, em vasos com a mesma capacidade e substrato, sementes de *Lupinus polyphyllus*. O cultivo foi feito em casa de vegetação sob condições naturais de luz, temperatura e umidade relativa, sendo que as plantas recebiam água todos os dias.

As sementes imaturas, tanto de *Crotalaria* como de *Lupinus*, foram coletadas quando o endosperma já estava em estado viscoso (tendo sido verificado este como sendo o estágio de maior atividade da enzima). Em seguida, as sementes foram armazenadas - 20°C até uso posterior.

3.3.2- PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O material congelado foi macerado em mortár previamente gelado, com tampão TRIS (hidroximetil-aminometano) 50 mM; pH 8,0 contendo DTT 1 mM; KCl 50 mM e glicerol 10%, na proporção de 0,350 g de tecido / 5 ml de tampão. Depois de macerado, o extrato foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 min a 4°C.

As amostras para eletroforese, provenientes do sobrenadante do extrato bruto centrifugado, foram preparadas com a adição de azul de bromofenol e de sacarose na concentração final de 10%.

3.3.3-ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A separação das proteínas foi feita em PAGE - 10% (eletroforese em gel de poliacralamida).

O aparelho utilizado foi um mini gel da Hoefer mantido à 15°C com a circulação de água refrigerada e a duração da corrida foi em média 2 horas.

Para a confecção do gel com espessura de 1,5 mm, 6,5 cm de altura e 7,3 cm de largura, 10 ml de uma solução 97,3% de acrilamida e 2,7% de bis-acrilamida foram adicionadas a 7,5 ml de tampão TRIS 3,0 M; pH 8,8 e 12,5 ml de água destilada. Como catalizadores da polimerização do gel foram utilizados 56 µl de TEMED (N.N.N.N'-tetrametil-etileno diamina) e 100 µl de persulfato de amônio 10% . Para auxiliar a polimerização, o gel foi deaerado antes da adição dos catalizadores e depois do líquido já entre as placas, uma camada de 100 µl de isopropanol saturado com água foi colocada para impedir o contato do O₂ atmosférico com o gel.

Após a polimerização do gel, o isopropanol foi eliminado com papel de filtro e 10 ml de gel de empilhamento foram colocados na placa.

Para a confecção deste gel, utilizou-se 2,5 ml de tampão TRIS 0,5 M; pH 6,8, 1,25 ml de uma solução 97,3% de acrilamida e 2,7% de bis-acrilamida e 6,0 ml de água, também foi feita deaeração e posteriormente adicionados à mistura 100 µl de persulfato de amônio 10 %, 20 µl de TEMED e 25 µl de azul de bromofenol.

O volume da amostra foi de 20 µl e a eletroforese feita a 25 mA por gel, tendo como tampão de eletrodo TRIS 0,25 M; pH 8,3 contendo 1,92 M de glicina. Sempre foram feitas duas corridas iguais, um gel era revelado com prata segundo a técnica modificada de OAKLEY *et al.* (1980) e o outro era submetido a um "trans-blotting" (processo de

transferência de proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose) e tratado pela técnica de imunodeteção.

A revelação com prata compreendia várias etapas. Primeiramente o gel era mergulhado numa solução com 40% de metanol e 10% de ácido acético por 3 vezes, sendo mantido por 20 minutos cada vez. Em seguida era lavado 2 vezes com a duração de 10 minutos para cada lavagem numa solução com 10% de metanol e 5% de ácido acético. No próximo passo, o gel era mergulhado por 10 minutos numa solução 3,4 mM de $K_2Cr_2O_7$ (500 mg de $K_2Cr_2O_7$; 100 μ l de HNO_3 e 500 ml de H_2O). Posteriormente era lavado em H_2O destilada até ficar com fundo amarelo claro (aproximadamente 3 lavagens com duração de 10 minutos cada uma). Em seguida era mergulhado numa solução 0,1% de $AgNO_3$ por 15 minutos e depois lavado por 2 minutos com H_2O destilada. Por fim, o gel era colocado de 2 a 5 minutos numa solução contendo 2 ml de formaldeído 30% e 5 g de Na_2CO_3 em volume final de 200 ml (a solução era deaerada em vácuo antes do uso). Quando se dava o aparecimento das bandas, o gel era mergulhado numa solução com 5% de ácido acético por cerca de 5 minutos e depois guardado temporariamente em água destilada.

Para conservar o gel por mais tempo, este era submetido, por proximadamente 2 horas, à uma solução com 3% de glicerina e 50% de metanol até que ficasse do tamanho desejado. Posteriormente o gel era envolvido em 2 pedaços de papel celofane molhados com H_2O destilada e preso esticado com grampos numa placa de vidro até secar.

3.3.4- ELETROTRANSFERÊNCIA E ENSAIO IMUNOQUÍMICO

O tempo de transferência foi em média 45 min, sob uma corrente de 400 mA e à temperatura de 15°C. O tampão utilizado foi CAPS pH 11 (2,21% de CAPS-ácido 3-Ciclohexilamino-1-propanosulfônico, 10% MeOH e NaOH 2M como ajustador de pH). O gel e a membrana foram acondicionados em duas placas de plástico presas por uma dobradiça num só lado. O plástico não entrava em contato com o gel ou a membrana pois sempre era colocado um papel de filtro entre eles (FIGURA 1).

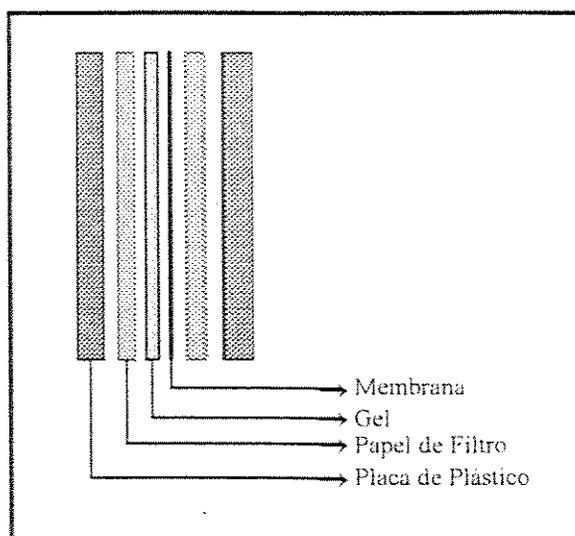


FIGURA 1-Esquema de montagem da placa de eletrotransferência com o gel e a membrana.

Desta forma tínhamos o gel e a membrana em contato direto. A membrana era acondicionada de modo a ficar sempre mais próxima ao pólo positivo do aparelho que o gel (quando ocorresse a eletrotransferência). Assim as bandas eram transferidas do gel para a membrana durante a passagem da corrente.

Após transferidas as proteínas do gel para a membrana, esta era mergulhada em TBS-tampão TRIS-Sódio (TRIS 10 mM pH 7,5 acrescido de 0,9% NaCl) e mantida a 4°C durante 1 noite.

Em seguida, a membrana era incubada em TBS com 3% de leite em pó desnatado (fonte de caseína) por 1 hora, lavada com TBS com 0,1% de tween 20, durante 30 min. Depois a membrana foi incubada por 2 horas com o anticorpo específico para ASNase, isolado e purificado a partir de extrato de *L. polyphyllus* diluído em TBS na razão de 1:1000. Após o período de incubação, a membrana foi novamente lavada com TBS 0,1 % de tween por 30 min e mais uma vez incubada. A nova incubação, agora com anti-anticorpo anti-IgG (Sigma) de coelho conjugado com fosfatase e diluído na razão de 1:5000 por 1 hora em tampão TBS (TRIS 10 mM; pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM e 0,1% tween) resultava numa banda rosada na região da membrana onde existia o complexo proteína-anticorpo-anticorpo conjugado. Posteriormente a membrana foi lavada com o mesmo tampão por 30 min e incubada com TBS (TRIS 100 mM; pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM; NBT: azul de nitrotetrazólio e BCIP: 5-bromo-4-choro-3-indolil fosfato) até o aparecimento das bandas, aproximadamente 15 minutos. A membrana foi armazenada em água.

3.3.5- IMUNODIFUSÃO

Um método imunoquímico foi utilizado para detectar a presença ou não de ASNase.

Trata-se do método de imunodifusão de OUCHETERLONY (1969), onde em 3 ml de meio contendo 1% de ágar em PBS (tampão fosfato salino: 0,01 M NaPi; pH 7,0 e 0,85% de NaCl) colocados sobre uma lâmina de microscopia, são perfurados seis orifícios periféricos e um central. Nos orifícios periféricos são colocados os extratos brutos após centrifugação a 10.000 rpm durante 20 min. em centrífuga sob refrigeração, e no orifício central é colocado o anticorpo específico para a ASNase independente de K^+ , obtida a partir da enzima purificada do tegumento de *Lupinus polyphyllus* por SODEK e LEA (1993).

As reações se processaram durante a noite e a temperatura ambiente.

3.4- DOSAGEM DE AMINOÁCIDOS E UREÍDEOS EM EXSUDATO DO XILEMA

3.4.1- CULTIVO DAS PLANTAS

As sementes foram germinadas em vasos com capacidade para 3 litros com os seguintes substratos:

- vermiculita previamente lavada, para a obtenção de plantas não noduladas.
- uma mistura de vermiculita lavada e terra (fonte de *Rhizobium*) na proporção de 3:1, para obtenção de plantas noduladas.

O aspecto do sistema radicular resultante destes dois diferentes tratamentos pode ser observado nas figuras 2 e 3.

As plantas dos vasos com vermiculita foram regados duas vezes por semana com 250 ml da solução nutritiva completa (HOAGLAND e ARNON, 1950). Os vasos com a mistura de terra e vermiculita foram regados também 2 vezes por semana, porém com solução nutritiva sem a adição de nitrato (para não inibir a nodulação das plantas). A irrigação com água foi feita todos os dias para os 2 tratamentos.

Todos as plantas foram cultivadas em casa de vegetação sob condições naturais de luz, temperatura e umidade relativa.



FIGURA 2- Aspecto do sistema radicular não nodulado de *Crotalaria juncea*.

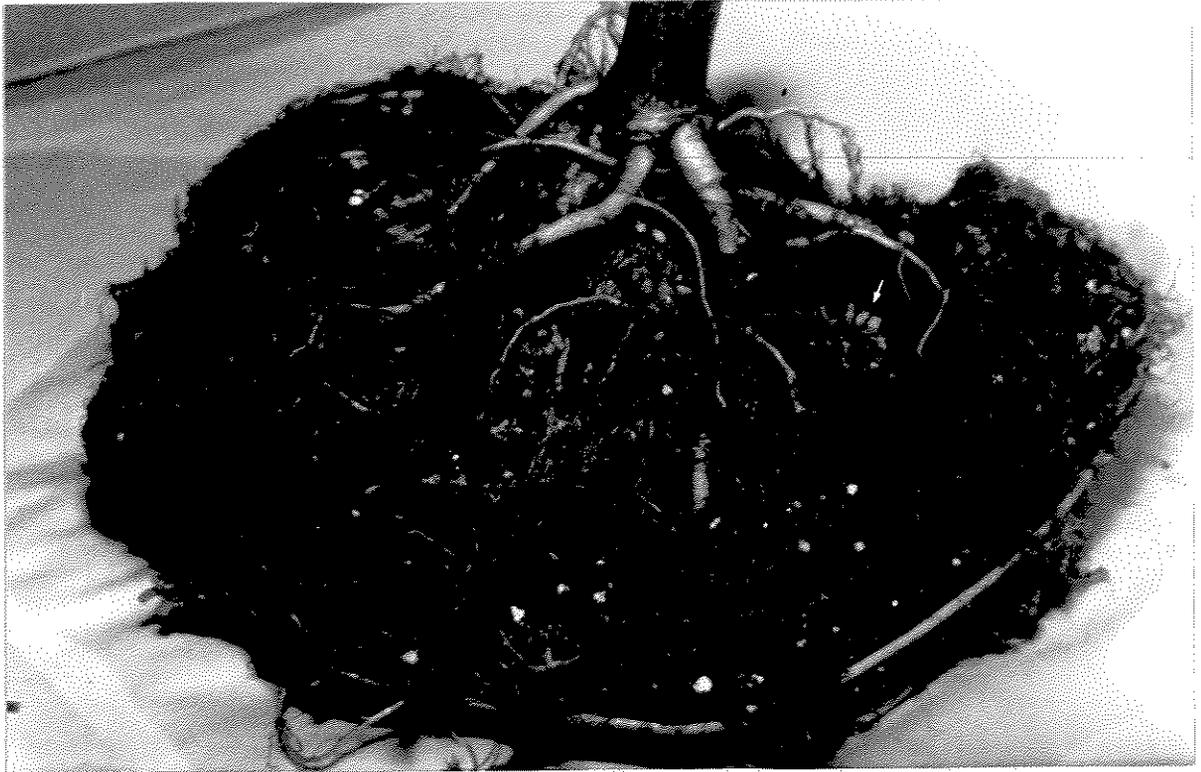


FIGURA 3-Aspecto do sistema radicular nodulado de *Crotalaria juncea*

3.4.2-EXTRAÇÃO DO EXSUDATO

Na idade de 4 meses a seiva bruta foi coletada das plantas, estivessem elas em estágio vegetativo ou floral, uma vez que não se conseguiu evitar o florescimento. Os vasos foram colocados durante aproximadamente 3 horas (7:30-10:30 h) em condições de saturação hídrica e em seguida o caule foi cortado à cerca de 5 cm do substrato, lavado com água destilada e a água enxugada com papel de filtro.

Os exsudatos foram coletados com um capilar de vidro (FIGURA 4) e guardados em frascos mantidos no gelo durante a coleta. Em seguida foram congelados para análises posteriores.



FIGURA 4-Coleta do exsudato do xilema.

3.4.3- DOSAGEM DE UREÍDEOS

A determinação dos ureídeos foi feita em três repetições para cada tratamento de cada espécie pelo método colorimétrico de VOGELS e VAN DER DRIFT (1970) através da hidrólise básica e ácida dos ureídeos seguida de reação com fenilhidrazina e K_3FCN_6 .

De acordo com este método, foram misturados em tubos de ensaio 0,25 ml de exsudato; 0,5 ml de água destilada; 0,25 ml de NaOH 0,5 N e uma gota de fenilhidrazina 0,33%. A hidrólise alcalina se deu quando os reagentes foram aquecidos num banho à 100°C por 8 min. Em seguida os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e submetidos a uma hidrólise ácida quando a eles foi adicionado 0,25 ml de HCl 0,65 N e aquecidos a 100°C por 4 min pelo mesmo processo. Novamente foram resfriados a temperatura ambiente e adicionou-se 0,25 ml de tampão fosfato de potássio pH 7,0 e 0,25 ml de fenilhidrazina 0,33%. Os tubos foram deixados por 5 min a temperatura ambiente e resfriados em gelo. Para a obtenção do composto colorido, foram adicionados 1,25 ml de HCl concentrado a 0°C e 0,25 ml de K_3FCN_6 1,65%. Após agitação os reagentes ficaram por 15 min em repouso e em seguida a leitura foi feita a 535 nm.

A curva padrão foi obtida por diluições de alantoina na faixa de 0 a 100 nmoles/ml. Os valores das concentrações de ureídeos foram expressos em nmoles de ureídeo/ml de exsudato.

3.4.4- DOSAGEM DE AMINOÁCIDOS LIVRES TOTAIS

Todas as siglas dos aa seguem as abreviaturas internacionais.

A determinação da concentração de aminoácidos, também feita em três repetições de cada tratamento para cada espécie, se deu pelo método de YEMM e COOCKING (1955) por reação colorimétrica com ninhidrina.

A reação foi feita em tubos de ensaio com 1 ml de amostra (10 vezes diluído), 0,5 ml de tampão citrato de sódio 0,2 M; pH 5,0; 0,2 ml de ninhidrina 5% em metil celusolve; 1,0 ml de KCN 2 % (v/v) de uma solução de KCN 0.01 M em metil celusolve. Esta mistura foi coberta com bola de vidro e levado ao Banho Térmico durante 20 min a 100°C. Após o resfriamento, foi adicionado etanol 60% até que se completasse 4 ml de solução. A leitura foi feita a 570 nm.

Os valores de absorbância obtidos foram relacionados com concentração de aminoácidos com o auxílio de uma curva padrão preparada com leucina na faixa de 0 a 200 nmoles/ml .Os valores das concentrações de aminoácidos foram expressos por nmoles de aminoácidos/ml de exsudato.

3.5.-IDENTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

3.5.1- DERIVAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS

A derivação dos aminoácidos se deu por dois sistemas distintos, um utilizou o reagente OPA (o-ftaldialdeído), que determina os aminoácidos excetuando-se os sulfurados, e o outro reagente FMOC (9-fluorenilmetil cloroformato), que além dos demais aminoácidos determina também os sulfurados. Para cada espécie e cada tratamento foi feita uma análise em cada sistema.

Para a preparação das amostras com OPA, 20 µl da seiva contendo os aminoácidos livres totais e 60µl do reagente OPA (50 mg OPA em 1ml de metanol) em tampão borato 0,3 M; pH 9.5 ajustado com NaOH 2N e 1,25 % (v/v) de β-mercaptoetanol, foram misturados e agitados. Após dois minutos, 10 µl desta mistura foram injetados na coluna e os picos dos aminoácidos detectados por um monitor de fluorescência (RF 530, Shimadzu).

Para a obtenção dos derivados com FMOC, segundo EINARSSON et al. (1983), misturou-se 200 µl da amostra, 50 µl de tampão borato 1.0 M; pH 6,3 e 250 µl do reagente (FMOC, 15 mM) em acetona. A reação foi interrompida após 30 segundos e o excesso do reagente foi removido adicionando-se 1 ml de pentano. Em seguida, a fase superior foi removida com pipeta Pasteur e a operação repetida por mais duas vezes. Cada injeção da amostra correspondeu a um volume de 10 µl.

As diluições das amostras foram feitas para os dois sistemas, quando necessárias, para que a concentração final de aminoácidos por ml fosse de aproximadamente 4 nmoles.

3.5.2-SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS

A separação e a quantificação dos aminoácidos foi feita em HPLC utilizando-se uma coluna cromatográfica Spherisorb ODS2, 5 μm de 250 x 4 mm acoplada a um sistema de bombas da LKB mod. 2150, controladas por um gerador de gradiente mod. 2152.

Os solventes utilizados para o sistema OPA foram: tampão fosfato 50 mM contendo 2 % (v/v) de tetrahidrafurano e 2 % (v/v) de metanol, pH 7.5 ajustado com ácido acético concentrado (tampão A) e metanol 65 % em H_2O (tampão B). O gradiente de eluição do tampão B foi de 20 % a 60 % entre 0 e 20 minutos, 60 % a 75 % entre 20 e 25 minutos e de 75 % a 100 % entre 25 a 35 minutos. As amostras foram monitoradas por um detector de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação de 250 nm e de emissão de 480 nm. O registro foi feito através de um registrador-integrador LKB mod. 2221.

Os solventes para o sistema FMOC foram: tampão acetato 0,14 M contendo 0,1 % (v/v) de trietanolamina, pH 4,0 ajustado com NaOH 1N (tampão A) e metanol 100 % (tampão B). O gradiente de eluição do tampão B foi de 45 % a 65 % entre 0 e 25 minutos, de 65 % a 85 % entre 25 e 40 minutos e de 85 % a 100 % entre 40 e 45 minutos, a detecção dos aminoácidos foi feita em fluorímetro com comprimentos de onda de excitação de 250 nm e de emissão de 313 nm.

Todos os tampões foram feitos em água milli-Q (água deionizada com resistência de 18,2 $\Omega\omega$ obtida em deionizador Milli-Q da Millipore).

Em ambos os sistemas a quantificação dos aminoácidos que compunham cada amostra foi determinada por comparação das áreas dos picos das amostras com a área dos picos da solução padrão de aminoácidos, cuja molaridade era conhecida.

4-RESULTADOS

4.1-DEPENDÊNCIA DA ENZIMA ASNase AO ÍON K^+

A distribuição das duas formas de ASNase (dependente e independente do íon K^+) foi investigada em sementes imaturas de *Crotalaria* dosando-se a enzima na presença e ausência de K^+ pelo método de difusão de NH_4^+ .

De acordo com os dados obtidos nestas investigações, encontramos nas espécies do gênero em questão ambas as formas enzimáticas. Não foram observadas as duas formas ocorrendo juntas numa mesma planta.

Nas espécies estudadas do gênero *Crotalaria* a maior ocorrência foi de ASNase independente de K^+ , embora tenha sido encontrado um número razoável de espécies dependentes. Das treze espécies em estudos, cinco apresentaram ASNase dependente de K^+ , sendo a enzima independente do íon para o restante das espécies (TABELA 1).

Nos experimentos que determinaram a dependência de K^+ , notamos uma atividade enzimática residual na ausência do íon. Para as espécies ditas dependentes, foram encontrados valores entre 3 e 7 % do valor máximo da atividade quando o K^+ estava disponível no meio de reação.

Observações morfológicas mostraram que as componentes estudadas deste gênero podem apresentar a folha uni ou trifoliolada (FIGURA 5 e 6).

TABELA 1 - Distribuição das formas de ASNase dependente e independente de K^+ em sementes imaturas do gênero *Crotalaria*.

	ASNase dep de K^+	ASNase indep de K^+
<i>C. estipularia</i>	+	
<i>C. jimcea</i>	+	
<i>C. paulina</i>	-	
<i>C. retusa</i>	-	
<i>C. spectabilis</i>	+	
<i>C. anagyroides</i>		+
<i>C. grantiana</i>		+
<i>C. incana</i>		+
<i>C. lanceolata</i>		+
<i>C. mucronata</i>		+
<i>C. striata</i>		+
<i>C. usaramoensis</i>		+
<i>C. zanzibarica</i>		+



FIGURA 5- Morfologia foliar (unifoliolada) de *Crotalaria spectabilis*.



FIGURA 6- Morfologia foliar (trifoliolada) de *Crotalaria zanzibarica*.

Uma relação quanto à morfologia da folha e a forma enzimática foi estabelecida, uma vez que todas as espécies unifolioladas apresentaram ASNase dependente de K^+ , e a forma independente do íon só ocorreu nas espécies trifolioladas.

Constatou-se que o nível de atividade da ASNase dependente de K^+ manteve-se relativamente baixo, sempre inferior à 2000 $\mu\text{moles de NH}_4^+/\text{h. g tecido}$ (FIGURA 7) quando comparada a atividade de ASNase independente de K^+ (FIGURA 8). Porém, a variação do nível de atividade para as espécies que compõem o grupo das dependentes não foi muito acentuada, tendo sido a mínima atividade registrada para *C. retusa* com 423,55 $\mu\text{moles NH}_4^+ / \text{h. g tecido}$, e a máxima para *C. paulina*, com 1.570,82 $\mu\text{moles NH}_4^+/\text{h. g tecido}$.

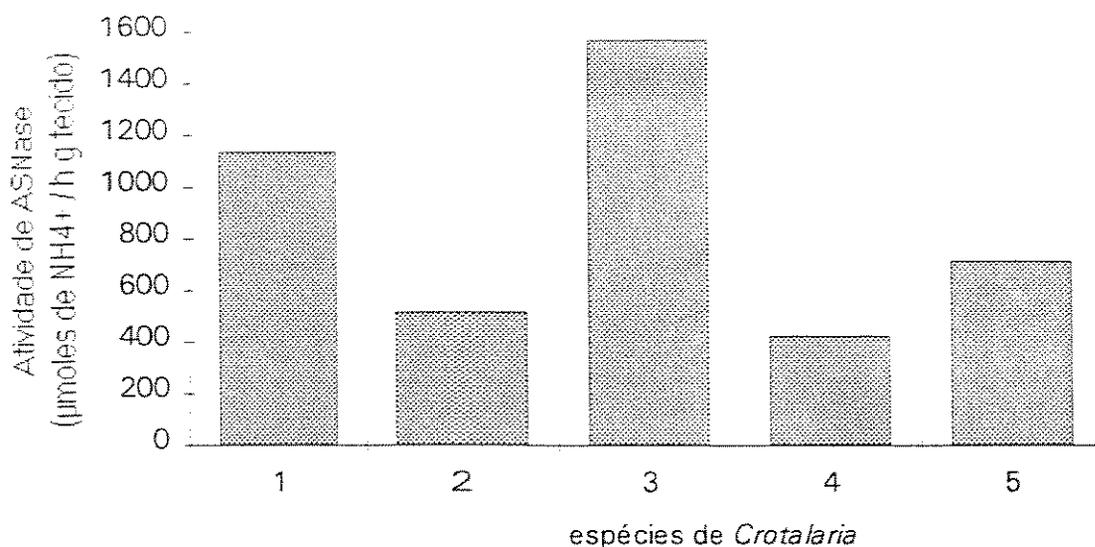


FIGURA 7 - Atividade de ASNase dependente de K^+ obtido em sementes imaturas de *Crotalaria* (1. *C. estipilaria*, 2. *C. juncea*, 3. *C. paulina*, 4. *C. retusa*, 5. *C. spectabilis*)

Para as espécies com ASNase independente de K^+ a variação média da atividade da enzima foi um pouco maior (FIGURA 8). As espécies deste grupo tiveram uma variação de atividade enzimática desde níveis elevados (mais de 4.500 $\mu\text{moles NH}_4^+/\text{h. g tecido}$ para *C. grantiana*) até níveis iguais aos das dependentes de K^+ (aproximadamente 500 $\mu\text{moles NH}_4^+/\text{h. g tecido}$ para *C. lanceolata*). *C. striata*, *C. grantiana* e *C. zanzibarica* tiveram atividade superior à 3000 $\mu\text{moles NH}_4^+/\text{h. g tecido}$, ficando as outras cinco espécies com níveis inferiores à 2000 $\mu\text{moles NH}_4^+/\text{h. g tecido}$.

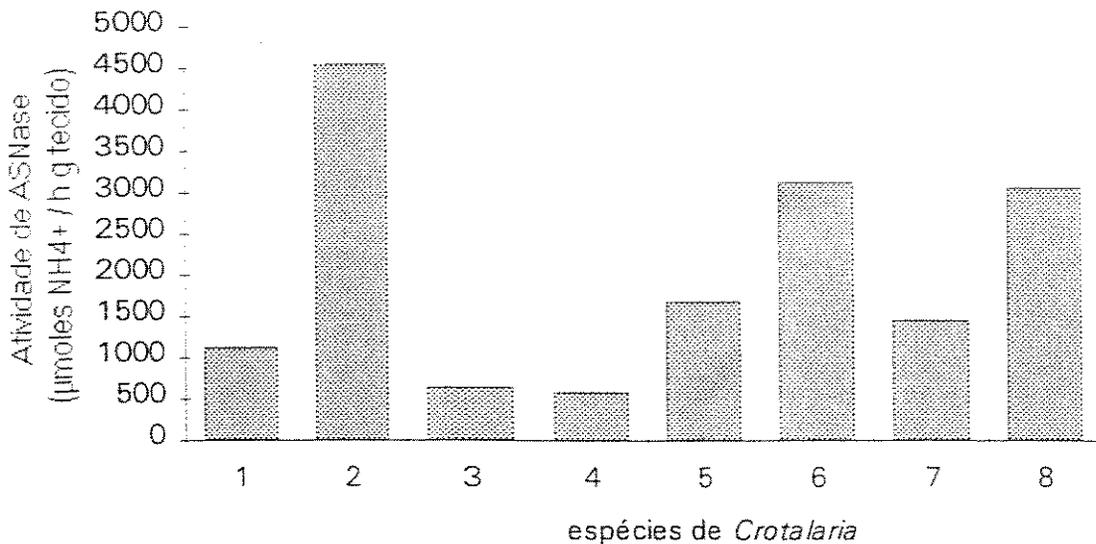


FIGURA 8 - Atividade de ASNase independente de K^+ obtido em sementes imaturas de *Crotalaria* (1. *C. anagyroides*, 2. *C. grantiana*, 3. *C. incana*, 4. *C. lanceolata*, 5. *C. mucronata*, 6. *C. striata*, 7. *C. usaramoensis*, 8. *C. zanzibarica*).

4.2-ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

4.2.1-IMUNODIFUSÃO

Tendo em mãos um anticorpo específico para ASNase independente de K^+ , embora de outra espécie (*Lupinus polyphyllus*), julgamos interessante verificar a reação desse anticorpo com os extratos de *Crotalaria*. Principalmente no caso das espécies que possuem a enzima independente do K^+ , a possibilidade de uma reação seria maior. Os testes inicialmente foram realizados pela técnica de imunodifusão, utilizando o extrato bruto das sementes imaturas de todas as espécies de *Crotalaria* em questão e, como controle, o extrato bruto das sementes de *Lupinus polyphyllus*. A reação imunológica antígeno-anticorpo não foi detectada em nenhum dos materiais testados, inclusive *L. polyphyllus*, espécie em que anteriormente foi purificada a enzima que serviu como antígeno para a produção do anticorpo.

4.2.2-ELETROFORESE E TRANSFERÊNCIA DAS BANDAS

Em função do resultado negativo com o teste de imunodifusão, foi utilizado um outro ensaio imunológico mais sensível e mais específico. A técnica envolve a separação de proteínas por eletroforese, transferência das bandas do gel para uma membrana e posterior reação imunológica.

Após efetuada a eletrotransferência para a membrana de nitrocelulose, observamos que das treze espécies de *Crotalaria* estudadas apenas duas, *C. juncea* e *C. striata*, apresentaram resultados positivos quanto à reação com o anticorpo. (FIGURAS 9 e 10). É interessante ressaltar a diferença da ASNase destas duas espécies. *C. striata* possui ASNase independente

de K^+ , assim como o material de onde foi extraída e purificada a enzima para a obtenção do anticorpo, e *C. juncea* possui ASNase dependente do íon.

Como controle do método, a reação positiva com o anticorpo sempre ocorreu quando o mesmo foi testado contra o extrato de *L. polyphyllus* produzido a partir da semente imatura no estágio onde anteriormente constatou-se os maiores níveis de atividade da ASNase (FIGURA 11).

Uma peculiaridade a ser ressaltada foi a diferença no coeficiente de mobilidade (R_m) das bandas de reação entre as espécies de *Crotalaria* e *L. Polyphyllus*. A banda de reação da ASNase de *L. polyphyllus* se dá na posição inferior do gel ($R_m=0.8$), diferentemente das bandas de reação das duas espécies de *Crotalaria*, (*C. juncea* $R_m =0.5$ e *C. striata* $R_m=0.4$) que aparecem em posições bem próximas.

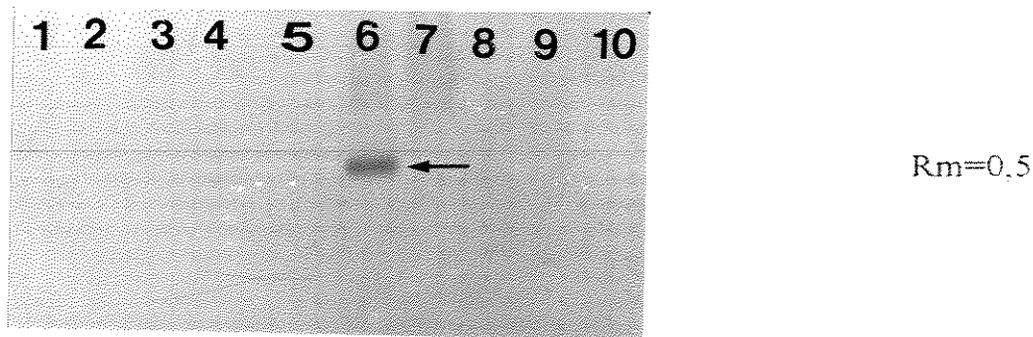
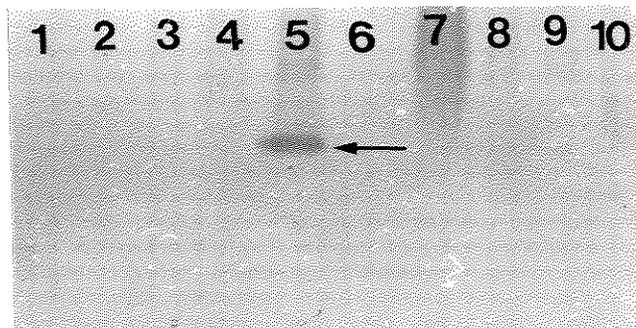
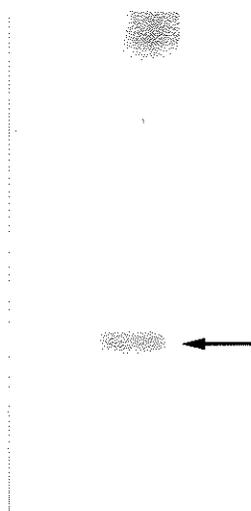


FIGURA 9- Membrana de nitrocelulose mostrando a reação positiva do anticorpo produzido a partir da enzima ASNase purificada de *Lupinus polyphyllus* com o extrato bruto de sementes imaturas de *Crotalaria juncea* (1. *C. estipularia*, 2. *C. paulina*, 3. *C. retusa*, 4. *C. spectabilis*, 5. *C. incana*, 6. *C. juncea*, 7. *C. grantiana*, 8. *C. incana*, 9. *C. lanceolata*, 10. *C. mucronata*).



Rm=0,4

FIGURA 10-Membrana de nitrocelulose mostrando a reação positiva do anticorpo produzido a partir da enzima ASNase purificada de *Lupinus polyphyllus* com o extrato bruto de sementes imaturas de *Crotalaria striata*.(1. *C. usaramoensis*, 2. *zanzibarica*, 3. *C. anagyroides*, 4. *C. estipularia*, 5. *C. striata*, 6. BSA, 7. *C. micronata*, 8. *C. retusa*, 9. *C.spectabilis*, 10. *C. grantiana*).



Rm=0,8

FIGURA 11- Membrana de nitrocelulose mostrando a reação positiva do anticorpo produzido a partir da enzima ASNase purificada de *Lupinus polyphyllus* com o extrato bruto de sementes imaturas da mesma espécie.

4.3-UREÍDEOS

Foram determinados os teores de ureídeos na seiva do xilema das espécies de *Crotalaria*. Utilizou-se plantas com idade de quatro meses nos tratamentos nodulado e não nodulado e em estádios de desenvolvimento vegetativo e floral. A não uniformidade do estágio de desenvolvimento foi devida ao florescimento precoce e a falta de informação quanto ao controle de floração destas espécies. Devido ao baixo fluxo da seiva, a coleta do exsudato ficou comprometida em alguns tratamentos, onde não foi possível a sua obtenção.

A partir da determinação do teor de ureídeos e de outros compostos nitrogenados do exsudato do xilema, pôde-se estabelecer qual o principal soluto carregador de N para as espécies estudadas deste gênero.

Como já foi dito anteriormente, no caso de algumas leguminosas tropicais (tribo *Phaseolae*), os ureídeos (alantoina e ácido alantóico) podem ser utilizados como translocadores de N em plantas noduladas

Nas espécies onde se determinou o teor de ureídeos, encontramos sempre um nível muito baixo desses compostos. A concentração de alantoina e ácido alantóico nestas plantas esteve distribuída na faixa de 55 à 150 nmoles de ureídeos por ml de exsudato. Porém uma única espécie, *C. mucronata*, apresentou uma concentração um pouco mais elevada de ureídeos em sua seiva bruta, cerca de 270 nmoles por ml de exsudato (FIGURA 12).

Aparentemente plantas em estágio vegetativo ou floral não apresentaram grande variação quanto aos níveis de concentração de ureídeos encontrados em sua seiva bruta (FIGURA 12), sugerindo que a produção de ureídeos não esteve relacionada com o estágio de desenvolvimento em que a planta se encontrava.

Excetuando-se *C. mucronata*, também não se observou uma variação no nível de concentração de ureídeos devido a existência ou não de nodulação (FIGURA 13). Deste modo, a fonte disponível de N para a planta, (N atmosférico no caso das plantas noduladas, ou N inorgânico no caso das tratadas com nitrato) parece não ser fator determinante na produção desses compostos.

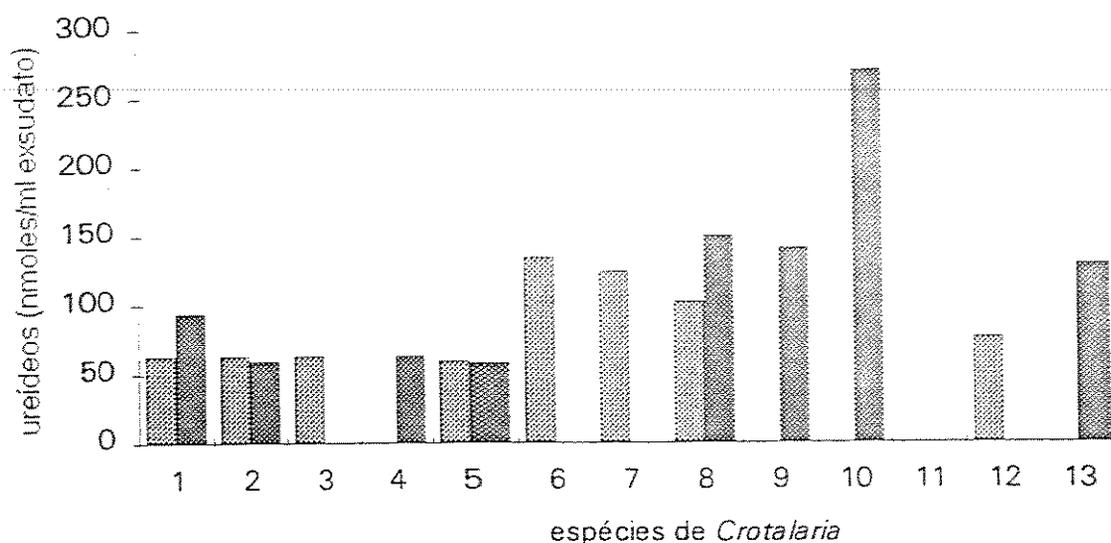


FIGURA 12 - Teor de ureídeos do exsudato de espécies de *Crotalaria* não noduladas em estádios de desenvolvimento vegetativo e floral (1. *C. estipularia*, 2. *C. juncea*, 3. *C. paulina*, 4. *C. retusa*, 5. *C. spectabilis*, 6. *C. anagyroides*, 7. *C. grantiana*, 8. *C. incana*, 9. *C. lanceolata*, 10. *C. mucronata*, 11. *C. striata*, 12. *C. usaramoensis*, 13. *C. zanzibarica*)
 vegetativo sem nódulo floral sem nódulo.

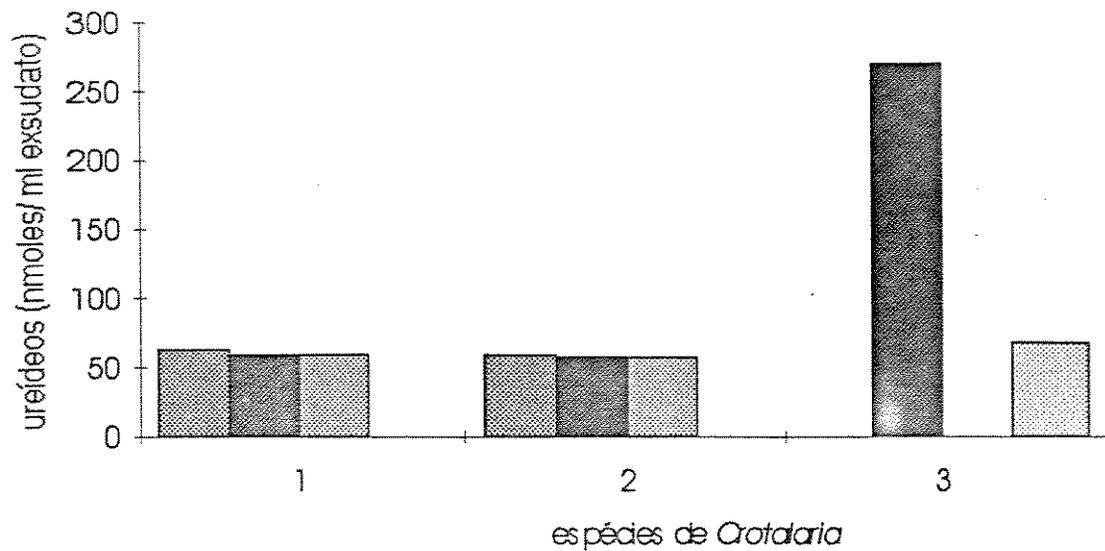


FIGURA 13 - Teor de ureídeos do exsudato de espécies de *Crotalaria* noduladas e não noduladas e em estádios de desenvolvimento vegetativo e floral (1. *C. juncea*, 2. *C. spectabilis*, 3. *C. mucronata*)  vegetativo sem nódulo  floral sem nódulo  vegetativo com nódulo  floral com nódulo.

4.4 - AMINOÁCIDOS

4.4.1-AMINOÁCIDOS LIVRES TOTAIS

A dosagem dos aminoácidos foi feita no exsudato da seiva do xilema das treze espécies de *Crotalaria* em idade de quatro meses e nos diferentes tratamentos e estádios fisiológicos. Devido a alta eficiência do método, para cada tratamento e espécie foi feita uma única repetição. Apesar do propósito do experimento ter sido fazer um estudo comparativo entre os níveis de compostos nitrogenados nos diferentes tratamentos e estádios de desenvolvimento das plantas, não foi possível coletar amostras de seiva em todos os tratamentos, devido ao baixo fluxo da seiva durante a coleta.

A partir dos dados obtidos nestas dosagens, pudemos determinar qual a concentração dos aminoácidos que são encontrados como constituintes da seiva e, comparativamente com o nível já conhecido de ureídeos, indicar quais dos compostos nitrogenados são os preferencialmente transportados nestas leguminosas tropicais.

A concentração dos aminoácidos livres, dosados na seiva bruta das leguminosas estudadas, manteve-se sempre elevado, mostrando ser este o principal grupo de compostos transportadores de nitrogênio para as espécies estudadas de *Crotalaria* (FIGURA 14). A quantidade deste composto constituinte da seiva apresentou variações dependendo da espécie, tendo sido o nível máximo verificado de 11 μ moles de aminoácidos por ml de exsudato, e o mínimo de 1,7. A concentração de aminoácidos livres apresentou sua maior distribuição entre os valores de 2,5 a 6,5 μ moles de aminoácidos por ml de exsudato, faixa onde aproximadamente 80% das espécies se enquadram. Os 20% restantes são representados por duas espécies, *C. grantiana* e *C. mucronata*, que apresentaram níveis de concentração de aminoácidos superiores a 9,5 μ moles por ml e *C. juncea*, que apresentou a menor dosagem de aminoácidos por ml de exsudato.

Em *C. grantiana* o teor de aminoácidos foi o mais elevado observado entre as espécies estudadas, porém o mesmo não ocorreu com o nível de ureídeos, que manteve-se igual ou bem próximo as demais espécies deste gênero.

C. mucronata, foi a única que apresentou níveis bastantes distintos de aminoácidos entre plantas noduladas e não noduladas. Excetuando-se o ocorrido nesta espécie, não se observou diferença para os níveis de aminoácidos verificados para plantas noduladas ou não ou em função de seu estágio de desenvolvimento (FIGURA 15).

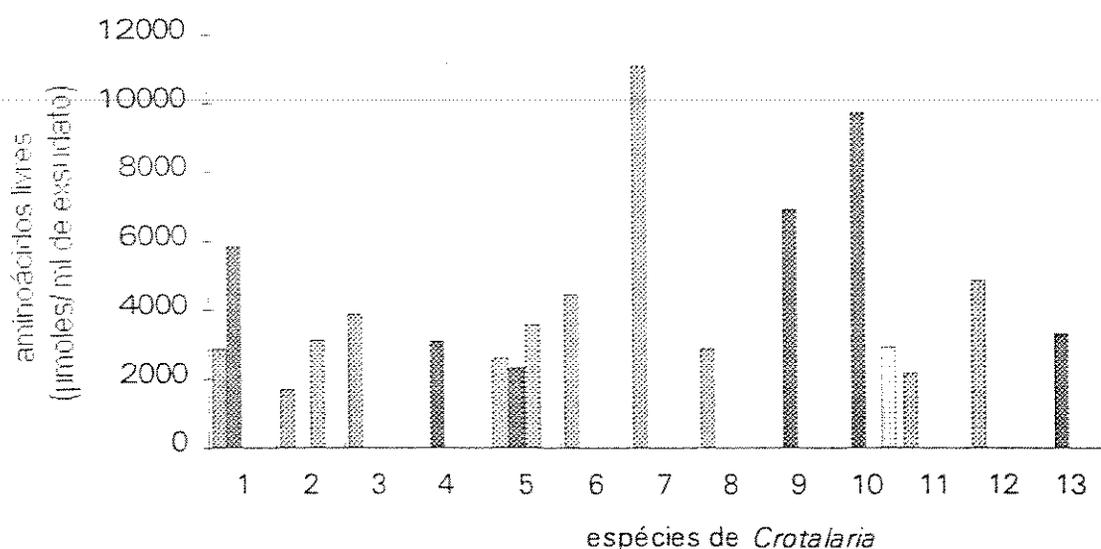


FIGURA 14 - Teor de aminoácidos livres do exsudato das espécies de *Crotalaria* noduladas e não noduladas e em estádios de desenvolvimento vegetativo e floral.(1. *C. estipularia*, 2. *C. juncea*, 3. *C. paulina*, 4. *C. retusa*, 5. *C. spectabilis*, 6. *C. anagyroides*, 7. *C. grantiana*, 8. *C. incana*, 9. *C. lanceolata*, 10. *C. mucronata*, 11. *C. striata*, 12. *C. usaramoensis*, 13. *C. zanzibarica*) vegetativo sem nódulo floral sem nódulo vegetativo com nódulo floral com nódulo.

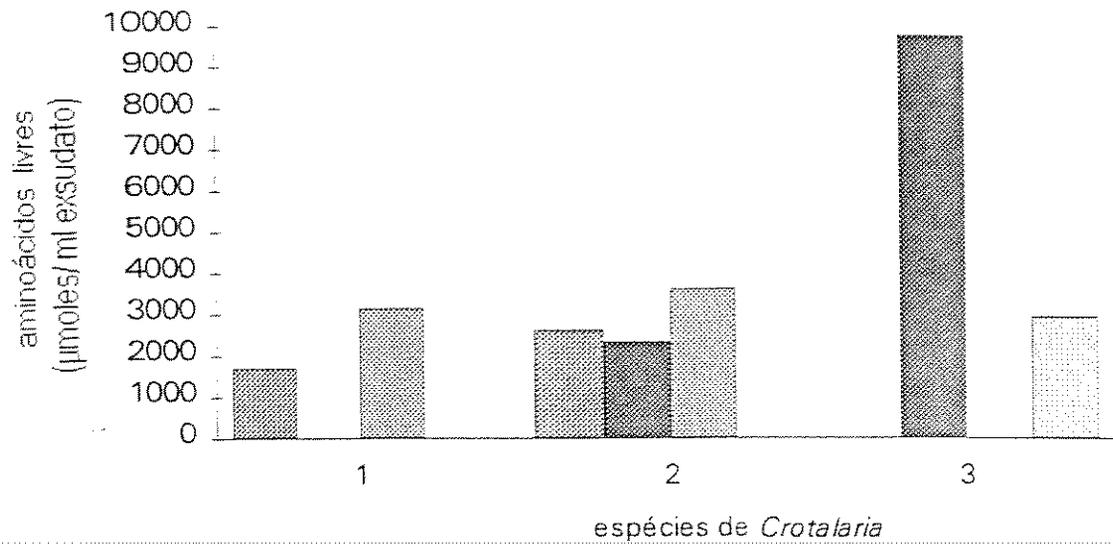


FIGURA 15 - Teor de aminoácidos livres do exsudato de espécies de *Crotalaria* noduladas e não noduladas e em estádios de desenvolvimento vegetativo e floral.(1. *C. juncea*, 2. *C. spectabilis*, 3. *C. mucronata*)  vegetativo sem nódulo  floral sem nódulo  vegetativo com nódulo  floral com nódulo.

4.4.2-COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES

Neste experimento também encontramos dificuldades para a coleta das amostras de seiva, o que resultou na ausência de alguns tratamentos.

De acordo com as dosagens por HPLC, de todos os aminoácidos encontrados na seiva do xilema, a ASN foi a de concentração mais alta. Em todas as espécies, tratamentos e estádios de desenvolvimento, a ASN representou de 50 a 70% dos aminoácidos transportados (TABELA 2).

Em *C. juncea* e *C. spectabilis*, a concentração de ASN foi um pouco maior no tratamento sem nodulação. No caso de *C. mucronata*, observa-se que o nível de ASN é aproximadamente igual nos dois tratamentos. Para este mesmo aminoácido, em *C. spectabilis*, nota-se que quando a planta está em estágio floral, ocorre um ligeiro aumento na sua concentração.

Depois da ASN, os aminoácidos ASP e GLN foram os mais abundantes, sendo que o ASP só foi superado por GLN uma única vez, no tratamento sem nodulação e no estágio vegetativo em *C. juncea*. Nos demais casos, independente da espécie, tratamento ou estágio de desenvolvimento, o nível da concentração de ASP foi sempre muito mais elevado (aproximadamente 10 vezes maior) que o de GLN.

Em *C. juncea*, observa-se que os aminoácidos transportados preferencialmente, ASN e GLN, são os únicos que aparecem em maiores concentrações no tratamento sem nódulos. Os demais aminoácidos nesta espécie apresentaram uma maior concentração no tratamento com nodulação.

Excetuando-se a ASN, ASP e GLN, a concentração dos demais aminoácidos foi baixa (TABELA 2).

TABELA 2-Quantidade relativa de aminoácidos encontrados na seiva do xilema de algumas espécies de *Crotalaria* noduladas e não noduladas em dois estádios de desenvolvimento (vsn- vegetativo sem nódulo, vcn- vegetativo com nódulo, fsn- floral sem nódulo, fcn-floral com nódulo). Os aminoácidos HIS, GLY, TYR, MET, PHE, ILE, LEU e LYS foram retirados da tabela por apresentarem concentração menor que 1,5 %. * Aminoácidos não detectados.

Amino- ácidos	Teor de aminoácidos (%)							
	<i>C. grantiana</i>	<i>C. micronata</i>		<i>C. spectabilis</i>			<i>C. juncea</i>	
	vsn	fsn	fcn	fsn	vsn	vcn	vsn	vcn
ASP	27,81	20,97	12,77	19,58	24,43	21,97	5,22	7,58
GLU	1,74	1,56	2,85	2,03	1,58	3,61	0,63	1,65
ASN	52,69	67,40	69,12	63,78	57,38	52,96	70,30	56,63
SER	1,04	1,39	1,97	0,71	0,80	0,69	0,70	1,86
GLN	2,06	1,03	3,66	3,43	8,00	2,96	13,08	6,52
THR	1,76	1,03	1,88	1,79	1,71	1,62	1,55	2,62
ALA	1,37	0,59	2,15	*	0,81	0,65	0,69	1,56
GABA	1,74	1,65	1,80	*	*	2,93	1,38	1,23
VAL	2,42	1,99	1,80	2,35	2,30	6,10	1,31	2,24
PRO	2,14	1,36	1,39	0,88	1,67	0,65	0,27	6,27

Um fato interessante a ser ressaltado é quanto a concentração de GLU. Para todas as espécies e em todos os estádios de desenvolvimento, embora os valores fossem pequenos, a concentração de GLU sempre foi maior nas plantas que apresentavam nodulação.

C. micronata apresentou a menor diversidade de aminoácidos. Quatro aminoácidos (HIS, GLY, TYR e MET) dos dezenove determinados não compunham a seiva desta espécie. A determinação da composição dos aminoácidos mostrou que TYR e MET também não estavam presentes na seiva de *C. spectabilis*.

Com base em tais resultados, pode-se afirmar que as quatro espécies analisadas utilizam preferencialmente aminas como principal composto transportador de N. Entretanto isto não pode ser generalizado para todas as espécies de *Crotalaria* tendo em vista o número de espécies estudadas.

5-DISCUSSÃO

5.1-DEPENDÊNCIA DA ENZIMA ASNase AO K^+

A forma enzimática independente de K^+ foi a mais encontrada para a enzima ASNase no metabolismo das espécies estudadas do gênero *Crotalaria*. Foram encontradas oito espécies independentes e cinco dependentes. A forma independente só havia sido registrada na literatura para algumas espécies do gênero *Lupinus*, como *Lupinus polyphyllus*, (SODEK *et al.*, 1980) *Lupinus angustifolius* e *Lupinus arboreus* (CHANG e FARDEN, 1981), que são nativas de regiões temperadas.

A ocorrência de um grande número de espécies com ASNase independente de K^+ num mesmo gênero é um fato inédito na literatura. Isto sugere que apesar dos poucos registros esta forma enzimática seja amplamente distribuída entre as leguminosas. Resta saber se ela tem uma grande ocorrência entre leguminosas tropicais, uma vez que pouco se conhece sobre esta enzima em plantas de clima quente.

A presença das duas formas enzimáticas não foi verificada numa mesma espécie e em um mesmo tecido, porém CHANG e FARDEN (1981), trabalhando com *L. angustifolius* e *L. arboreus*, verificaram a ocorrência das duas formas na mesma espécie, mas em órgãos diferentes. Estas espécies apresentavam ASNase independente de K^+ nas sementes e ASNase dependente na folha, apesar do nível da enzima ser baixo nos extratos de folhas (o que provavelmente não se deve à forma enzimática, mas ao que já foi discutido anteriormente sobre a maior distribuição da ASN aminotransferase nestes órgãos). Deste modo, apesar da baixa atividade, é possível se encontrar as duas formas enzimáticas numa mesma espécie.

SODEK et al. (1993), utilizando a metodologia de "Western-blot" com extrato bruto de sementes imaturas de ervilha (espécie dependente de K^+) e anticorpo de *L. polyphyllus* (independente de K^+), verificaram uma reação positiva, embora a banda tenha apresentado uma baixa intensidade. Esta reação positiva não se repetiu quando o extrato utilizado de ervilha estava parcialmente purificado, mas considerando-se a sensibilidade desta técnica na detecção do antígeno, levanta-se a possibilidade da existência das duas formas num mesmo tecido. Neste caso a forma independente de K^+ estaria presente em níveis baixíssimos e a enzima poderia ter sido descartada durante o processo de purificação. Em nosso trabalho, para as espécies apresentando dependência de K^+ , foi observada atividade residual da ASNase quando o K^+ foi retirado do meio de incubação. Apesar de não sabermos a razão desta baixa atividade, poderia ser descartada a possibilidade de um baixo nível de ASNase independente de K^+ , pois o ensaio imunológico era sensível o suficiente para detectar nos extratos brutos que foram utilizados, uma outra forma enzimática, obviamente desde que houvesse reação entre a forma de ASNase e o anticorpo de *Lupinus*. Uma possível explicação seria a não dessalinização total em Sephadex dos extratos brutos, ou erros experimentais, dada a dificuldade e variações do método.

A obtenção de um anticorpo para *Crotalaria* esclareceria esta questão, porém tendo em vista a predominância de uma das formas de ASNase nas sementes de cada espécie, aparentemente a presença da outra forma teria pouca significância fisiológica.

Um outro fato também interessante foi a relação quimiotaxonômica que pôde ser claramente verificada para as espécies aqui estudadas. Notamos que existe uma relação direta entre os caracteres morfológicos da folha e a forma enzimática da ASNase, ou seja, todas as espécies unifolioladas estudadas têm em comum a dependência de K^+ para esta enzima. Já as espécies de *Crotalaria* trifolioladas mostraram ter exclusivamente a forma independente de K^+ para ASNase. No entanto, sabe-se muito pouco sobre a presença de ASNase nas folhas. Um

dos poucos registros em literatura (SIECIECHOWICZ *et al.*, 1985; STREETER, 1977) citam a baixa atividade desta enzima nas folhas de ervilha e evidencia a alta atividade da ASN aminotransferase nas folhas desta espécie para a metabolização da ASN translocada pelo xilema.

Pela bibliografia consultada pudemos verificar que algumas relações quimiotaxonômicas para espécies deste gênero já foram estabelecidas. PILBEAM (1979) observou uma íntima correlação entre a complexidade da flor e a ocorrência de determinados aminoácidos em 163 espécies de *Crotalaria*.

Baseados em nossos dados e na literatura consultada, sugerimos então mais um indício de que haja uma estreita interação entre os caracteres morfológicos e bioquímicos para as espécies que compõem este gênero.

Porém não existe nenhum estudo que explique esta relação observada. Apesar do número de espécies estudadas, até surgirem evidências que contrariem a idéia, parece que este fenômeno pode ser devido a alguma relação genética

5.2-ENSAIOS IMUNOQUÍMICOS

Em estudos realizados por LEA *et al.* (1984) foi purificada a ASNase independente de K^+ do cotilédone imaturo de *L. polyphyllus*, a partir da qual obtiveram o anticorpo policlonal. Os testes de imunodifusão realizados mostraram ocorrer uma diferenciação por parte desse anticorpo para as ASNases dependentes e independentes do íon nas diferentes espécies de *Lupinus* estudadas. Neste trabalho foram observadas reações positivas entre o anticorpo e *L. polyphyllus* e *L. angustifolius* (espécies independentes de K^+) e ausência de reação entre o anticorpo e *L. albus* e *L. mutabilis* (espécies dependentes do íon).

Posteriormente, LOUGH *et al.* (1992) purificaram a ASNase independente de K^+ de sementes imaturas de *Lupinus arboreus*. A partir desta enzima purificada foi produzido um anticorpo policlonal e realizados testes de imunodifusão com algumas espécies de *Lupinus* (*L. polyphyllus*, *L. angustifolius*, *L. arboreus* e *L. albus*), sendo que as três primeiras possuem ASNase independentes de K^+ e *L. albus*, ASNase dependente do íon. De acordo com os dados obtidos, os autores sugerem que há uma especificidade entre o anticorpo e a ASNase independente de K^+ para as espécies estudadas de *Lupinus*. Os dados mostraram a reação positiva entre o anticorpo para ASNase independente de K^+ com as espécies deste gênero que também possuem esta forma enzimática, e a ausência de reação quando a forma da ASNase testada contra o anticorpo era a dependente do íon. Neste trabalho, os resultados sugerem um alto grau de homologia entre ASNases independentes de K^+ em *Lupinus*.

Porém, em nossos estudos com o anticorpo de *L. polyphyllus*, não constatamos essa especificidade de reação entre a forma enzimática do anticorpo e a forma enzimática do antígeno (embora os antígenos fossem as espécies de *Crotalaria* dependentes e independentes de K^+). Talvez o grau de homologia entre as moléculas de ASNase independente de K^+ de *Lupinus* e *Crotalaria* não tenha sido alto o suficiente para que a reação ocorresse.

5.2.1-IMUNODIFUSÃO

O uso do anticorpo para a ASNase independente de *L. polyphyllus* com extratos de várias espécies de *Crotalaria* empregando a técnica de imunodifusão resultou na ausência da reação antígeno-anticorpo. Porém os resultados negativos parecem não ter grande significância, levando-se em conta que a reação também não foi observada com o próprio extrato de *L. polyphyllus*. Acreditamos que o problema esteja relacionado com a sensibilidade do método,

tendo em vista o aparecimento de bandas quando se utilizou a técnica mais sensível de eletrotransferência ("Western-blot").

5.2.2-TESTE IMUNOLÓGICO EM MEMBRANA DE NITROCELULOSE

Nas membranas de nitrocelulose, para a qual foram transferidas as proteínas dos extratos brutos, foi detectada a reação antígeno-anticorpo apenas com o extrato de duas espécies de *Crotalaria*, além da reação com o próprio *L. polyphyllus*.

Embora o anticorpo utilizado nas reações para determinação da presença da ASNase tenha sido produzido a partir da enzima independente de K^+ de *L. polyphyllus*, não se estabeleceu uma relação de reconhecimento entre a molécula do anticorpo e a enzima pela forma enzimática independente deste íon. Isto pode ser observado pelos dados positivos com as espécies tanto dependente de K^+ (*C. juncea*) como independente do íon (*C. striata*). Deste modo, sugere-se que a porção da molécula de ASNase onde se liga o anticorpo específico para esta enzima não é a mesma porção que determina a dependência ao K^+ . Para as espécies que reagiram positivamente contra o anticorpo, podemos inferir que suas ASNases possuem um sítio de ligação similar e compatível com o anticorpo, onde este se liga e promove a reação.

Baseados nos resultados referentes aos Rms das bandas de reação da enzima com o anticorpo, notamos uma diferença na mobilidade da ASNase de *L. polyphyllus* e das espécies de *Crotalaria*. Estes resultados não estão em concordância com o que foi observado por LOUGH (1992) em *Lupinus*, onde as três espécies independentes reagiram positivamente com o anticorpo e apresentaram a banda de reação na mesma posição da banda da enzima purificada (que serviu de antígeno para a produção do anticorpo). AGUIAR (dados não publicados) também encontrou valores de mobilidade diferentes para a ASNase de *Crotalaria* e *L. polyphyllus*. Sugerimos que o fato dos Rms serem diferentes entre o *Lupinus* e as espécies de

Crotalaria pode ser devido a diferença de peso molecular entre as ASNases destas espécies, uma vez que os Rms apresentaram uma diferença considerável (*C. juncea* Rm=0,5, *C. striata* Rm=0,4 e *L. polyphyllus* Rm=0,8).

Esta situação levanta a hipótese, ainda que remota, de que a reação possa estar ocorrendo entre o anticorpo e uma outra molécula qualquer que não seja a ASNase, mas que possua em sua conformação molecular um sítio de ligação compatível ao anticorpo.

De qualquer forma, antes que se teste a presença da reação antígeno-anticorpo utilizando o anticorpo produzido a partir de *Crotalaria*, não deve ser feita uma generalização quanto aos fatores que determinam a reação entre o anticorpo e o antígeno, pois se a reação ocorresse em função da forma enzimática, mesmo utilizando *Crotalaria*, nossos resultados confirmariam os dados obtidos por LEA (1984) e LOUGH (1992).

5.3-UREÍDEOS E AMINOÁCIDOS LIVRES

Em um dos tratamentos de *C. mucronata*, constatou-se que o nível de ureídeos e aminoácidos foi o mais elevado comparativamente com as demais espécies. A concentração de alantoina e ácido alantóico (270 η moles/ml) para esta espécie no tratamento floral sem nódulos foi aproximadamente cinco vezes maior que a concentração destes mesmos compostos para *C. spectabilis* (55 η moles/ml) e *C. juncea* (60 η moles/ml) no mesmo tratamento.

Uma situação similar foi observada quanto ao nível de aminoácidos para estas mesmas espécies e no mesmo tratamento, ou seja, a concentração de aminoácidos também foi aproximadamente cinco vezes maior em *C. mucronata* (9.500 η moles/ml) do que em *C. spectabilis* (2.300 η moles/ml).

Isto pode ser devido ao fato do exudato desta primeira espécie provavelmente estar mais concentrado do que o exudato de *C. spectabilis* e *C. juncea* no momento da coleta, haja visto o fato da concentração tanto de ureídeos como de aminoácidos ter aumentado praticamente na mesma proporção em *C. mucronata*.

Este aumento na concentração dos compostos nitrogenados em *C. mucronata* provavelmente não foi causado por estresse hídrico, uma vez que a concentração de PRO, aminoácido que sempre aparece em níveis mais elevados quando a planta é submetida a este tipo de estresse, não apresentou alterações consideráveis.

O estudo comparativo entre os níveis de ureídeos e aminoácidos dosados nas treze espécies de *Crotalaria* em questão, independentemente do tratamento e do estágio de desenvolvimento, mostrou que quase todas as moléculas de N translocadas da raiz até a parte aérea da planta estavam na forma de aminoácidos.

Quanto aos compostos nitrogenados transportados na seiva das leguminosas, SCHUBERT (1986) e PATE (1973) citam os ureídeos como os principais constituintes com N para as leguminosas tropicais noduladas como *Glycine*, *Phaseolus* e *Vigna*. Segundo estes autores, ocorre nestas leguminosas tropicais a utilização preferencial em translocar aminoácidos (basicamente ASN e GLN) quando as plantas não apresentam nodulação. OHYAMA e KAMAZAWA (1979) verificaram que em plantas noduladas de *Glycine* e *Vigna*, os ureídeos representam cerca de 80 % do N fixado nos nódulos.

De acordo com nossos dados, observamos que mesmo nos tratamentos com nodulação, não foi verificada uma elevação na concentração de ureídeos, pelo contrário, em todas as espécies, tratamentos e estágios de desenvolvimento, a concentração de aminoácidos (principalmente ASN) sempre superou a concentração de alantoína e ácido alantóico.

É interessante ressaltar que as leguminosas tropicais citadas acima e que transportam ureídeos quando as suas plantas apresentam nodulação, pertencem a uma mesma tribo

(*Phaseolae*), e que o gênero *Crotalaria* está inserido em outra tribo (*Crotalarieae*), que devido aos poucos estudos ainda não se conhece a forma de transporte de N.

Para leguminosas de clima temperado como *Pisum*, *Lupinus*, *Vicia*, *Trifolium*, *Medicago* e *Lotus*, constatou-se que, assim como em *Crotalaria*, os aminoácidos são os compostos nitrogenados predominantes na seiva, seja a planta nodulada ou não. Uma diferença a ser ressaltada é que as leguminosas de clima temperado citadas transportam preferencialmente ASN e GLN (SCHUBERT, 1986 e PATE, 1973) e que para *Crotalaria* observamos ASN e ASP como constituintes principais da seiva.

O alto nível na concentração de ASP em *Crotalaria* pode estar associado a presença na raiz de algumas enzimas, como por exemplo a ASNase, que hidrolisariam a ASN formada nesta região.

Sugerimos então que, para as espécies estudadas de *Crotalaria*, as concentrações de ureídeos e aminoácidos transportados pelo xilema não sofrem alterações se a fonte de N for o NO_3^- , ou se o N for obtido na forma orgânica (pela fixação simbiótica).

Segundo SCHUBERT (1986), a ASN é mais solúvel que os ureídeos. Tendo em vista a capacidade colonizadora das espécies do gênero *Crotalaria* para ambientes perturbados, onde em geral as plantas são submetidas a escassez de água, a produção de ASN preferencialmente à produção de ureídeos daria a estas plantas uma vantagem competitiva em relação as demais.

Existem outras vantagens na utilização de ASN como composto transportador de N. Ela possui uma relação C:N de 2:1 (o que é relativamente alto para aminoácidos) (PATE, 1973), é mais solúvel que os ureídeos (SCHUBERT, 1986), mais estável que a GLN (LARSEN, 1980) ou ureídeos em solução (PATE, 1983) e é móvel em pH fisiológico (PATE, 1980; McNEIL *et al.*, 1979). Outro fator importante é que se trata de um aminoácido neutro, que não sofre metabolização durante o transporte e que tem uma relativa facilidade em

ser translocado do xilema para o floema da planta, posteriormente sendo descarregado nos órgãos dreno.

A existência ou não de nódulos na raiz parece ter efeito na concentração dos aminoácidos que compõem a seiva.

STREETER (1972) encontrou na ASN o constituinte principal da seiva de plantas de soja noduladas. Posteriormente, McCLURE e ISRAEL (1979) notaram que a ASN era o principal aminoácido tanto para plantas noduladas como não noduladas de soja, porém a concentração de ASN era diferente nos dois tratamentos. Nas plantas noduladas, 53 % da composição de aminoácidos da seiva era ASN e nas plantas não noduladas, este aminoácido representava um total de 73 % dos transportados na seiva.

Apesar de nossos resultados não serem conclusivos como os de McCLURE e ISRAEL (1979), pudemos notar algumas variações no nível de concentração de ASN para *C. spectabilis* e *C. juncea*, onde os tratamentos com nodulação apresentaram uma concentração de ASN menor (respectivamente 53 % e 57 %) que os tratamentos não nodulados (aproximadamente 60 % e 70 % respectivamente).

Embora ocorra uma pequena diminuição no teor de ASN nas plantas noduladas, este aminoácido continua sendo a principal fonte de transporte de N da seiva do xilema das espécies de *Crotalaria*. Isto demonstra o importante papel da enzima ASNase nestas plantas e principalmente nas sementes imaturas das espécies deste gênero, dado o envolvimento desta enzima na metabolização da maior parte do N que chega até estas sementes.

6-BIBLIOGRAFIA

- ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; SHARKEY, P.J. 1975. Asparagine metabolism-key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. **Plant Physiol.**,56:807-812.
- ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; PEOPLES, M.B.; JOY, K.W. 1983. Amino acid transport and metabolism in relation to the nitrogen economy of a legume leaf. **Plant Physiol.**,71:841-848.
- AULD, B.A.; MENZ, K.M.; TISDELL, C.A. 1987. Weed Control Economics. **Academic Press**,London. 177 p.
- BASTA, S.D.; BASTA, F. 1982. Estudos sobre a germinação e desenvolvimento de *Crotalaria retusa* L.,Resumos do III Congresso Latino Americano de Botânica.Peru.
- BAUER, A., JOY, K.W.; URQUHART, A.A. 1977. Amino acids metabolism in pea leaves. Labelling studies on utilization of amides. **Plant Physiol.**, 59:920-924.
- BRAY, C.M. 1983. Purines, pyrimidines and their derivatives. IN: Nitrogen metabolism in plants. Logman Group Limited. Longma Inc.New York, pp. 88-119.
- CHANG, K.S.; FARDEN, K.J.F. 1981. Purification and properties of asparaginase from *Lupinus arboreus* and *Lupinus angustifolius*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 208:49-58.
- DERBYSHIRE, E. ; WRIGHT, D.J.;BOULTER, D. 1976. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds- Review. **Phytochemistry**, 15:3-24.

- DOUGALL, D.K. 1974. Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **58**:639-646.
- EINARSSON, S.; JOSEFSSON, B. e LAGERKVIST, S. 1983. Determination of amino acids with 9-fluoronylmethyl chloroformate and reserved-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, **282**: 609-618.
- FADER, G.M.; KOLLER, H.R. 1985. Seed growth rate and carbohydrate pool sizes of the soybean fruit. **Plant. Physiol.**, **79**:663-666.
-
- FLINN, A.M.; PATE, J.S. 1968. Biochemical and physiological changes during maturation of fruit of field pea (*Pisum sativum* L.). **Ann.Bot.**, **32**:479-495.
- FOWLER, M.W.; JESSUP, W.; SARKISSIAN, G.S. 1974. Glutamate synthase type activity in higher plants. **FEBS Lett.**, **46**:340-342.
- GEMTCHUJNICOV, I.D. 1976. Manual de Taxonomia Vegetal, S.P., DE. Agrônômica Ceres, 368 p.
- GIURNOS, E.C. 1985. **Estudos Organográficos e Anatômicos de Espécies do Gênero *Crotalaria* (Leguminosae) em Três Estádios de Desenvolvimento Vegetativo.** Tese apresentada à Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" , para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas , Rio Claro-S.P. .126 p.
- GOMES, M.A.F.; SODEK, L. 1984. Alantoinase and asparaginase activities in maturing fruits of nodulated and non-nodulated soybeans. **Physiol. Plant.**, **62**:105-109.

- HAGA, K.I.; SODEK, L. 1987. Utilization of nitrogen sources by immature soybean cotyledons in culture. **Ann. Bot.**, 59:597-601.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. **Calif. Exp. Sta. Circ.** 347
- HOSTALÁCIO, S.; SODEK, L.; VÁLIO, I.F.M. 1985. Atividade de alantoinase nas diferentes partes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Rev. Bras. de Bot.**,8:81-85.
-
- IRELAND, R.J.; JOY, K.W. 1981. Two routes for asparagine metabolism in *Pisum sativum* L. **Planta**,151:289-292.
- LEA, P.J.; FOWDEN, L. 1975. Asparagine metabolism in higher plants. **Biochem. Biophys. Pflanzen**, 168:3-14.
- LEA, P.J.; FOWDEN, L.; MIFLIN, B.J. 1978. The purification and properties of asparaginase from *Lupinus* species. **Phytochemistry**, 17:217-222.
- LEA, P.J.; FESTENSTEIN, G.N.; HUGUES, J.S.; MIFLIN, B.J. 1984. An immunological and enzymological survey of asparaginase in seeds of *Lupinus*. **Phytochemistry**,23:511-514.
- LEITÃO FILHO, H.F.; ARANHA, A.; BACCHI, O. 1975. Plantas invasoras de culturas. São Paulo, **HUCITEC**, Vol II, 597 p.
- LEWIS, G.P. 1987. Legumes of Bahia. Royal Botanic Gardens (Kew), Richmond.

- LLOYD, N.D.H.; JOY, K.M. 1978. Two hidroxysuccinamic acids:a product of asparagine metabolism in plants. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**,**81**:186-192.
- LOUGH, T.J.; CHANG, K.S.; CARNE, A.; MONK, B.C.; REYNOLDS, P.H.S.; FARNDEN, K.J.F. 1992. L-asparaginase from developing seeds of *Lupinus arboreus*. **Phytochemistry**, **31(5)**:1519-1527.
- McCLURE, P.R. e ISRAEL, D.W. 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. **Plant Physiol.**, **64**:411-416.
-
- McCULLOUGH, H. 1977. The determination of ammonium in whole blood by a direct colorimetric method. **Clin. Chim. Acta** , **17**:297-304.
- McNEIL, D.L.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. 1979. Uptake and utilization of xylem-borne amino compounds by shoot organs of a legume. **Plant Physiol.**,**63**:1076-1081.
- MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. 1975. Glutamine and asparagine as nitrogen donors for reductant-dependent glutamate synthesis in pea roots. **Biochem. J.**, **149**:403-409.
- MILLER, R.H. 1967. *Crotalaria* seed morphology , anatomy and identification. **Thechnical Bulletin** , **1373**:1-73.
- MIRANDA, A.C. 1981. Sistemas de incompatibilidade e autoincompatibilidade em *Crotalaria juncea* L. Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", para a obtenção do título de Mestre em Agronomia. Piracicaba-S.P. 40 p.

- MISRA, S. ; OAKS, A. 1980. A spectrophotometric assay for asparaginase obtained from corn (*Zea mays*) endosperm tissue. **Nat. Res. Council Canada**, 80:2481-2483.
- MORI, T.E.S.; SODEK, L. 1983. Nitrogen economy of a single fruiting node of soybean. **Z. Pflanzenphysiol.**,111(1):29-38.
- MURRAY, D.R. ; CORDOVA-EDWARDS. 1984. Amino acids and amide metabolism in the bulbs and seeds of developing fruits of garden pea, *Pisum sativum* L. **New Phytol.**,97:243-252.
-
- MURRAY, D.R.; KENNEDY, I.R. 1980. Changes in activities of enzymes of nitrogen metabolism in seedcoats and cotyledons during embryo development in pea seeds. **Plant Physiol.**, 66:782-786.
- NAVAS, M.L. 1991. Using plant population biology in weed research :a strategy to improve weed management. **Weed Res**, 31:171-179.
- OAKLEY, B.R.;KIRSCH,D.R.;MORRIS,N.R.1980. A simplefield ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Anal.Biochem.**, 105(2):361-363.
- OHYAMA, T.K.; KAMAZAWA, K. 1978. Incorporation of ¹⁵N into various nitrogenous compounds in intact soybean nodules after exposure to ¹⁵N₂ gas. **Soil Sci. Plant. Nutr.**, 24:525-53.
- PATE, J.S. 1973. Uptake assimilation and transport of nitrogen compouds by plants. **Soil. Biol. Biochem.**, 5: 109-119.

PATE, J.S. 1980. Transporte and partitioning of nitrogenous solutes **Ann. Rev. Pl. Physiol.**, **31**:313-340.

PATE, S.J.; SHARKEY, P.J. ; ATKINS, C.A. 1977. Nutrition of a developing legume fruit. **Plant Physiol.**, **59**:506-510.

PATE, J.S.; SHARKEY, P.M.;LEWIS, O.A.M. 1974. Phloem bleeding from legume fruits-a technique for study of fruits nutrition. **Planta** **120**:229-243.

PATE, J.S.; SHARKEY, P.M.; LEWIS, O.A.M. 1975. Xylem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legume studies by phloem bleeding technique. **Planta** **122**:11-26.

PATRICK, J.W.; McDONALD, R. 1980. Pathway of carbon transport within developing ovules of *Phaseolus vulgaris* L. **Austr.J.Plant Physiol.**, **7**:671-684.

PEOPLES, M.B.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; MURRAY, D.R. 1985. Nitrogen nutrition and metabolic interconversion of nitrogenous solutes in developing cowpea fruits. **Plant Physiol.**,**77**:382-388.

PERNOLLET, J.C.;MOSSÉ, J. 1983. Structure and location of legume and cereal seed storage proteins. *In*: Seed proteins. J. Daussant, J., Mossé e J. Vaughan (Eds.) Academic Press, London. pp.155-191.

PILBEAM, D.J.; BELL, A.E. 1979. Free amino acids in *Crotalaria* seeds. **Phytochemistry**, **18**:973-985.

RADOSERVICH, S.; HOLT, J.S. 1984. Weed ecology John Wiley & Sons, New York.265 p.

- RAINBIRD, R.M.; THORNE, J.H.; HARDY, R.W. 1984. Role of amides, amino acids and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. **Plant Physiol.**, 74:329-334.
- RIZZINI, C.T.; MORIS, W.B. 1976. Botânica econômica EPU, EDUSP, 207 p.
- ROGNES, S.E. 1975. Glutamine-dependent asparagine synthetase from *Lupinus luteus*. **Phytochemistry** 14:1975-1982.
- ROCHAT, C.; BOULTIN, J.P. 1991. Metabolism of phloem-borne amino acids in maternal tissues of fruit of nodulates or nitrate-fed pea plants (*Pisum sativum* L.). **J. Exp. Bot.**, 42:207-214.
- SCHUBERT, K.R. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants : synthesis , transport and metabolism. **Ann. Rev. Pl. Physiol.**, 37:539-74.
- SIECIECHOWICZ, K.A.; JOY, K.W.; IRELAND, R.J. 1988. The metabolism of asparagine in plants. **Phytochemistry**, 27: 663-671.
- SIECIECHOWICZ, K.A.; JOY, K.N. 1989. The effect of plant age on asparaginase activity and amino acids levels in developing leaves of *Pisum sativum*. **Can. J. Bot.**, 67:732-736.
- SIECIECHOWICZ, K.A.; IRELAND, R.J.; JOY, K.N. 1985. Diurnal variation of asparaginase in developing pea leaves. **Plant Physiol.**, 77:506-508.
- SODEK, L.; LEA, P.J. 1993. Asparaginase from the testa of developing Lupin and pea seeds. **Phytochemistry**, 34:51-56.

- SODEK, L.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. 1980. Distribution and properties of a potassium dependent asparaginase isolated from developing seeds of *Pisum sativum* and other plants. **Plant Physiol.** **65**:22-26.
- STOREY, R.; BEEVERS, L. 1978. Enzymology of glutamine metabolism related to senescence and seed development in the pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiol.** **61**:494-500.
- SPRENT, J.I. 1980. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some *Leguminosae*. **Plant Cell Environ.**, **3**:35-43.
- STREETER, J.G. 1973. In vivo and in vitro studies of asparagine biosynthesis in soybean seedlings. **Arch. Biochem. Biophys.**, **157**:613-624.
- STREETER, J.G. 1977. Asparaginase and asparagine transaminase in soybean leaves and root nodules. **Plant Physiol.**, **60**:235-239.
- THOMPSON, J.F.; MADISON, J.T.; MUENSTER, A.M.E. 1977. In vitro culture of immature cotyledons of soybean ("*Glycine max*" L. Merr) **Ann. Bot.**, **41**:29-39.
- THORNE, J.H. 1979. Assimilate redistribution from soybean pod walls during seed development. **Agron. J.**, **71**:812-816.
- THORNE, J.H. 1980. Kinetics of ¹⁴C-photosynthate uptake by developing fruits. **Plant Physiol.**, **65**: 975-979.
- THORNE, J.H. 1985. Phloem unloading of and assimilates in developing seeds. **Amer. J. Bot.**, **74**:1122-1137.

THORNE, J.H.; 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.

URQUHART, A.A. ; JOY, K.W. 1982. Transport, metabolism, and redistribution of xylem-borne amino acids in developing pea shoots. **Plant Physiol.**, 69:1226-1232.

VOGELS, G.D.; VAN DER DRIFT, C. 1970. Differential analyses of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, 33:143-157.

WRISTON, J.C. JR ; YELLIN, T.D. 1973. *In: Advances in enzymology* (Meister, A., ed.) vol.39. p. 185. Interscience, New York.

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