



PAULO ROBERTO MOSQUIM

CULTURA IN VITRO DE "EXPLANTS" DE SOJA (Glycine max [L] Merril) :
DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA E AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE
NITROGÊNIO

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Es-
tadual de Campinas para a obten-
ção do título de Doutor em Ciên-
cias.

Orientador : Prof. Dr. LADASLAV SODEK

CAMPINAS, SP, 1989

M855c

10366/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Este exemplar corresponde à redação final da tese
defendida pelo candidato Paulo Roberto Morquim e
aprovada pela Comissão Julgadora.

28/2/89 *[Assinatura]*

Dedico este trabalho à minha
esposa Maria Cristina e aos
meus filhos Pedro Paulo e
Sílvia.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e amigo Dr. Ladaslav Sodek pela orientação e amizade com que sempre me distinguiu.

À todos os professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal responsáveis pela ampliação dos meus conhecimentos.

Aos Funcionários do Depto. de Fisiologia Vegetal, pela presteza com que sempre me atenderam e pela amizade.

Aos amigos Carlos Roberto Bueno e Kuniko Haga pelo convívio e cooperação no desenvolvimento desta tese.

À Cláudio Furtado Soares pelo apoio e amizade durante a realização do curso.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade concedida para frequentar o curso de Pós-Graduação.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelos ensinamentos e oportunidade oferecida.

À Coordenadoria do Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida durante a realização do Curso.

À todos os colegas do Curso de Pós-Graduação que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	v
ÍNDICE DE HISTOGRAMAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1. MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	16
4.1.1. Cultivo "in vitro" em Condições Semi-assépticas.....	17
4.1.2. Peso da Matéria Fresca e Seca.....	18
4.1.3. Extração e Dosagens Químicas.....	19
4.1.4. Análise Estatística.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1. EFEITO DE COFATORES.....	24
5.2. AUMENTO DIÁRIO DA MATÉRIA FRESCA E SECA DAS VAGENS E SEMENTES.....	26
5.3. INFLUÊNCIA DE MACRONUTRIENTES.....	28
5.4. EFEITO DA ADIÇÃO DE VÁRIOS NÍVEIS DE SACAROSE NO MEIO DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE MATÉRIA FRESCA E SECA.....	30

5.5. TESTE DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMINA NO MEIO DE CULTIVO.....	33
5.6. EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA DAS VAGENS E SEMENTES.....	40
5.7. EFEITO DA ADIÇÃO DE VÁRIAS FONTES DE NITROGÊNIO NO MEIO DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE MATÉRIA FRESCA, SECA DE VAGENS E SEMENTES E PROTEÍNAS NOS COTILÉDONES.	41
5.8. EFEITO DA ADIÇÃO DE GLUTAMINA, ASPARAGINA E ALANTOÍNA AO MEIO DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA, TEORES DE PROTEÍNAS, AMINOÁCIDOS LIVRES E UREÍDEOS EM TODAS AS PARTES DOS "EXPLANTS" DE SOJA.....	63
5.8.1. Peso da Matéria Seca.....	64
5.8.2. Teores de Proteínas, Aminoácidos Livres e Ureídeos em todas as partes dos "explants" de Soja.....	66
5.8.2.1. Caule.....	66
5.8.2.2. Vagem.....	72
5.8.2.3. Tegumentos.....	74
5.8.2.4. Cotilédones.....	75
5.9. DISCUSSÃO GERAL DO EFEITO DAS AMIDAS (GLUTAMINA E ASPARAGINA) E UREÍDEOS (ALANTOÍNA) SOBRE OS "EXPLANTS" DE SOJA.....	77
6. CONCLUSÕES.....	88
7. RESUMO.....	91
8. BIBLIOGRAFIA.....	94

ÍNDICE DE TABELAS

- TABELA 1 - Incremento da Matéria Fresca de Vagens e Sementes dos "Explants" de Soja Cultivados "In Vitro" por um Período de 8 Dias.....23
- TABELA 2 - Efeito da Adição de Várias Fontes de Nitrogênio ao Meio de Cultivo Sobre a Produção de Matéria Seca no Caule, Vagem, Tegumento e Cotilédones de "Explants" de Soja.....65
- TABELA 3 - Efeito da Glutamina, Asparagina e da Alantoína ao Meio de Cultivo sobre a Quantidade de Nitrogênio ($\mu\text{mol}/\text{parte}$), em Caules, Vagens, Tegumentos e Cotilédones de "Explants" de Soja.....78
- TABELA 4 - Efeito da Adição de Glutamina, Asparagina e Alantoína Sobre os Teores de Proteínas, Aminoácidos Livres e Ureídeos Totais em Caules, Vagens, Tegumentos e Cotilédones de "Explants" de Soja.....79

ÍNDICE DE HISTOGRAMAS

HISTOGRAMA 1 - Efeito da Adição de Cofatores ao Meio de Cultivo sobre a Produção de Matéria Seca em Vagem e Sementes de "Explants" de Soja.....	25
HISTOGRAMA 2 - Aumento da Matéria Seca de Sementes e Vagem de "Explants" de Soja Durante um Período de 8 Dias em Meio de Cultivo.....	27
HISTOGRAMA 3 - Influência de Meios de Cultivo Diferentes Sobre a Produção de Matéria Seca de Vagem e Sementes de "Explants" de Soja.....	29
HISTOGRAMA 4 - Influência da Adição de Várias Concentrações de Sacarose ao Meio de Cultivo sobre a Produção de Matéria Fresca de Sementes e Vagem em "Explants" de Soja.....	31
HISTOGRAMA 5 - Influência da Adição de Várias Concentrações de Sacarose ao Meio de Cultivo sobre a Produção de Matéria Seca de Sementes e Vagem em "Explants" de Soja.....	32
HISTOGRAMA 6 - Influência da Adição de Várias Concentrações de Glutamina ao Meio de Cultivo sobre a Produção de Matéria Seca de Sementes e Vagem em "Explants" de Soja.....	35

HISTOGRAMA 7 - Influência da Adição de Várias Concentrações de Glutamina ao Meio de Cultivo sobre os Teores de Proteínas em Cotilédones de "Explants" de Soja...	36
HISTOGRAMA 8 - Efeito da Adição de Sacarose e Glutamina no Meio de Cultivo, sobre a Produção de Matéria Seca de Vagem e Sementes de Soja.....	38
HISTOGRAMA 9 - Influência da Substituição do Meio de Cultivo sobre a Produção de Matéria Seca de Vagem e Sementes de "Explants" de Soja.....	40
HISTOGRAMA 10 - Efeito da Adição de Nitrato, Amônio e Mistura (Nitrato + Amônio) no Meio de Cultivo, sobre a Produção de Matéria Fresca em "Explants" de Soja.....	42
HISTOGRAMA 11 - Efeito da Adição de Nitrato, Amônio e Mistura (Nitrato + Amônio) no Meio de Cultivo, sobre a Produção de Matéria Seca em "Explants" de Soja.....	43
HISTOGRAMA 12 - Efeito da Adição de Nitrato, Amônio e Mistura (Nitrato + Amônio) no Meio de Cultivo, sobre os Teores de Proteínas em "Explants" de Soja...	44
HISTOGRAMA 13 - Efeito da Adição de Ácido Glutâmico, Glutamina e Mistura (Ácido Glutâmico + Glutamina) sobre a Produção de Matéria Seca em Sementes e Vagem de "Explants" de Soja.....	47

HISTOGRAMA 14 - Efeito da Adição de Ácido Glutâmico, Glutamina e Mistura (Ácido Glutâmico + Glutamina) no Meio de Cultivo sobre o Teor de Proteínas em "Explants" de Soja.....	48
HISTOGRAMA 15 - Efeito do Ácido Aspártico, Asparagina e Mistura (Asparagina + Ácido Aspártico) no Meio de Cultivo sobre a Produção de Matéria Seca em Vagem e Sementes de "Explants" de Soja.....	51
HISTOGRAMA 16 - Efeito do Ácido Aspártico, Asparagina e Mistura (Asparagina + Ácido Aspártico) no Meio de Cultivo sobre o Teor de Proteínas em Cotilédones de "Explants" de Soja.....	52
HISTOGRAMA 17 - Efeito do Ácido Glutâmico, Arginina e Mistura (Ácido Glutâmico + Arginina) sobre a Produção de Matéria Seca das Sementes e Vagem de "Explants" de Soja.....	54
HISTOGRAMA 18 - Efeito do Ácido Glutâmico, Arginina e Mistura (Ácido Glutâmico + Arginina) sobre o Teor de Proteínas de Cotilédones de "Explants" de Soja.....	55
HISTOGRAMA 19 - Efeito da Adição da Glicina no Meio de Cultivo, sobre a Produção de Matéria Seca de Sementes e Vagem de "Explants" de Soja.....	57
HISTOGRAMA 20 - Efeito da Adição da Glicina no Meio de Cultivo, sobre o Teor de Proteínas de Cotilédones de "Explants" de Soja.....	58

- HISTOGRAMA 21 - Efeito da Adição ao Meio de Cultivo de Asparagina, Alantoína, Ácido Alantóico e Mistura (Ácido Alantóico 56 %, Alantoína 24 % e Asparagina 20 %) sobre a Produção de Matéria Seca das Sementes e Vagem de "Explants" de Soja.....61
- HISTOGRAMA 22 - Efeito da Adição ao Meio de Cultivo de Asparagina, Alantoína, Ácido Alantóico e Mistura (Ácido Alantóico 56 %, Alantoína 24 % e Asparagina 20 %) sobre os Teores de Proteínas em Cotilédones de "Explants" de Soja.....62
- HISTOGRAMA 23 - Efeito de Várias Fontes de Nitrogênio, no Meio de Cultivo, sobre os Teores de Proteínas em Caule e Vagem de "Explants" de Soja.....67
- HISTOGRAMA 24 - Efeito de Várias Fontes de Nitrogênio, no Meio de Cultivo, sobre os Teores de Proteínas em Tegumentos e Cotilédones de "Explants" de Soja.68
- HISTOGRAMA 25 - Efeito de Várias Fontes de Nitrogênio no Meio de Cultivo sobre os Teores de Aminoácidos e Ureídeos em Caule e Vagem de "Explants" de Soja....69
- HISTOGRAMA 26 - Efeito de Várias Fontes de Nitrogênio no Meio de Cultivo sobre os Teores de Aminoácidos e Ureídeos em Tegumentos e Cotilédones de "Explants" de Soja..... 70

1 . INTRODUÇÃO

Dentre as leguminosas tropicais e sub-tropicais, a soja destaca-se como a principal fonte de divisas para o país. Além da sua importância econômica, apresenta uma característica importante que é a fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico. Este processo de fixação dispensa parcial ou completamente a necessidade de aplicação de solutos nitrogenados em leguminosas. No caso soja, por exemplo, isto representa uma economia de 75 X dos custos com fertilizantes (DOBEREINER, 1985). Nesta simbiose, os principais compostos nitrogenados transportados pela corrente transpiratória das plantas de soja são os ureídeos (alantoína e ácido alantóico), embora quantidades apreciáveis de asparagina possam estar presentes (MATSUMOTO et al, 1976; McCLURE & ISRAEL, 1979; STREETER, 1979). Trabalhos com ^{15}N têm mostrado que os ureídeos são os principais produtos da fixação simbiótica, enquanto que a asparagina está mais associada com a redução e a assimilação do nitrato (OHYAMA & KUMAZAWA, 1979).

O papel das amidas (glutamina e asparagina) e ureídeos (alantoína e ácido alantóico) na nutrição de sementes de soja em desenvolvimento tem sido recentemente estudadas (RAINBIRD et al, 1984). Utilizando-se duas técnicas, a do tegumento vazio, desenvolvida por THORNE & RAINBIRD, 1983 e a do pulso radioativo, os autores acima chegaram à conclusão que a glutamina é o principal soluto nitrogenado excretado pelo tegumento, seguido pela aspara-

gina e que os ureídeos dificilmente chegam aos cotilédones. Estas técnicas nos forneceram informações importantes sobre os compostos translocados e que efetivamente chegam aos frutos. Entretanto, falham na demonstração do processo de biossíntese de proteínas de reserva nas sementes, já que apresentam curta duração (questão de horas).

Uma outra técnica, a cultura de cotilédones imaturos de soja "in vitro", desenvolvida por THOMPSON et al, 1977, tem sido utilizada com muito sucesso, visando estudar principalmente o metabolismo de substâncias nitrogenadas em soja (RAINBIRD et al, 1984; HAGA & SODEK, 1987; TONIN, 1988). Esta técnica tem mostrado que as principais fontes de nitrogênio isoladas foram a glutamina, seguida da asparagina, as quais resultaram num aumento dos teores de proteínas de reserva nos cotilédones. Os ureídeos não foram fontes muito eficientes para este tipo de estudo.

Como os ureídeos não atingem os cotilédones das sementes de soja "in vivo", e se o fazem seus teores são irrelevantes comparados à vagens e tegumentos (RAINBIRD et al, 1984), faz-se necessário desenvolver um sistema de cultura "in vitro" que permita estudar o metabolismo das substâncias nitrogenadas que chegam aos frutos de soja. Tentativas foram feitas para desenvolver sementes de soja em vagens destacadas "in vitro" por THOMPSON et al, 1977; OBENDORF et al, 1983. Resultados positivos só foram conseguidos quando as vagens permaneceram totalmente imersas no meio de cultivo. Quando as vagens foram mergulhadas parcialmente no meio, não se conseguiu qualquer reproducibilidade dos resulta-

dos, pois as sementes apresentaram crescimento errático em relação às plantas de origem (OBENDORF et al, 1983). Esta técnica, entretanto, inviabiliza o estudo do transporte de substâncias nitrogenadas, já que coloca o meio de cultivo em contato direto com a vagem.

Até o presente momento, não se conseguiu fazer com que sementes de soja se desenvolvam em vagens destacadas em contato direto com o ar, com a entrada de nutrientes pelas vias normais de transporte. Para isto, foi objetivo deste trabalho desenvolver uma técnica que permita o cultivo das sementes, variando-se compostos nitrogenados à elas fornecidos, tais como glutamina, asparagina, ácido alantóico e alantoína e ainda outras fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio, analisando-se também o transporte e teores de aminoácidos, ureídeos e proteínas de reserva em sementes de soja.

2. OBJETIVO

Desenvolver um sistema de cultura de vagens de soja "in vitro", que possibilite estudar, dentro da planta, a eficiência da utilização pelo fruto de compostos nitrogenados, principalmente amidas, ureídeos, aminoácidos básicos, ácidos e neutros, nitrato e amônia.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O transporte à longa distância de solutos nitrogenados em plantas vasculares, ocorre pelo fluxo em massa do xilema das raízes para as regiões de transpiração nas partes aéreas e o fluxo do floema de órgãos fotossinteticamente ativos, para os locais onde os fotossintetizados são consumidos no crescimento ou armazenados (PATE, 1980).

O floema da planta de origem supre em média 98 % do carbono, 89 % do nitrogênio e 40 % da água que entra no fruto de Lupinus. O nitrogênio restante e a água podem ser supridos pelo xilema e o carbono remanescente pela própria atividade fotossintética do fruto (PATE et al, 1977).

A sacarose contém 90 % do carbono do floema, enquanto que a asparagina e glutamina de 75 a 85 % do nitrogênio do xilema e floema da plantas de ervilha e Lupinus (LEWIS & PATE, 1973; ATKINS et al, 1975). Além das duas amidas, foi determinado por LAYZELL & LA RUE (1982), que os ureídeos foram os principais solutos orgânicos encontrados no exsudato do xilema em plantas de soja nodulada. Os autores demonstraram que estes compreenderam 63 % dos compostos nitrogenados medidos e 91 % do nitrogênio detectado. A maioria do nitrogênio restante estava associado com as amidas asparagina (4.7 %) e glutamina (1.3 %). Praticamente os mesmos resultados foram observados por RAINBIRD et al (1984), nos quais na composição da seiva do xilema de plantas de soja, os

ureídeos compreenderam 82 % do nitrogênio transportado, seguidos pela asparagina (10 %) e glutamina (2 %). Como podemos observar, estes quatro compostos devem desempenhar papéis dominantes na nutrição de frutos e sementes, especialmente quando as reservas destes estão sendo elaboradas.

No caso específico soja, tem-se mostrado que o transporte de substâncias nitrogenadas das raízes para as partes aéreas dependeram principalmente das condições de cultivo. Quando da presença de nodulação, estudos realizados por OHYAMA & KAMAZAWA (1979) com $^{15}\text{N}_2$ mostraram que as principais substâncias nitrogenadas foram os ureídeos. Na ausência de fixação simbiótica do nitrogênio, a asparagina foi a principal substância nitrogenada translocada das raízes para as partes aéreas.

Nos caules, tanto a asparagina quanto a alantoína podem se acumular, como observado por SERRES et al (1985), embora o acúmulo de asparagina nestes órgãos foi mais precoce do que os ureídeos. A reserva desta amida diminuiu mais rapidamente no período do preenchimento das sementes, nas duas variedades de soja estudadas.

Poucos trabalhos, entretanto, têm dado ênfase ao armazenamento de asparagina em caules e pecíolos. Entretanto, o mesmo não acontece com os ureídeos.

Em soja, STREETER (1979) demonstrou que os caules e pecíolos acumularam altas concentrações de N-ureídeos, igual ou superior a 35 % do nitrogênio total durante os estágios iniciais da formação das sementes. O mesmo foi observado por WAREMBOURG &

FERNANDES (1985), pois durante os últimos estágios da fixação do N_2 , uma grande proporção do nitrogênio fixado acumulou nos caules e pecíolos, provavelmente na forma de ureídeos para posterior transferência às sementes em desenvolvimento.

Numa outra leguminosa tropical, o caupi, autores têm demonstrado que os caules e pecíolos também acumulam ureídeos (HERRIDGE et al, 1978; ATKINS et al, 1982).

Dos ureídeos estocados em caules e pecíolos, parece que há uma tendência de armazenamento de alantoína em detrimento do ácido alantóico, como observado em caupi por HERRIDGE et al (1978) e ATKINS et al (1982), em soja por STREETER (1979) e LAY-ZELL & LA RUE (1982).

Quanto à função, os ureídeos armazenados nos caules parecem ser de primordial importância para a formação das sementes, já que STREETER (1979) notou que exsudatos de caules, coletados sob condições de campo, nos estágios que precedem à floração continham em média mais N-amino do que N-ureídeo. A quantidade de N-ureídeo movimentando-se pelo caule foi de 2 a 6 vezes maior do que o N-amino durante os estágios reprodutivos. O N-ureídeo nos caules e pecíolos foi consumido ou exportado durante a formação das sementes, pois pouca quantidade permaneceu neste tecido à maturidade das sementes. Este resultado reforça então o trabalho de MATSUMOTO et al (1977), no qual as plantas de soja não noduladas acumularam gradualmente alantoína nas raízes e caules, acúmulo este utilizado para o crescimento vegetativo e então consumida efetivamente na formação das sementes.

Nos caules e pecíolos, o metabolismo dos ureídeos pode ser intenso, pois em caupi, ATKINS et al (1982) demonstraram que todos os órgãos das plantas mostraram atividade ureolítica significativa e metabolizaram a alantoína marcada com ^{14}C a CO_2 .

Nos frutos, o primeiro local que recebe os compostos nitrogenados são as vagens. As paredes das vagens podem então armazenar e posteriormente redistribuir as substâncias nitrogenadas (THORNE, 1979).

As substâncias nitrogenadas armazenadas nos tecidos das paredes das vagens em desenvolvimento de feijão e soja foram principalmente ureídeos, como observado por THOMAS et al (1980) e THOMAS & SCHRADER (1981), respectivamente.

Para soja, GOMES & SODEK (1984) mostraram que os aminoácidos e ureídeos aumentaram muito nas vagens expandidas, mas caem a valores muito baixos durante o período de preenchimento das sementes. Dentre as substâncias nitrogenadas armazenadas, PEOPLES et al (1985a), trabalhando com caupi, demonstraram que as amidas asparagina e glutamina foram os constituintes dominantes das vagens, responsáveis por 60 % do nitrogênio solúvel total até o 16º dia após a antese, quando a asparagina declinou e as concentrações de NH_4^+ aumentaram.

Ao que tudo indica, as vagens das plantas de soja podem funcionar como fonte-dreno, pois se a quantidade de assimilados que chegam às sementes são altas, as taxas de crescimento destas também o são, as vagens atuam como dreno e o peso seco das paredes das vagens aumentam. Contudo, se a disponibilidade de assimi-

lados para os frutos for baixa, a parede da vagem atua como uma fonte e o peso das paredes das vagens declina (FADER & KOLLER, 1985).

Dentro do processo de redistribuição das substâncias armazenadas nas paredes das vagens, autores têm demonstrado em caupi, ervilha e soja (PEOPLES et al, 1985; STOREY & BEEVERS, 1978; GOMES & SODEK, 1984), a presença de enzimas chaves do metabolismo do nitrogênio.

PEOPLES et al (1985a) detectaram em vagens de caupi atividades máximas das enzimas urease, alantoinase, asparaginase e asparagina aminotransferase antes da fase de preenchimento das sementes. As vagens também mostraram altos níveis de glutamina sintetase, sintetase do glutamato dependente de NADH e metil-viologênio. A atividade da sintetase do glutamato ligada ao metil-viologênio e a asparagina ; piruvato aminotransferase foram restritas às vagens.

GOMES & SODEK (1984), para soja determinaram que a atividade da alantoinase foi máxima nas vagens ($20 \text{ umol vagem}^{-1} \text{ h}^{-1}$) após estas estarem completamente expandidas.

Estes resultados nos sugerem, portanto, que uma das principais funções das vagens pode ser o metabolismo de substâncias nitrogenadas e seu transporte para as sementes como outros compostos.

Das vagens as substâncias nitrogenadas se dirigem para os cotilédones. Entretanto várias delas podem ser metabolizadas pelos tegumentos das sementes. Uma das técnicas utilizadas para a

verificação deste fato é a técnica dos tegumentos vazios utilizada por MURRAY & CORDOVA-EDWARDS (1984a), RAINBIRD et al (1984) e GIFFORD & THORNE (1986).

RAINBIRD et al (1984), verificaram então, em plantas de soja noduladas que a principal substância nitrogenada liberada pelo tegumento das sementes foi a glutamina,, chegando a atingir 52 % do nitrogênio total, seguida de asparagina (19 %) e arginina e histidina na proporção de 5 e 4 %, respectivamente. A amônia e outros aminoácidos constituíram o nitrogênio restante. Praticamente não ocorreu qualquer liberação para os cotilédones, de alantoína e ácido alantóico. Confirmação deste fato foi demonstrado também por GIFFORD & THORNE (1986), os quais encontraram como principais solutos liberados pelos tegumentos a glutamina e asparagina.

Em caupi, PEOPLES et al (1985a) encontraram como principais solutos liberados pelos tegumentos a glutamina, asparagina, histidina, arginina, serina e alanina.

Com a técnica do pulso radioativo, introduzido na corrente transpiratória, MURRAY & CORDOVA-EDWARDS (1984b), demonstraram que em ervilha, a glutamina é pouco metabolizada nos tegumentos. Se for aplicado asparagina, a principal forma de nitrogênio transmitida dos tegumentos para os cotilédones são a glutamina, alanina e sacarose. Realmente isto acontece pois GOMES & SODEK (1984) encontraram altas atividades de asparaginase nos estágios finais da maturação das sementes de soja. COKER & SCHAEFER (1985), têm demonstrado que em tegumentos das sementes de soja, a

atividade de sintetase do glutamato foi de 7 a 12 vezes maiores que a atividade desta enzima nos extratos de cotilédones, quando tomou-se por base o peso fresco dos tegumentos e de 2 a 7 vezes quando expresso com base nas sementes. Os tegumentos degradaram alantoína a CO_2 cerca de 4 vezes mais rápido do que os cotilédones e 1.3 vezes do que as folhas. Para soja então, a alta atividade de sintetase da glutamina e altas taxas de degradação de alantoína nos tegumentos em relação ao cotilédone suportam o ponto de vista que "in situ", os ureídeos são degradados e o nitrogênio resultante é convertido em glutamina dentro dos tegumentos das sementes. Reforçando esta idéia WINKLER et al (1985), estudando a degradação de alantoato, demonstraram que os níveis de atividade da enzima que degrada o alantoato, dependente da produção de glioxilato (alantoato amidohidrolase) foram relativamente altos em extratos crus de vagens, tegumentos das sementes e cotilédones na metade do desenvolvimento. Os tegumentos das sementes tinham a mais alta atividade específica com base no peso fresco e foi consistente com os dados de RAINBIRD et al (1984), os quais mostraram que estes liberam apenas quantidades traços de ureídeos para os embriões.

Além das enzimas acima descritas que apresentam altas atividades em tegumentos de sementes de soja, outras plantas podem apresentar altas atividades de asparaginase, alfa cetoglutárico aminotransferase e glutamato sintetase como observado por MURRAY & KENNEDY (1980), em tegumentos das sementes de ervilhas. SODEK et al (1980) mostraram altas atividades de asparaginase de-

pendente de potássio, na testa das sementes da mesma espécie.

Uma vez que as substâncias nitrogenadas chegam aos cotilédones, são utilizadas principalmente na biossíntese de proteínas de reserva.

No estudo do preenchimento das sementes, vários autores têm utilizado a técnica da cultura de cotilédones imaturos "in vitro". Das substâncias nitrogenadas, as amidas e os ureídeos foram as principais fontes de nitrogênio utilizadas. Com esta técnica vários autores têm demonstrado que as melhores fontes de nitrogênio utilizadas para a biossíntese das proteínas de reserva foram principalmente a glutamina e asparagina como os trabalhos de THOMPSON et al (1977); LEA et al (1979); HAGA & SODEK (1987); TONIN (1988). Embora a GLN não tenha sido uma fonte tão eficiente como a asparagina em cotilédones imaturos de ervilha em cultura, observados por MILLERD et al (1975), isto pode ser devido ao efeito de autoclavagem, como explicado por LEA et al (1979), no qual o processo pode ter causado a conversão da glutamina em ácido glutâmico e amônia e por este motivo não se conseguiu proporcionar síntese de proteína em embriões.

Os ureídeos (alantoína e ácido alantóico) foram fontes pobres de nitrogênio para a síntese de proteínas de reserva em cultura de cotilédones isolados de qualquer espécie de planta estudada (THOMPSON et al, 1977; LEA et al, 1979; COKER & SCHAEFER, 1985; HAGA & SODEK, 1987; TONIN, 1988). Possíveis explicações para este fato são dados por COKER & SCHAEFER (1985) os quais demonstraram que o NH_4^+ liberado pela degradação dos ureídeos não

foi bem incorporado em proteínas, possivelmente pelos baixos níveis de atividade de glutamina sintetase, ou a taxa no qual o glutamato é produzido foi insuficiente como substrato de assimilação da amônia. Uma outra idéia é dada por RAINBIRD et al (1984) e relaciona principalmente com a baixa taxa de absorção de ureídeos pelo cotilédone "in vitro".

As conclusões a que chegaram COKER & SCHAEFER (1985) discordam dos resultados obtidos por TONIN (1988) pois a sintetase da glutamina além de ser uma enzima constitutiva dos cotilédones de soja, possui alta atividade quando em cultura de cotilédones isolados "in vitro".

Como podemos observar a glutamina e asparagina são boas fontes de nitrogênio para a cultura de cotilédones "in vitro". Isto pode ser devido a altas atividades de enzimas que degradam estas amidas e a outras enzimas responsáveis pela produção de aminoácidos e incorporação destes em proteínas de reserva.

Com relação à asparagina, vários autores têm demonstrado que esta substância nitrogenada pode ser metabolizada em cotilédones de algumas leguminosas estudadas. SODEK et al (1980), IRELAND & JOY (1981) encontraram em cotilédones de ervilhas altas atividades de asparaginase. Em cotilédones de soja, GOMES & SODEK (1984), TONIN (1988), demonstraram que os maiores valores de atividade de asparaginase foram registrados durante o acúmulo de proteínas nestes tecidos. TONIN (1988) demonstrou que "in vitro" a atividade da asparaginase nos cotilédones cresceu até o 4º dia no meio de cultivo, quando da rápida síntese protéica.

A glutamina, se aplicada como fonte única de nitrogênio pode ser metabolizada via GS/GOGAT em conjunto com a asparaginase, como observado por MURRAY & KENNEDY (1980) em cotilédones de ervilha. Os autores concluíram que o NH_4^+ liberado pela atuação da asparaginase é evidentemente reassimilada pelas células dos cotilédones conjuntamente pela ação da glutamato desidrogenase, sintetase da glutamina e da GOGAT. PEOPLES et al (1985a) mostraram que, em caupi, a fase de produção de proteínas de reserva coincidiu com altas atividades de GS, GOGAT e oxiredutase do glutamato.

STOREY & BEEVERS (1978) verificaram que a atividade da sintetase do glutamato cotiledonar aumentou muito durante a fase de crescimento de ervilha. SODEK et al (1980) trabalhando com a mesma espécie demonstraram que embora a atividade de GS não é particularmente grande durante a fase máxima da síntese protéica nos cotilédones, ela está sempre em excesso quando comparadas aos níveis de asparaginase, sugerindo que ela é provavelmente capaz de assimilar a amônia formada nesta reação.

Trabalho mais conclusivo sobre o metabolismo das amidas e ureídeos com relação ao processo enzimático em cultura de cotilédones de soja "in vitro" foi verificado por TONIN (1988). A autora demonstrou que a ALNase, GS e GOGAT mantiveram padrões de atividade crescentes durante um período de 8 dias tanto na planta como nas culturas "in vitro", independente da fonte ser alantoína, asparagina ou glutamina.

Um fato interessante também foi observado pela autora, pois a glutamina em meio de cultivo "in vitro" inibiu a atividade da enzima asparaginase em cotilédones isolados.

Dentro dos propósitos desta revisão bibliográfica, tentar-se-á então neste trabalho, dar ênfase ao comportamento das amidas e ureídeos sobre o sistema de transporte e incorporação do nitrogênio em proteínas de reserva em frutos de "explants" de soja.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Neste trabalho foram utilizadas sementes de soja (Glycine max (L) Merrill) cv. Santa Rosa, fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas - São Paulo. As sementes foram colocadas para germinar diretamente em vasos plásticos de 3 litros, contendo como substrato vermiculita previamente lavada. Após a germinação, as plântulas foram selecionadas, deixando apenas duas por vaso. As plântulas permaneceram por um período de 10 dias sob dias longos (18 horas de luz e 6 horas de escuro), quando então foram submetidas a dias curtos (9 horas de luz e 15 horas de escuro), para induzir a floração, por um período de 7 dias. Em seguida, os vasos foram transferidos para mesas na casa-de-vegetação sob condições naturais de luz, temperatura e umidade relativa. Foram adicionados aos vasos, duas vezes por semana, 250 ml de uma solução nutritiva completa de HOAGLAND (HOAGLAND & ARNON, 1950). A irrigação com água foi feita de acordo com as necessidades das plantas. As plantas permaneceram nestas condições até que apresentassem vagens completamente expandidas e as sementes ocupando todo o lúmen das vagens (cerca de 100 mg de matéria fresca cada).

Quando as sementes apresentaram os pesos de matéria fresca ideais, os vasos foram divididos em dois lotes, sendo que um deles era utilizado para os "explants", enquanto que o outro permanecia como controle "in situ" na casa-de-vegetação.

4.1.1. Cultivo "in vitro" em Condições Semi-assépticas

Para o cultivo "in vitro", as plantas eram levadas ao laboratório, completamente desfolhadas, deixando-se apenas as bases dos pecíolos e uma vagem em cada nó com duas sementes, a partir do quinto nó da base para o ápice. Em seguida, as plantas foram imersas em água destilada e os caules cortados com uma lâmina de barbear. Após o corte, os pedaços de caule com uma vagem foram colocados em béqueres com água destilada, permanecendo ali até serem colocados no meio de cultivo.

O meio de cultivo básico foi preparado segundo CHANDLER et al, 1983, para os macronutrientes e de THOMPSON et al, 1977, para os micronutrientes e ferro. A fonte de carboidratos foi a sacarose na concentração de 50 mg/ml e a de nitrogênio foi a glutamina na concentração de 6,26 mg/ml. Como hormônio, foi utilizada cinetina na concentração de 1 ug/ml. O pH de todos os meios de cultivo foi mantido em 5.0.

Após a preparação dos meios de cultivo, 6.5 ml destes foram adicionados aos frascos de vidro de 10 ml, previamente cobertos na parte superior com tiras de isopor com 15 mm de largura e fita adesiva. Em seguida, os vidros foram colocados em orifí-

cios feitos em uma tampa de uma caixa de isopor. Esta tampa foi então colocada sobre uma caixa de isopor, contendo esta um banho de gelo na temperatura de 2°C. Desta maneira, a parte superior dos vidros ficaram fixas na tampa e as partes inferiores, com o meio de cultivo, no banho de gelo durante o período de execução do experimento.

Após esta montagem, os caules dos "explants" foram recortados sob água destilada, permanecendo agora com cerca de 6 cm de comprimento. Em seguida, mergulhou-se as bases dos "explants" nos frascos contendo os meios de cultivo. Os caules foram fixados com tampas de isopor em seus respectivos vidros. As superfícies cortadas das partes superiores dos caules e pecíolos foram vedados com pasta de lanolina para evitar possíveis perdas de água. O sistema foi então colocado em uma câmara de germinação, sob luz contínua ($80 \text{ uE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e temperatura de 25°C durante um período de 7 dias.

A cada 48 horas, os caules dos "explants" foram cortados em sua base (cerca de 2 mm) para desobstruir algum vaso que poderia estar bloqueado.

No quarto dia de cultivo, os meios foram trocados para evitar qualquer exaustão de minerais ou substâncias orgânicas.

O banho de gelo foi trocado duas vezes por dia, pela manhã e à tarde, durante o período experimental.

4.1.2. Peso da Matéria Fresca e Seca

O peso da matéria fresca da vagem, caule e sementes de cada repetição foi determinado em uma balança de pesagem rápida, marca MARTE A 200. Em seguida, a vagem foi separada longitudinalmente em duas metades idênticas, o mesmo sucedendo com as sementes. Uma metade da vagem com dois cotilédones (um de cada semente) foram pesados novamente e transferidos para um congelador à temperatura de -15°C e armazenados para análises posteriores. As outras metades da vagem, sementes e tegumentos foram então transferidos para uma estufa de circulação forçada à 80°C durante um período de 48 horas para a determinação da matéria seca.

Em alguns experimentos, após a determinação da matéria fresca, os caules, vagens, tegumentos e cotilédones foram congelados e liofilizados em um liofilizador L4KR da marca EDWARDS por um período de 24 horas. Após a liofilização, as amostras foram novamente pesadas para a obtenção da matéria seca.

4.1.3. Extração e Dosagens Químicas

Para a extração das proteínas do material fresco, os cotilédones foram homogeneizados com 30 ml de NaOH 0.1 M em um homogeneizador de vidro. O extrato foi centrifugado à 2500 rpm durante 5 minutos e uma alíquota de 100 μl foi tomada para determinação de proteínas pelo método "dye-binding" de BRADFORD (1976), utilizando BSA como padrão.

Do material liofilizado, as vagens e caules foram triturados em um moinho de bola marca SPEX MIXER/MILL durante 5 minutos. Os tegumentos e cotilédones foram triturados em um graal até obter-se um pó bastante fino.

Para a extração das proteínas utilizou-se 50 mg de caule, vagem e tegumento, para um volume de 10 ml de NaOH 0.1 M, e 15 mg de cotilédone para o mesmo volume. As determinações seguiram procedimento idêntico ao material fresco.

Para a extração de aminoácidos livres e ureídeos, foram utilizadas 50 mg da amostra e 12 ml de uma mistura de metanol:clorofórmio:água (MCW 12:5:3 V/V/V), segundo BIELESKI & TURNER (1966). Em seguida, o extrato foi colocado em um funil de separação, onde se adicionou 4.5 ml de água e 3 ml de clorofórmio. Após leve agitação e separação das fases, a fase aquosa foi coletada e seca em banho-maria à 45°C com um fluxo de ar. Após a secagem foi adicionada água até o retorno ao volume original.

Para a dosagem de ureídeos foi utilizado o método de TRIJBELS & VOGELS (1966) e para aminoácidos livres, o método da ninhidrina de YEMM & COCKING (1955). Alantoína e leucina foram usados como padrão, respectivamente.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada tratamento foram utilizadas 7 repetições de 1 "explant", de acordo com um delineamento experimental inteiramente casualizado, cada frasco constituindo-se numa repetição (par-

cela).

No experimento visando identificar as melhores fontes de nitrogênio, 7 frascos de cada tratamento foram reunidos em apenas 1 repetição. Foram utilizadas 3 repetições em um delineamento experimental em blocos inteiramente casualizados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento para testar a ocorrência de crescimento das sementes de soja "in vitro", utilizando o sistema desenvolvido neste trabalho, utilizou-se o meio de cultura para cotilédones isolados, descrito por THOMPSON et al (1977). Foram utilizadas duas concentrações de sacarose (50 e 100 mg/ml do meio) e glutamina nas concentrações de 10 e 20 mg/ml, por um período de 8 dias.

Os resultados apresentados na TABELA 1 mostram que, independente da concentração de sacarose e glutamina no meio, ocorreu um crescimento das sementes próximo daquele na planta intacta (controle "in situ"). Pelos dados obtidos com as vagens, este crescimento das sementes não foi devido simplesmente a uma transferência de matéria das vagens para as sementes. O melhor crescimento das sementes ocorreu quando a sacarose estava presente na concentração de 100 mg/ml do meio e glutamina na concentração de 20 mg/ml. As vagens apresentaram pouco ou nenhum crescimento pelo fato de já estarem totalmente expandidas.

Nota-se ainda que, ao vedar os cortes superiores dos caules e pecíolos remanescentes nos "explants" com lanolina, o aumento da matéria fresca das sementes e vagens foi ligeiramente maior do que aqueles que não sofreram o tratamento de vedação.

TABELA 1 - Incremento da matéria fresca de vagens e sementes dos "explants" de soja cultivados "in vitro" por um período de 8 dias.

TRATAMENTO	Peso da Mat. Fresca das Sementes (mg)	Peso da Mat. Fresca das Vagens (mg)
Dia zero	246	492
S (5%) + G (1%)	299	476
S (5%) + G (1%) + L	329	534
S (10%) + G (2%)	352	507
S (10%) + G (2%) + L	400	561
Controle "in situ"	387	492

S - sacarose

G - glutamina

L - lanolina

Conforme pode-se observar, o sistema de "explants" é viável para o estudo do preenchimento das sementes de soja "in vitro", sem que as vagens estejam mergulhadas no meio de cultivo, como demonstrado por OBENDORF et al (1983).

Após verificar a viabilidade do sistema, tentou-se então otimizar as condições de cultivo "in vitro", testando outros fatores que poderiam influenciar o crescimento das sementes, conforme a descrição a seguir.

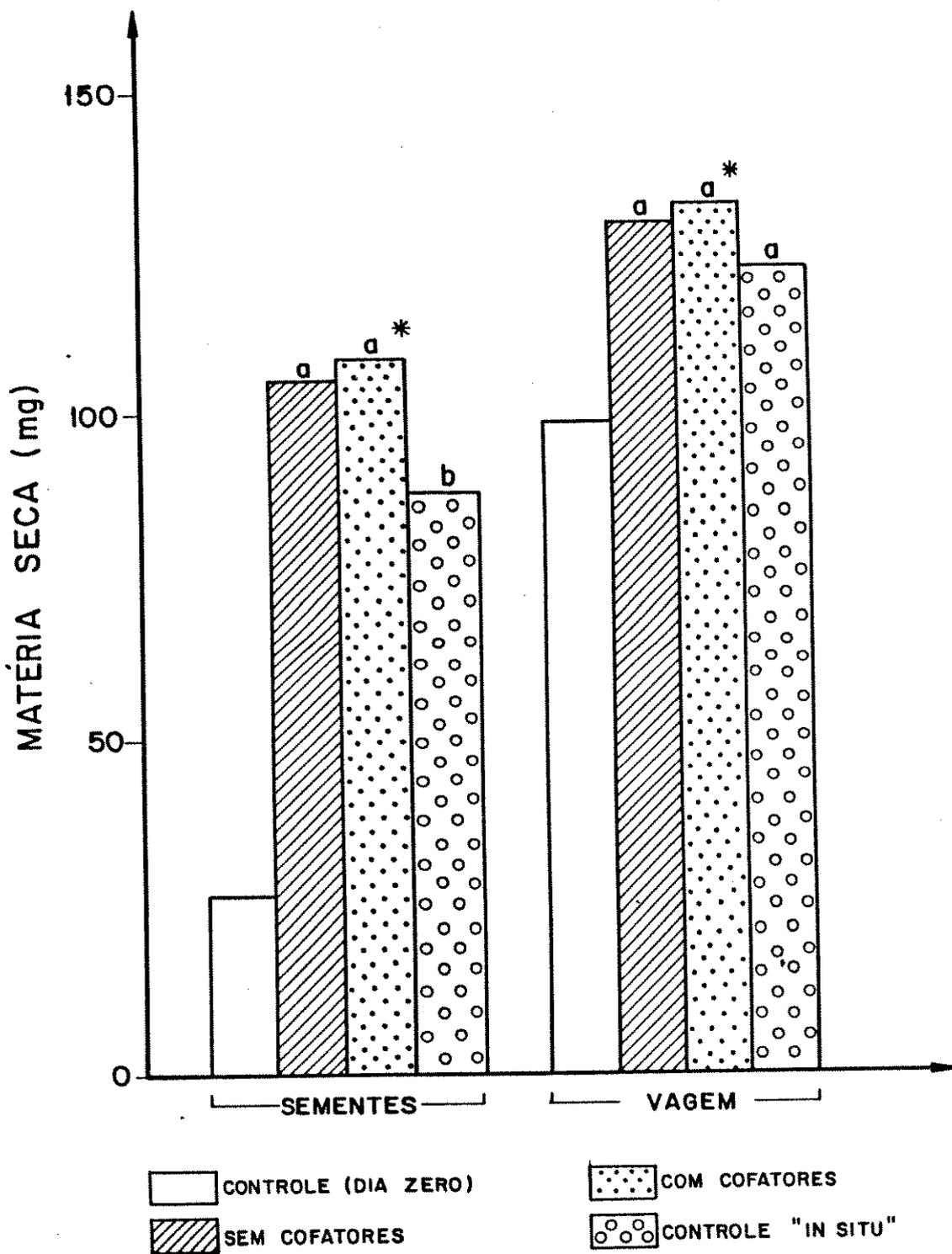
5.1. EFEITO DE COFADORES

Para o estudo do efeito de cofadores no preenchimento das sementes de soja, o meio básico utilizado foi o de THOMPSON et al (1977). As concentrações de sacarose e glutamina foram de 100 e 20 mg/ml do meio, respectivamente. Os cofadores utilizados foram as substâncias tiamina HCl, myo-inositol, ácido nicotínico, piridina HCl e glicina, preparados segundo THOMPSON et al. (1977). O período de duração experimental foi de 8 dias.

Pelos resultados apresentados no HISTOGRAMA 1, os pesos da matéria seca das vagens e sementes não diferiram significativamente entre si, quer na presença ou ausência de cofadores no meio de cultivo.

Os resultados obtidos neste experimento são conflitantes daqueles observados por THOMPSON et al (1977), em cultura de cotilédones de soja imaturos crescendo "in vitro", pois os autores notaram que, na ausência completa de cofadores, houve redução

HISTOGRAMA 1 - Efeito da Adição de Cofatores ao Meio de Cultivo sobre a Produção de Matéria Seca em Vagem e Sementes de "Explants" de Soja



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

no peso da matéria seca e proteínas em relação ao controle.

Possivelmente, na cultura de "explants", as sementes podem receber estas substâncias (cofatores ou vitaminas), oriundas dos caules e vagens, o que não ocorreria com a cultura de cotilédones isolados crescendo "in vitro", pois estes não apresentam estes órgãos.

Neste experimento não passou despercebido que o crescimento das sementes dos "explants" superou ao da planta, embora reconhecendo a validade limitada do controle "in situ" como ponto de referência, em virtude das condições de crescimento não controladas para as plantas.

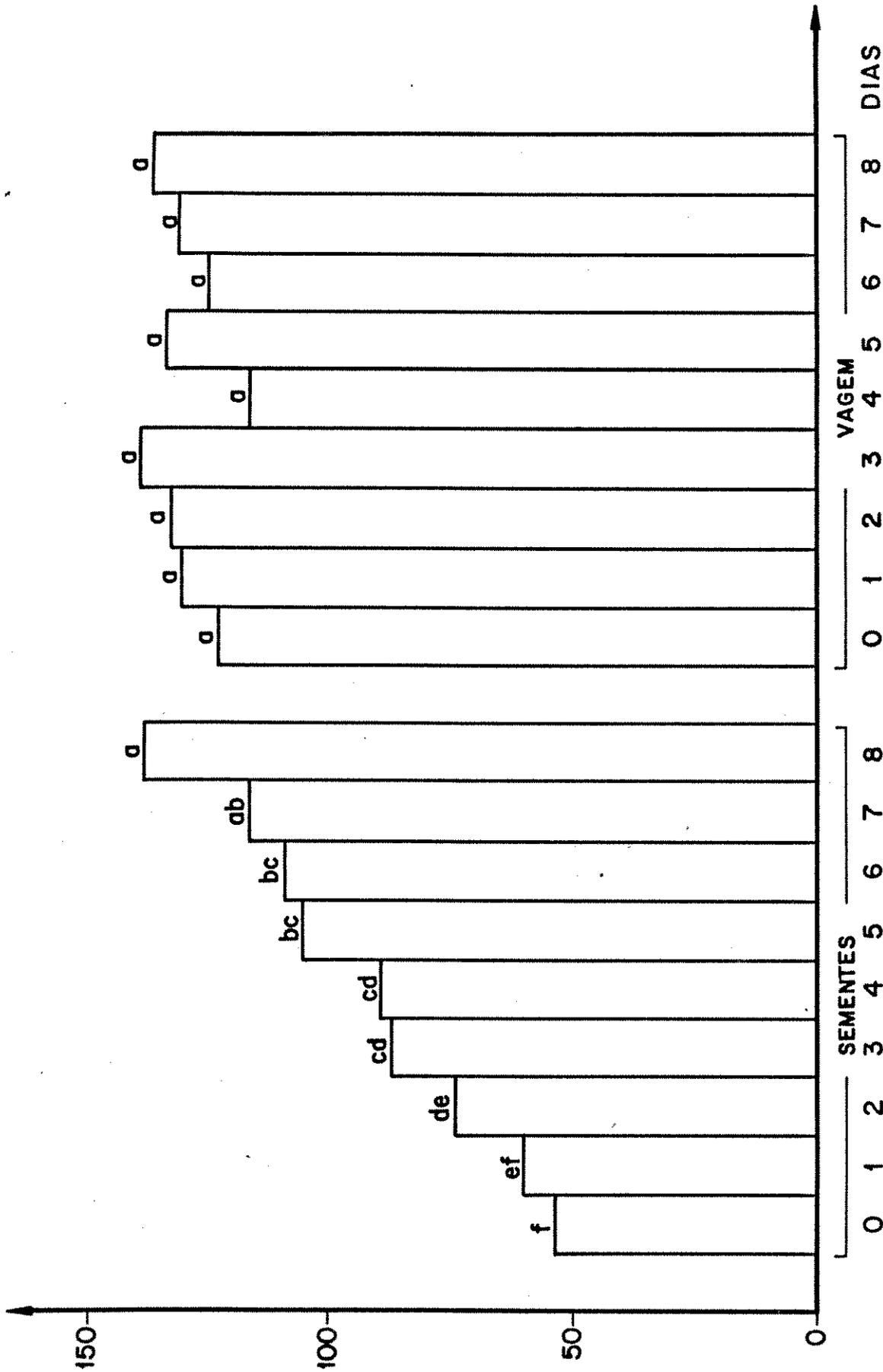
A partir deste momento, optou-se por deixar de incluir os cofatores ou vitaminas no meio de cultivo.

5.2. AUMENTO DIÁRIO DA MATÉRIA FRESCA E SECA DAS VAGENS E SEMENTES

Neste experimento utilizou-se o meio de macro e micronutrientes de THOMPSON et al (1977), sacarose e glutamina nas concentrações do experimento anterior e duração de 8 dias.

O HISTOGRAMA 2 mostra que as sementes apresentaram aumentos significativos de matéria seca a partir do 3º dia no meio de cultivo. Nota-se também que há uma tendência de crescimento nas primeiras 24 horas de cultura "in vitro". Parece, então, que há um restabelecimento rápido no sistema de transporte entre o caule e o meio, ao contrário do que ocorre nos pedúnculos de er-

HISTOGRAMA 2 - Aumento da Matéria Seca de Sementes e Vagem
de "Explants" de Soja Durante um Período de
8 Dias em Meio de Cultivo



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

vilha, onde o aumento da matéria seca das sementes só ocorreu 1 dia após sua imersão (CHANDLER et al, 1983). Quanto às vagens, não houve aumentos significativos, pois estas já estavam completamente expandidas.

Os dados mostram um aumento progressivo no peso da matéria seca das sementes até o último dia do experimento. Isto justifica a incubação dos "explants" durante 8 dias nos experimentos de rotina.

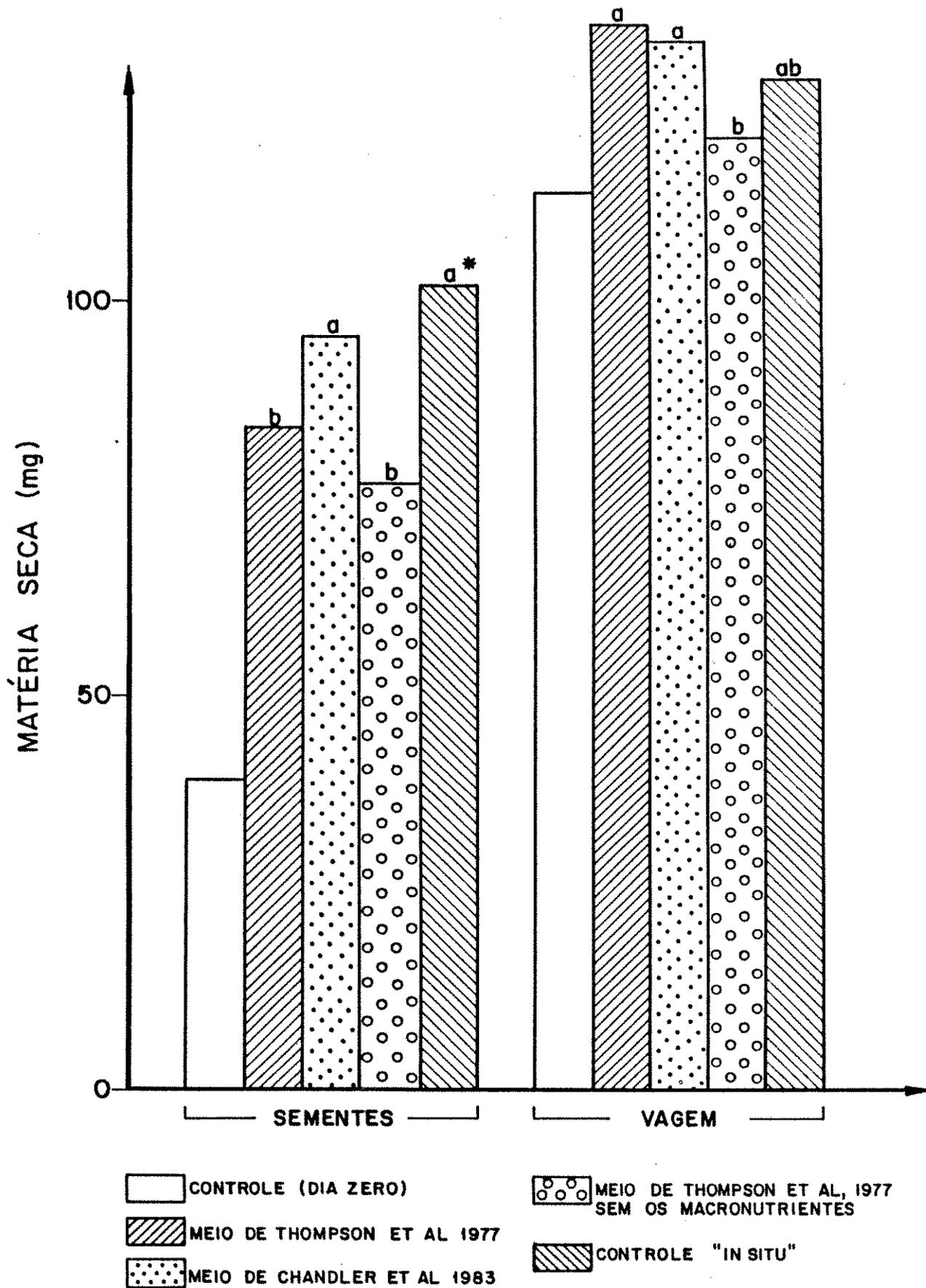
5.3. INFLUÊNCIA DE MACRONUTRIENTES

Na influência dos macronutrientes sobre o aumento da matéria seca foram testados os meios de macronutrientes de THOMPSON et al (1977), CHANDLER et al (1983) e o de THOMPSON et al (1977) sem os macronutrientes. A sacarose foi mantida na concentração de 100 mg/ml e glutamina na de 20 mg/ml do meio. A duração experimental foi de 4 dias.

Conforme o HISTOGRAMA 3, nota-se que o meio de macronutrientes para este tipo de estudo é o de CHANDLER et al (1983), o qual se equiparou ao controle "in situ", tanto para vagens como para sementes.

Na ausência de macronutrientes, o crescimento das vagens e sementes foram reduzidos, mas não totalmente, mostrando portanto, que os caules, vagens e sementes possuem, mas não em quantidades suficientes, reservas destes elementos minerais para sustentar um crescimento normal.

HISTOGRAMA 3 - Influência de Meios de Cultivo Diferentes Sobre
a Produção de Matéria Seca de Vagem e Sementes
de "Explants" de Soja



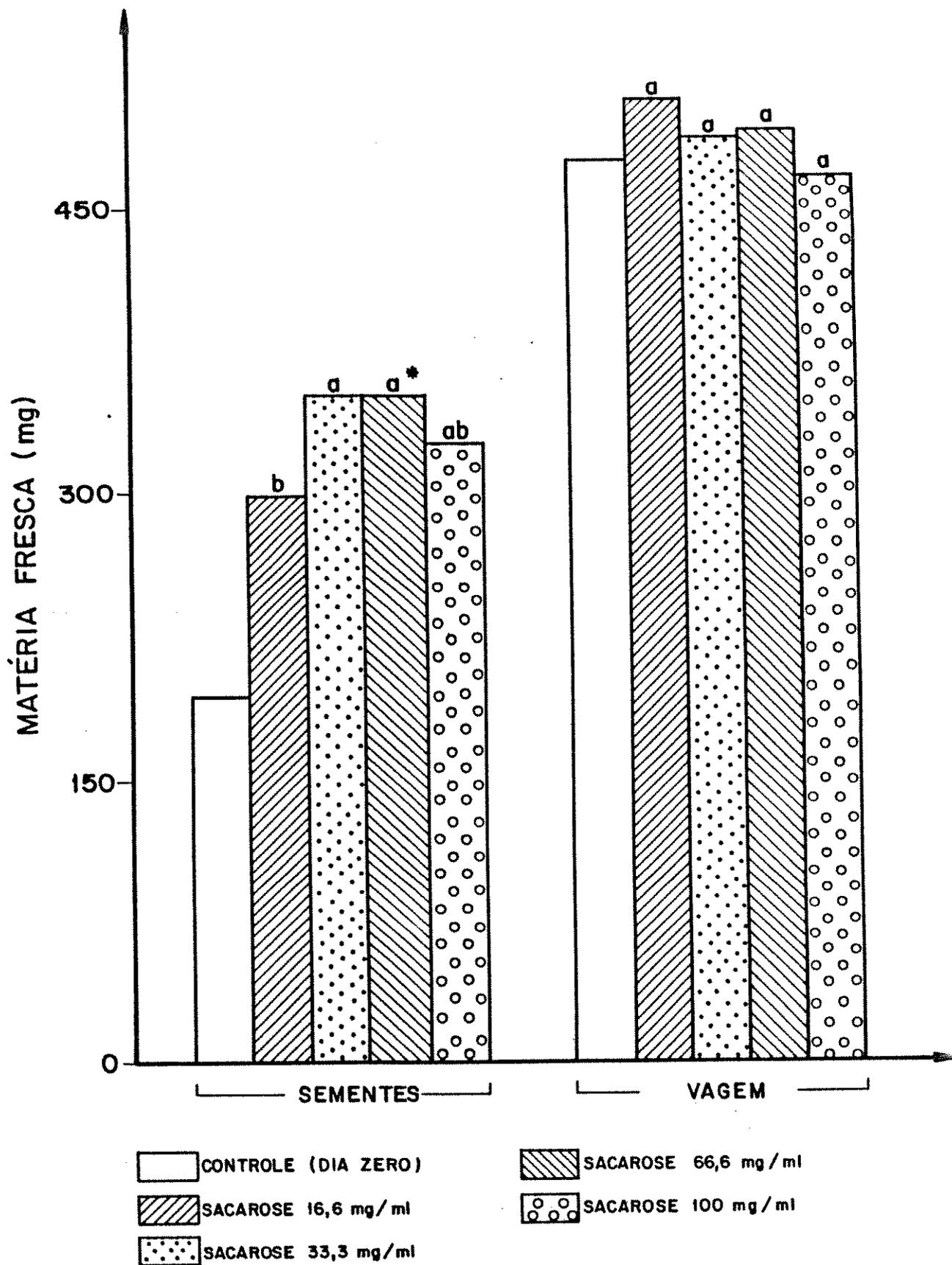
* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

Embora não se tenha feito análise mineral, estes resultados estão de acordo com o trabalho de THOMPSON et al (1977), para a cultura de cotilédones de soja "in vitro". Aqueles autores determinaram que a ausência dos íons potássio, sulfato e fosfato no meio de cultivo acarretou efeitos deletérios sobre os cotilédones.

5.4. EFEITO DA ADIÇÃO DE VÁRIOS NÍVEIS DE SACAROSE NO MEIO DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE MATÉRIA FRESCA E SECA

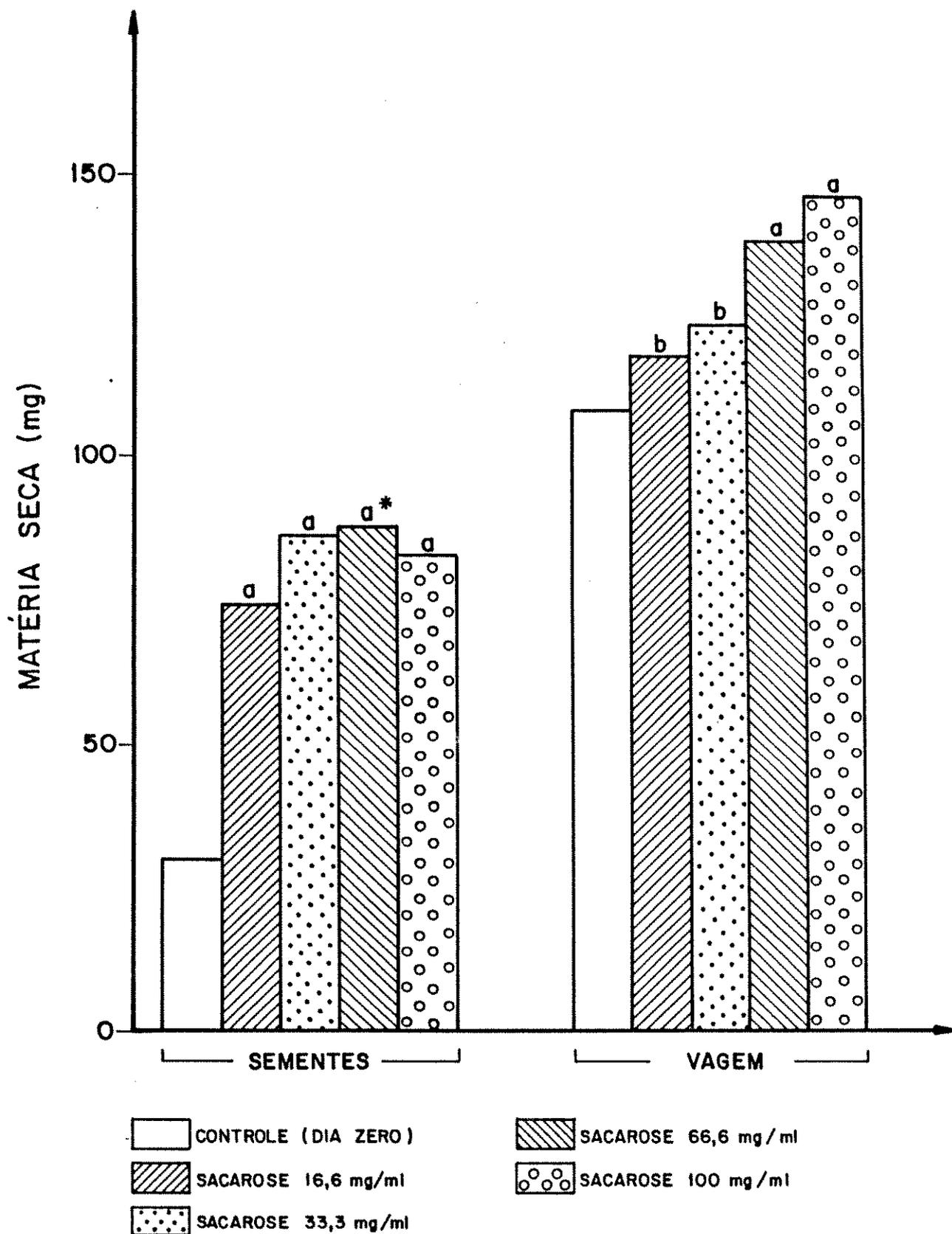
Para a cultura de cotilédones de soja "in vitro", THOMPSON et al (1977) demonstraram que concentrações de sacarose entre 25 e 100 mg/ml tinham pouco efeito sobre o crescimento e que a última concentração afetou a síntese protéica, decrescendo-a. Tentando verificar se no sistema desenvolvido por este trabalho ocorria o mesmo fenômeno, foi utilizado o meio básico de CHANDLER et al (1983), variando-se as concentrações de sacarose de 16.6, 33.3, 66.6 e 100 mg/ml. Os resultados apresentados no HISTOGRAMA 4 mostra que os maiores aumentos da matéria fresca das sementes foram obtidas com sacarose acima de 16.6 mg/ml. Para as vagens, não houve qualquer diferença no peso da matéria fresca nos quatro níveis de sacarose estudados. Com relação à matéria seca (HISTOGRAMA 5), não houve diferenças significativas para as sementes, mas as vagens apresentaram um aumento nos níveis de 66.6 e 100 mg/ml de sacarose. Apesar de não se ter dosado proteí-

HISTOGRAMA 4 - Influência da Adição de Várias Concentrações de Sacarose ao Meio de Cultivo sobre a Produção de Matéria Fresca de Sementes e Vagem em "Explants" de Soja



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

HISTOGRAMA 5 - Influência da Adição de Várias Concentrações de Sacarose ao Meio de Cultivo sobre a Produção de Matéria Seca de Sementes e Vagem em "Explants" de Soja



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

nas, os resultados da matéria seca mostram que este sistema tem um comportamento semelhante à cultura de cotilédones "in vitro" desenvolvido por THOMPSON et al (1977).

Com relação às vagens, o aumento da matéria seca nas concentrações de sacarose mais elevadas pode ser devido ao acúmulo de amido, já que THORNE (1979) notou que as vagens de soja podem estocar amido, açúcares redutores e materiais nitrogenados.

Devido à tendência de aumento na matéria fresca e seca, embora não significativa, das sementes aos níveis de sacarose de 33.3 e 66.6 mg/ml e uma pequena redução na concentração de 100 mg/ml, optou-se então para os próximos experimentos, sacarose na concentração de 50 mg/ml. Esta concentração, provavelmente poderia aumentar o transporte desta substância sem que ocorresse um desequilíbrio muito grande no potencial osmótico entre o meio e o caule do "explant". Esta idéia pode ser reforçada por outros trabalhos da literatura onde normalmente se trabalha na faixa de concentração de sacarose entre 20 e 50 mg/ml para a cultura de cotilédones isolados "in vitro" (MILLERD et al, 1975; OBENDORF et al, 1983; BARRAT, 1986 e HAGA & SODEK, 1987).

5.5. TESTE DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMINA NO MEIO DE CULTIVO

Para testar o melhor nível de nitrogênio, foi utilizado o meio básico de CHANDLER et al (1983), tomando-se 4 níveis de glutamina : 0, 3.13, 6.26 e 9.39 mg/ml do meio. Os resultados re-

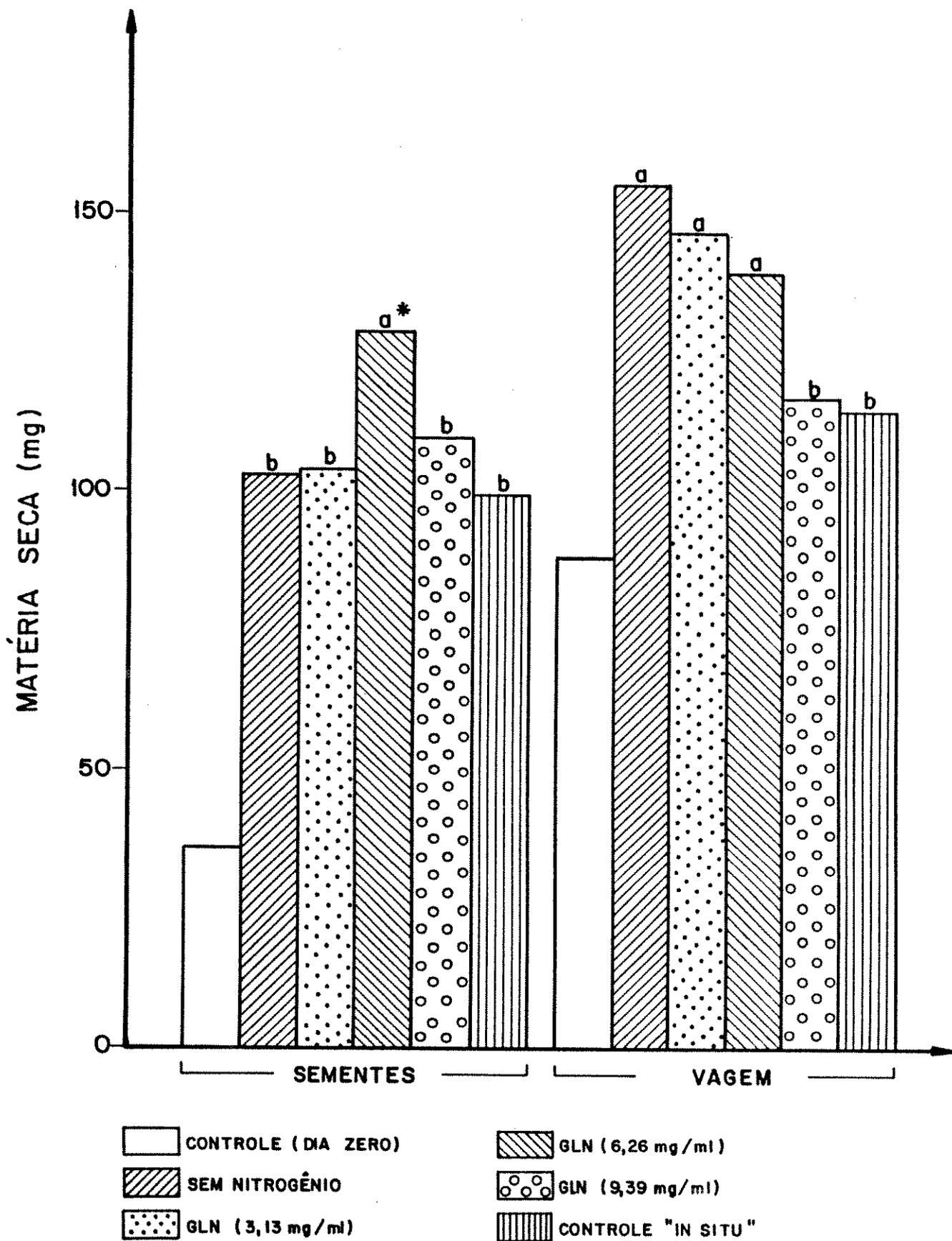
presentados pelo HISTOGRAMA 6, mostram que o maior aumento de matéria seca deu-se no nível de 6.26 mg/ml de glutamina para as sementes e de zero a 6.26 mg/ml para as vagens.

Podemos inferir desses resultados que o aumento de matéria seca das vagens declina à medida que elevaram-se os teores de glutamina no meio, possivelmente devido a um acúmulo de proteínas em detrimento aos carboidratos.

Para as sementes, com excessão do nível 6.26 mg/ml, não ocorreu aumento de matéria seca, possivelmente porque a níveis mais baixos a fonte nitrogenada pode estar limitando a biossíntese de carboidratos a nível enzimático ou sendo estocada nos caules e vagens, chegando pouca quantidade às sementes. No nível mais alto (9.39 mg/ml), a glutamina poderia estar estimulando a biossíntese de proteínas nos cotilédones. Para verificar se isto realmente ocorria, dosou-se as proteínas.

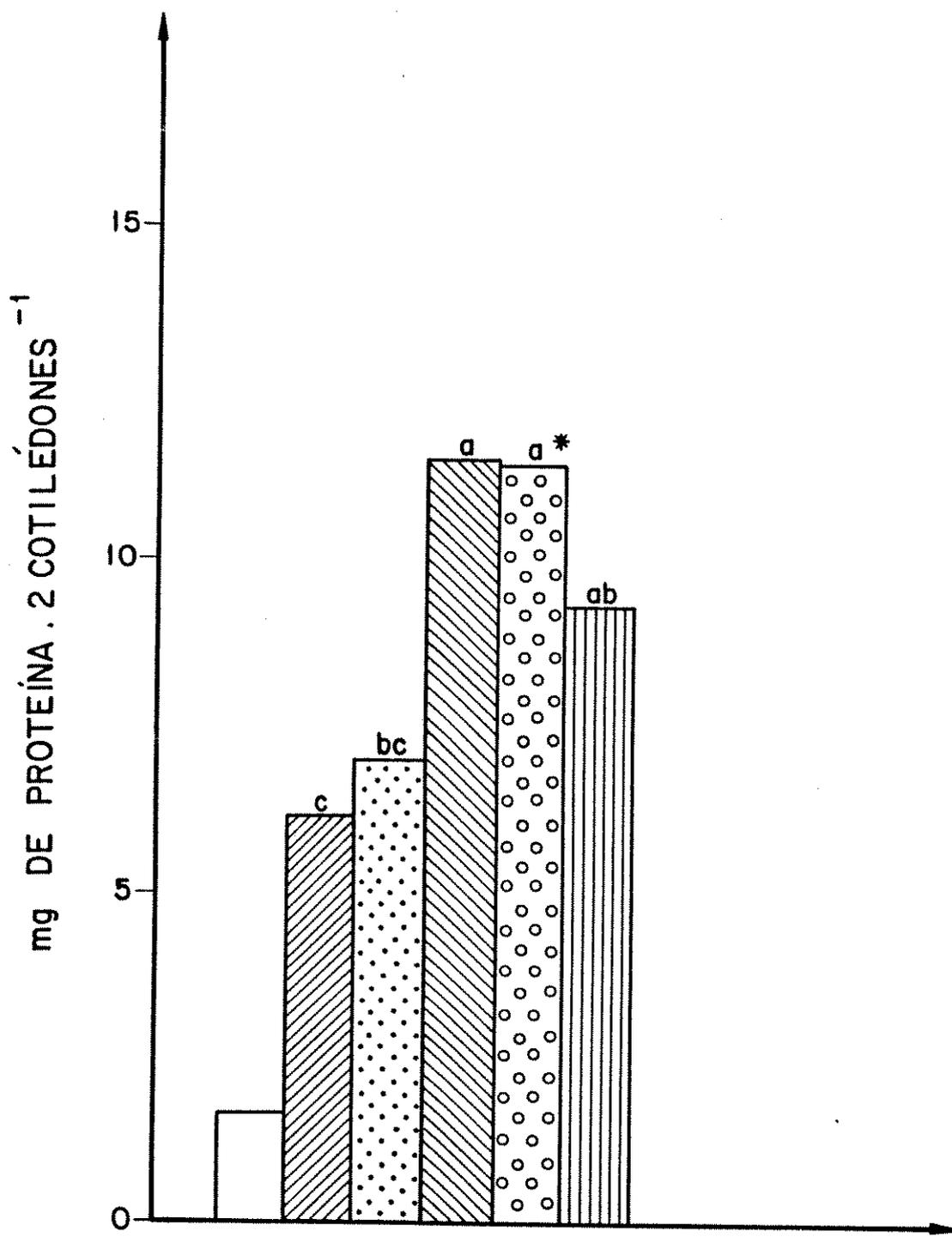
O HISTOGRAMA 7 mostra que a afirmação acima pode estar correta, pois os teores de proteínas só aumentaram nos cotilédones a partir de 3.13 mg/ml de glutamina adicionadas ao meio de cultivo. No trabalho de THOMPSON et al. (1977), utilizando glutamina na concentração de 4.5, 9.0 e 18 mg/ml em cultura de cotilédones "in vitro", não foi observado decréscimo no peso da matéria seca, embora o aumento máximo nos teores de proteínas ocorreu na concentração de 9.0 mg/ml do meio. Ainda que, o presente trabalho não tenha utilizado as mesmas concentrações de glutamina dos autores acima mencionados, eles poderiam ter encontrado um melhor aumento de proteínas em concentrações desta fonte intermediárias

HISTOGRAMA 6 - Influência da Adição de Várias Concentrações de
Glutamina ao Meio de Cultivo sobre a Produção de
Matéria Seca de Sementes e Vagem em "Explants"
de Soja



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

HISTOGRAMA 7 - Influência da Adição de Várias Concentrações de
Glutamina ao Meio de Cultivo sobre os Teores de
Proteínas em Cotilédones de "Explants" de Soja



 CONTROLE (DIA ZERO)	 GLN (6,26 mg/ml)
 SEM NITROGÊNIO	 GLN (9,39 mg/ml)
 GLN (3,13 mg/ml)	 CONTROLE "IN SITU"

* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

entre 4.5 e 9.0 mg/ml do meio.

Com relação ao aumento de proteínas nos cotilédones dos "explants" no tratamento sem nitrogênio (HISTOGRAMA 7) pode ser devido à pré-existência de compostos nitrogenados nos caules e vagens que foram translocados para as sementes.

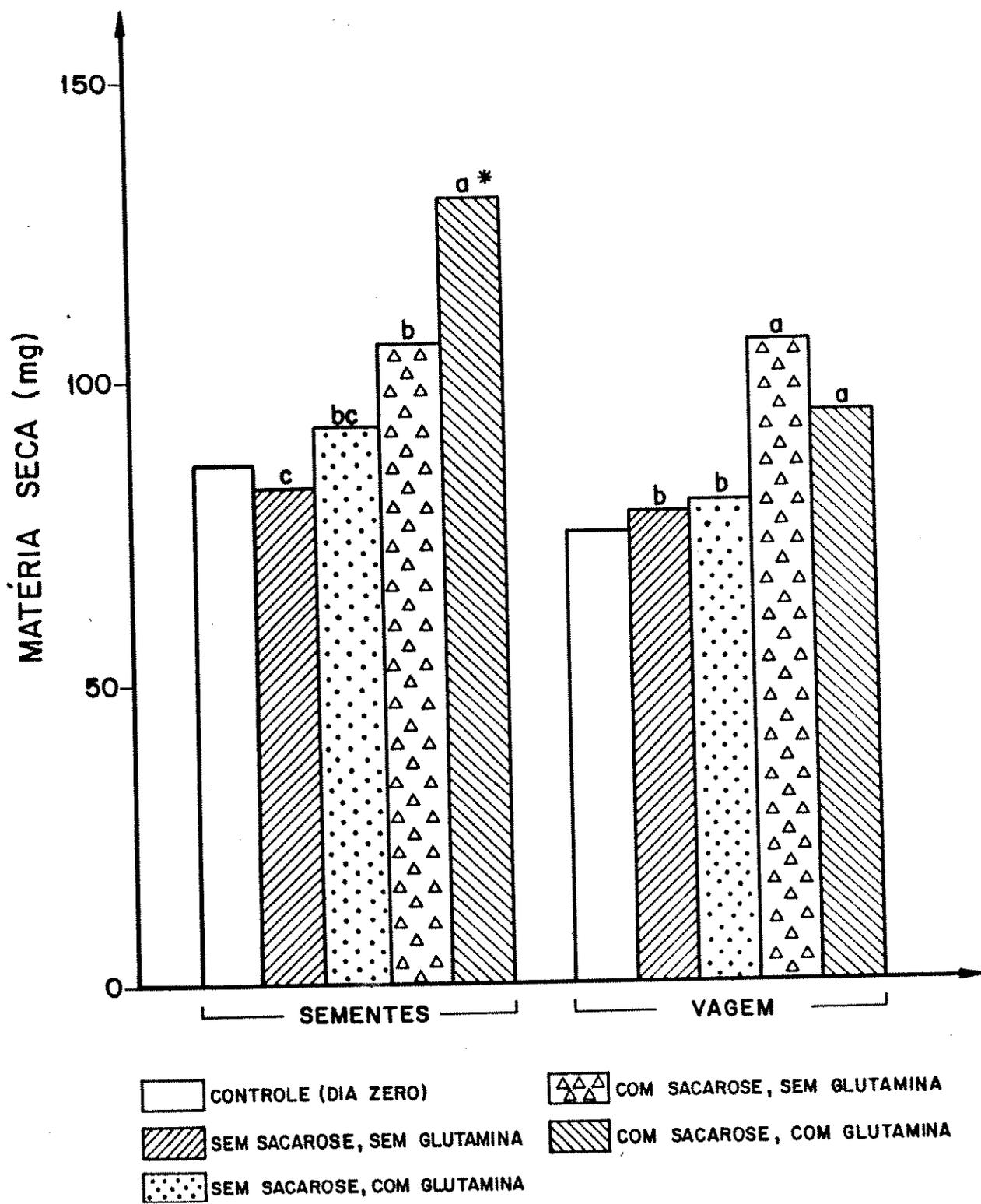
Devido a estes resultados, optou-se pela concentração de 6.26 mg de glutamina.ml⁻¹ do meio.

Tentando elucidar se os caules acumulam carboidratos e substâncias nitrogenadas disponíveis para o crescimento dos frutos, fez-se um experimento utilizando-se o meio básico de CHANDLER et al (1983), com a presença de sacarose e glutamina, presença de sacarose e ausência de glutamina, presença de glutamina e ausência de sacarose e ausência dos dois compostos.

Os resultados apresentados no HISTOGRAMA 8 nos mostra que ocorreu um bom crescimento das vagens e sementes quando a sacarose foi adicionada ao meio de cultivo.

No caule deve haver pouca reserva de carboidratos disponíveis para o preenchimento das sementes. Isto indica que nas plantas em condições naturais, a maioria das substâncias utilizadas para o preenchimento das sementes é função principal da folha do mesmo nó, como observado por MORI et al (1985). Esta idéia é reforçada pelos resultados de PATE et al (1977), os quais estabeleceram que 98 % do suprimento de carbono em frutos de Lupinus

HISTOGRAMA 8 - Efeito da Adição de Sacarose e Glutamina no Meio de Cultivo, sobre a Produção de Matéria Seca de Vagem e Sementes de Soja



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

albus é derivado do floema.

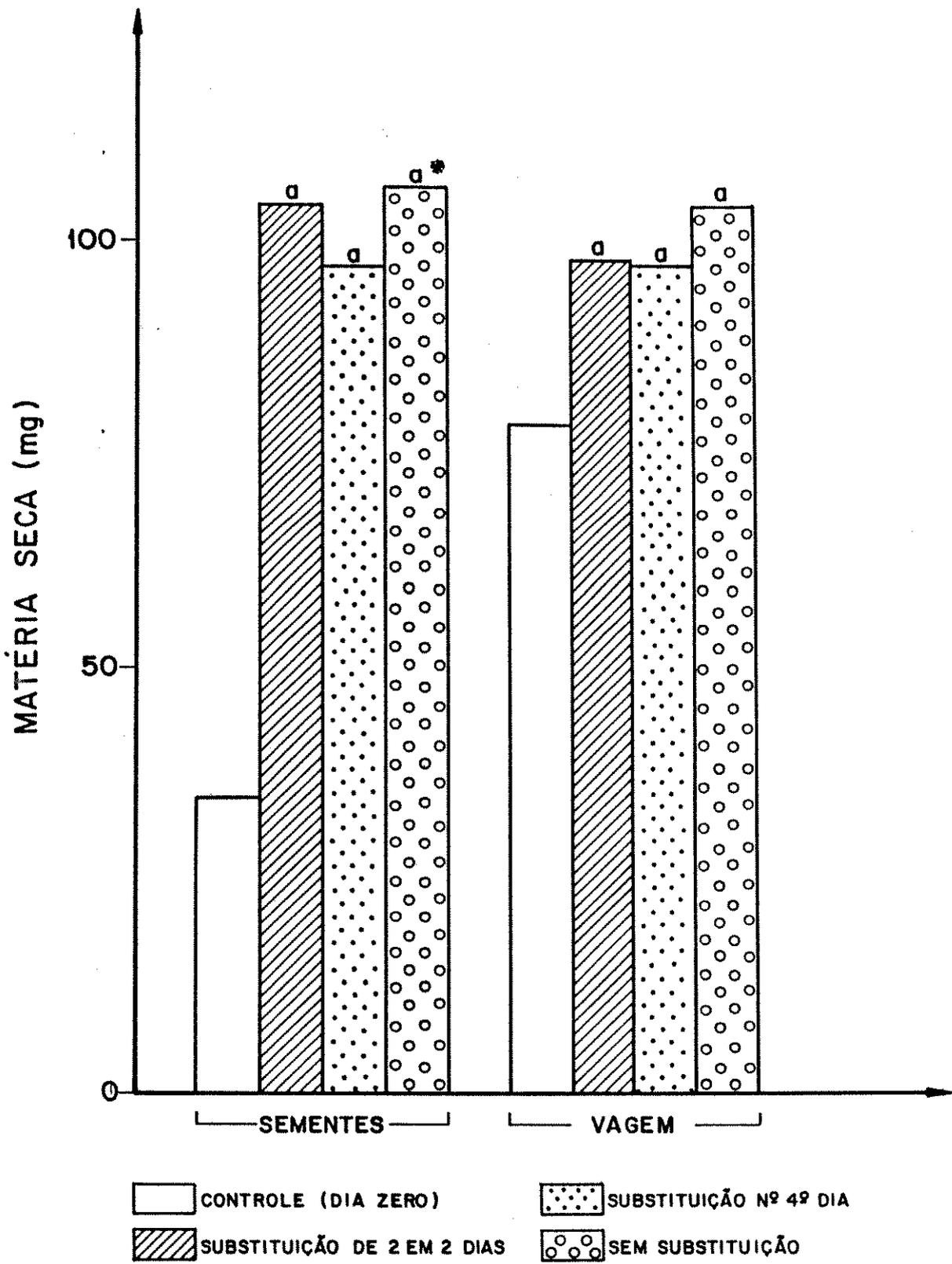
A adição de sacarose ao meio de cultivo é necessária, pois a sacarose age como fonte de esqueletos de carbono para a síntese de aminoácidos e como fornecedora de energia para a síntese protéica (LEA et al, 1979).

O acúmulo de matéria seca (HISTOGRAMAS 6 e 8) e de proteína (HISTOGRAMA 7) nas sementes com a presença de sacarose mas na ausência de fonte de nitrogênio nos mostra claramente que o caule e/ou a vagem mobiliza substâncias nitrogenadas em direção das sementes. Outras evidências a respeito desta questão serão apresentadas mais adiante.

5.6. EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA DAS VAGENS E SEMENTES

Nos experimentos até agora discutidos, substituíram-se os meios de cultivo de 2 em 2 dias. Foi tomada esta precaução, pois tínhamos que assegurar que as substâncias orgânicas e inorgânicas do meio não se exaurissem até o final de cada experimento. Como cada frasco de cultura continha apenas 6.5 ml do meio, foi executado um experimento utilizando-se o meio básico de CHANDLER et al (1983), sendo que substituições foram realizadas de 2 em 2 dias, e no 4º dia do período de duração experimental, e sendo o controle sem qualquer substituição.

HISTOGRAMA 9 - Influência da Substituição do Meio de Cultivo
sobre a Produção de Matéria Seca de Vagem e Se-
mentes de "Explants" de Soja



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

Os resultados apresentados no HISTOGRAMA 9 nos mostra que não há necessidade de substituição durante o transcorrer do cultivo "in vitro", uma vez que o aumento na matéria seca das vagens e sementes foram semelhantes em todos os tratamentos utilizados. Embora não houvesse necessidade de troca, substituições dos meios foram realizadas no 4º dia, para maior segurança dos resultados.

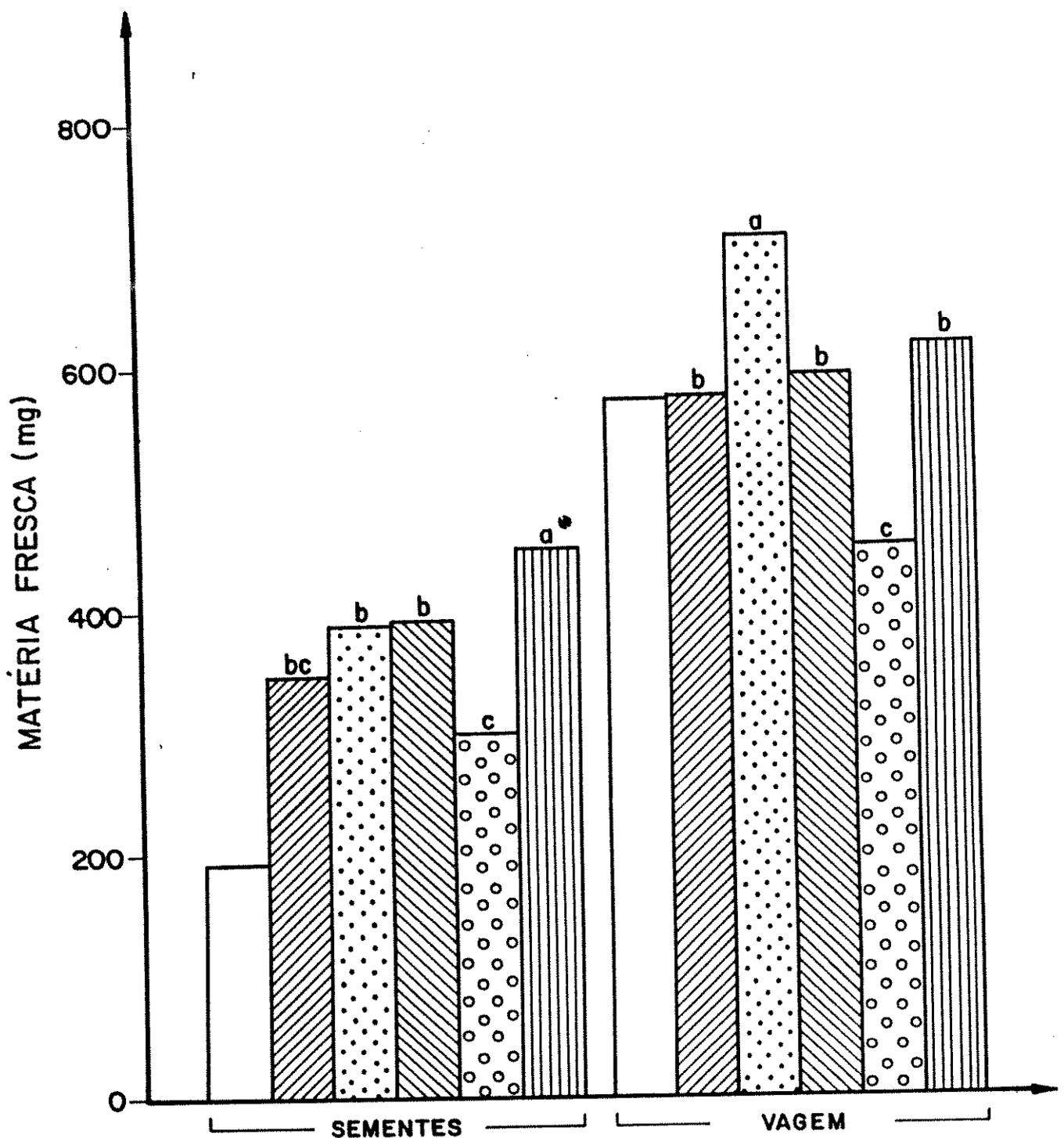
5.7. EFEITO DA ADIÇÃO DE VÁRIAS FONTES DE NITROGÊNIO NO MEIO DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DA MATÉRIA FRESCA, SECA DE VAGENS E SEMENTES E PROTEÍNAS NOS CO-TILÉDONES

Para estes experimentos, foi utilizado o meio básico de CHANDLER et al (1983), variando-se as fontes de nitrogênio, quer orgânicas ou inorgânicas, tendo como concentração final 1.2 mg de N/ml do meio de cultura.

Devido ao grande número de fontes de nitrogênio utilizadas, foram realizados vários experimentos. Para tal, tomou-se a precaução de introduzir um controle sem nitrogênio para cada tipo de estudo, pois não saberíamos os teores de nitrogênio dos caules e vagens das plantas de origem, os quais serão elucidados em experimentos posteriores.

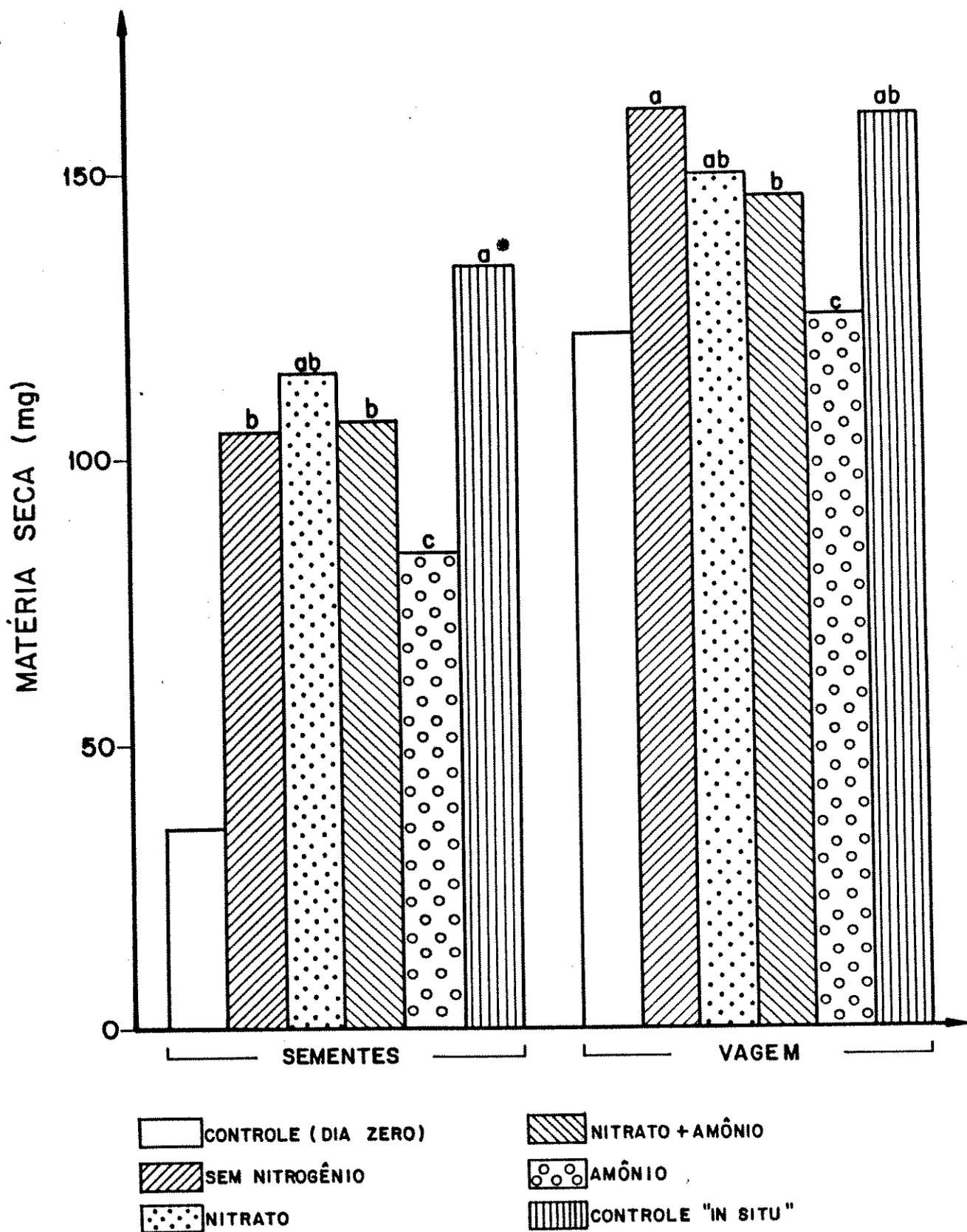
As fontes de nitrogênio inorgânico utilizadas foram os sais KNO_3 , NH_4NO_3 e $(NH_4)_2SO_4$. Os resultados apresentados nos HISTOGRAMAS 10, 11 e 12 nos mostram que o amônio sob a forma de

HISTOGRAMA 10 - Efeito da Adição de Nitrato, Amônio e Mistura
(Nitrato + Amônio) no Meio de Cultivo, sobre
a Produção de Matéria Fresca em "Explants" de
Soja



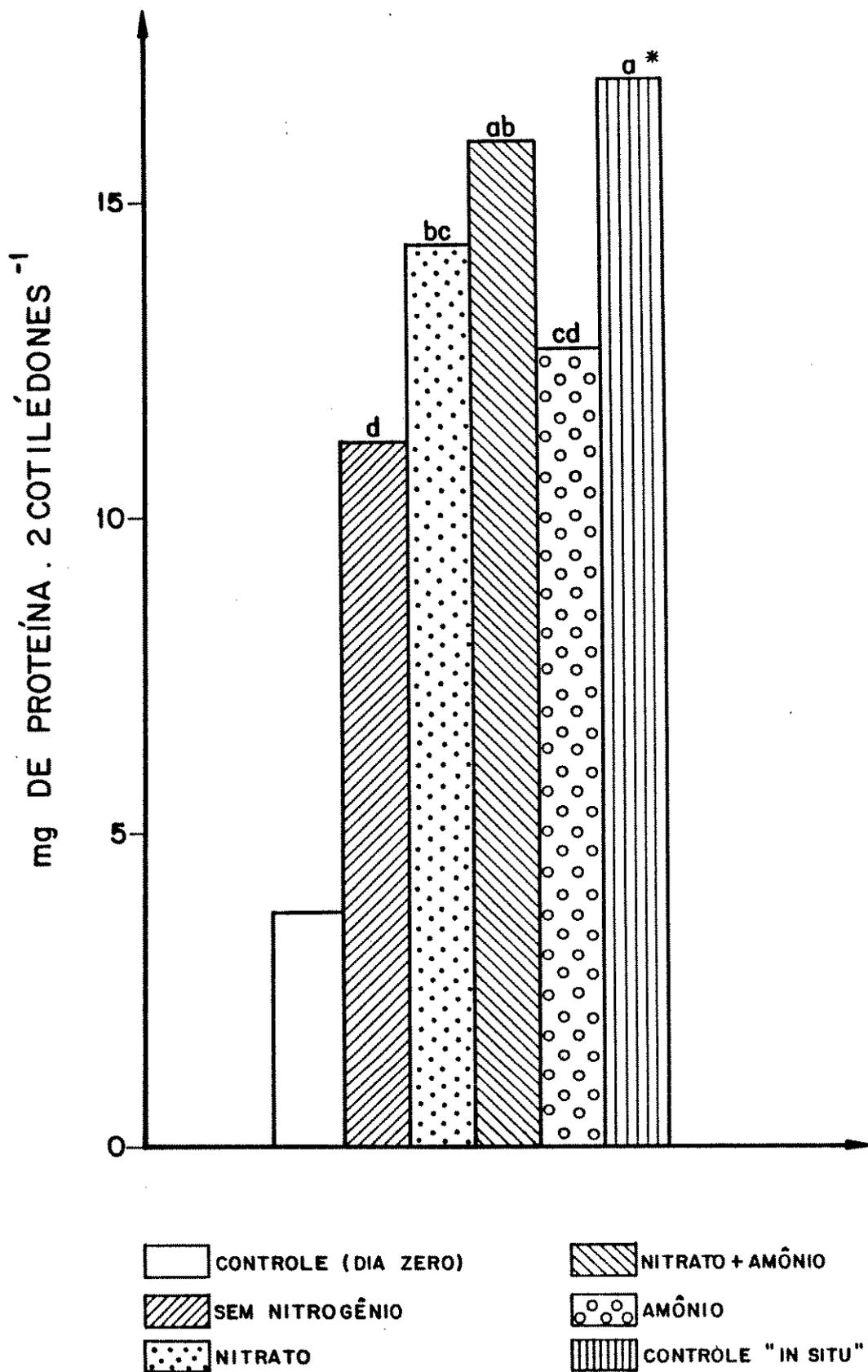
* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

HISTOGRAMA 11 - Efeito da Adição de Nitrato, Amônio e Mistura
(Nitrato + Amônio) no Meio de Cultivo, sobre
a Produção de Matéria Seca em "Explants" de
Soja



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

HISTOGRAMA 12 - Efeito da Adição de Nitrato, Amônio e Mistura
(Nitrato + Amônio) no Meio de Cultivo, sobre
os Teores de Proteínas em "Explants" de Soja.



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ reduziu drasticamente a matéria fresca das vagens e matéria seca das vagens e sementes em relação ao controle sem nitrogênio. Este fato foi confirmado visualmente, pois as vagens dos "explants" apresentaram um amarelecimento e murcharam ao final do experimento. O efeito do íon NH_4^+ sobre a produção de matéria seca das sementes foram semelhantes ao da cultura de cotilédones "in vitro" verificado por HAGA & SODEK (1987) pois a presença deste íon reduziu drasticamente a matéria seca a valores menores do que o controle sem nitrogênio. Uma possível explicação é que o íon amônio, estando em excesso nas vagens e sementes, pode atuar como desacoplador da cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias e cloroplastos (SALISBURY & ROSS, 1978), diminuindo portanto a quantidade de ATP disponível para os processos biossintéticos.

Em relação ao nitrato, o peso da matéria seca das vagens e sementes e matéria fresca das sementes não diferiram do controle sem nitrogênio. Um fato interessante de se observar é que no tratamento com NO_3^- , as vagens apresentaram um aumento da matéria fresca (mas não da matéria seca) em relação a qualquer tratamento utilizado. Deste fato pode-se inferir que, não existindo a redutase do nitrato nos cotilédones de soja (THOMPSON et al, 1977; MORI & SODEK, 1983) e devido à baixa atividade de redutase do nitrato nas vagens (MORI & SODEK, 1983), o íon nitrato pode ter se acumulado nos vacúolos destas, diminuindo o potencial osmótico e portanto retendo maior quantidade de água, como observado pelo aumento do peso da matéria fresca. Por outro lado, o

ion potássio também poderia contribuir com o abaixamento do potencial osmótico, já que o sal inorgânico utilizado como fonte de nitrato foi o KNO_3 .

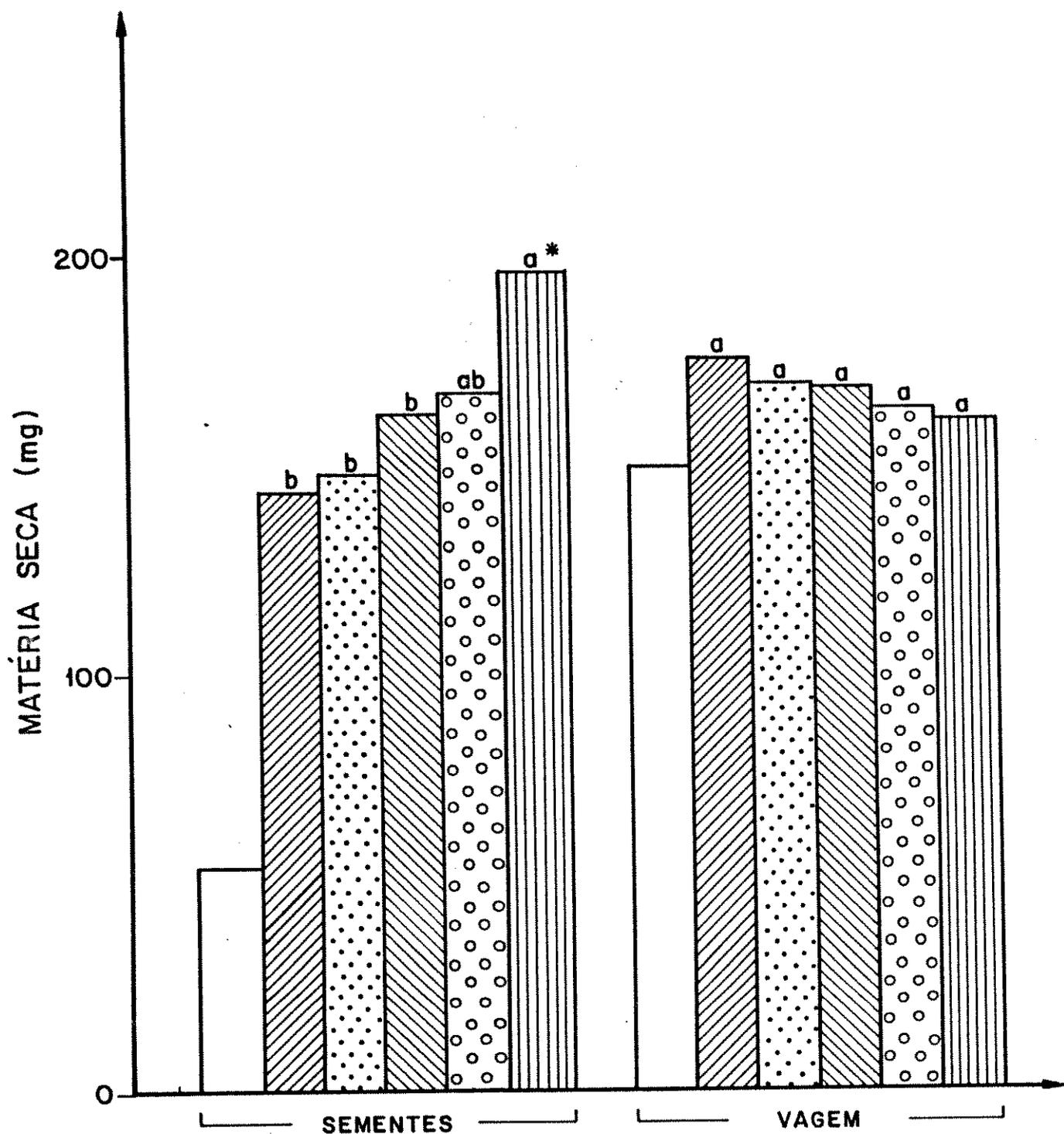
O aumento relativamente baixo de proteínas nos cotilédones dos "explants", resultantes da adição de nitrato, nitrato de amônio e amônia no meio de cultivo relacionadas ao controle sem nitrogênio, nos sugere que estes compostos são fontes pouco eficientes para a cultura de "explants" de soja "in vitro". O aumento obtido com amônio não foi significativo em relação ao controle sem nitrogênio.

Das três fontes utilizadas, a melhor delas foi o NH_4NO_3 . Este fato também foi observado por HAGA & SODEK (1983) em cultura de cotilédone de soja imaturos "in vitro", embora THOMPSON et al (1977) tenham concluído que o nitrato e amônia em duas combinações utilizadas para a cultura de tecidos não foram melhores que o NO_3^- como fonte única de nitrogênio.

Os resultados da adição da glutamina, mistura de glutamina e ácido glutâmico (na proporção de 1 :1), e de ácido glutâmico ao meio de cultivo dos "explants" sobre o peso da matéria seca das vagens e sementes e sobre os teores de proteínas nos cotilédones, estão representados nos HISTOGRAMAS 13 e 14.

Como podemos observar no HISTOGRAMA 13, as três fontes de nitrogênio utilizadas não resultaram em aumento do peso da matéria seca, quer das vagens ou sementes, quando comparadas ao controle sem nitrogênio.

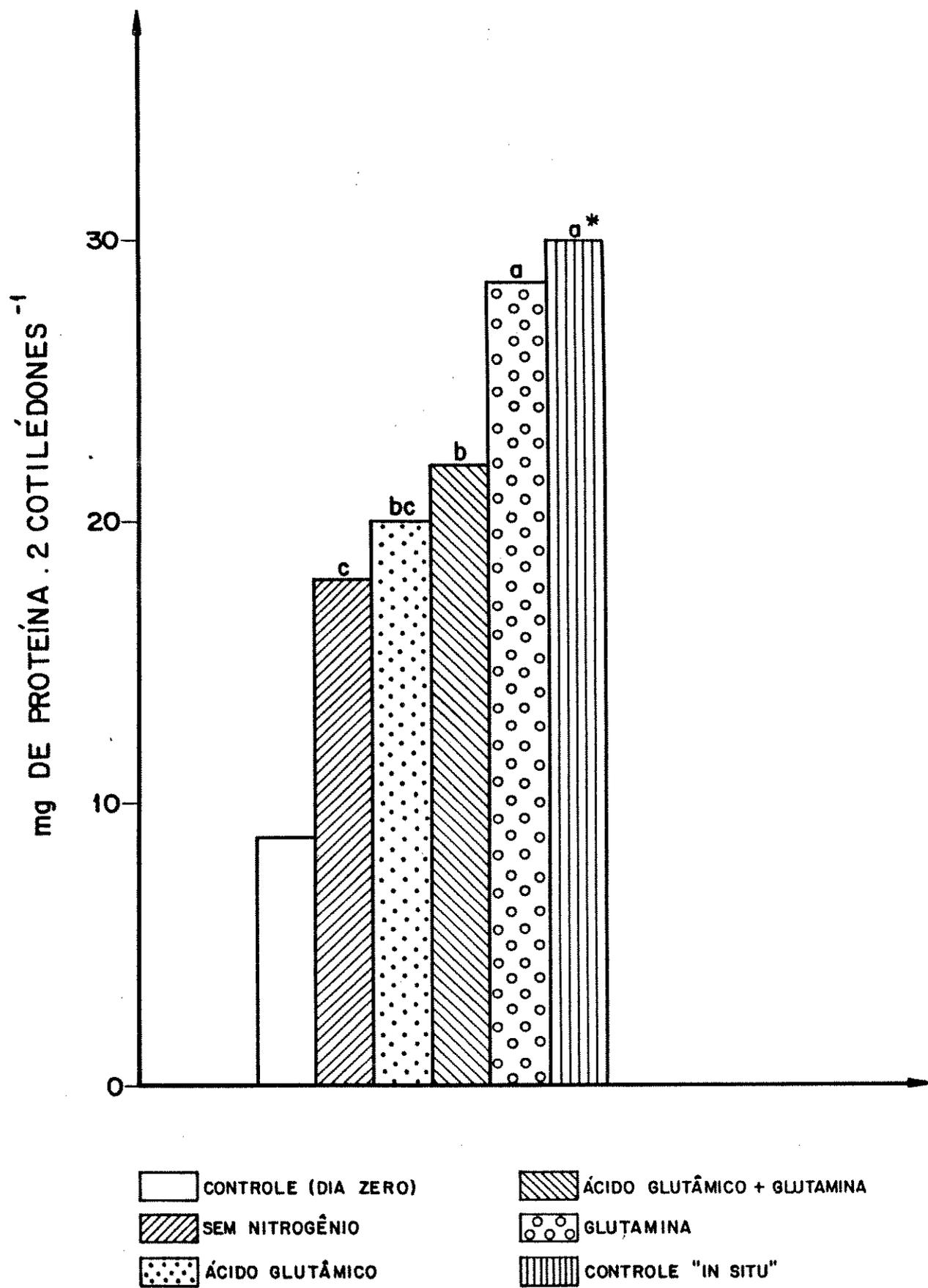
HISTOGRAMA 13 - Efeito da Adição de Ácido Glutâmico, Glutamina e Mistura (Ácido Glutâmico + Glutamina) sobre a Produção de Matéria Seca em Sementes e Vagem de "Explants" de Soja.



- CONTROLE (DIA ZERO)
- SEM NITROGÊNIO
- ÁCIDO GLUTÂMICO
- ÁCIDO GLUTÂMICO + GLUTAMINA
- GLUTAMINA
- CONTROLE "IN SITU"

* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

HISTOGRAMA 14 - Efeito da Adição de Ácido Glutâmico, Glutamina e Mistura (Ácido Glutâmico + Glutamina) no Meio de Cultivo sobre o Teor de Proteínas em "Ex-plants" de Soja.



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

Os teores de proteínas (HISTOGRAMA 14) apresentam grandes variações. Como podemos notar, a adição da glutamina como fonte única de nitrogênio ao meio de cultivo, resultou num maior teor de proteínas, comparável ao controle "in situ". Seguiu-se a mistura (glutamina e ácido glutâmico) e do ácido glutâmico, embora essas duas últimas fontes fossem pouco melhores do que o controle sem nitrogênio.

Resultados semelhantes a este trabalho, tendo como fontes isoladas de nitrogênio a glutamina e o ácido glutâmico foram encontrados para a cultura de cotilédones imaturos de ervilha por LEA et al (1979) e em soja por THOMPSON et al (1977) e HAGA & SODEK (1987).

Destes resultados pode-se inferir que a glutamina como fonte única de nitrogênio deve ser transportada facilmente e ser utilizada rapidamente na síntese de proteínas de reserva nos cotilédones. Evidências para tal, podem ser retiradas dos trabalhos de RAINBIRD et al (1984), GIFFORD & THORNE (1986) pois mostraram pela técnica dos tegumentos vazios que a principal substância liberada para os cotilédones foi a glutamina.

Com relação ao ácido glutâmico, a presença deste aminoácido ao meio de cultivo parece inibir a utilização da glutamina. Se ele não inibisse a utilização da glutamina, a adição da mistura de ácido glutâmico e glutamina ao meio de cultivo resultaria em teores de proteínas semelhantes ao da glutamina como fonte única de nitrogênio. Embora LEA et al (1979) tenham concluído que a incapacidade do glutamato de atuar como uma boa fon-

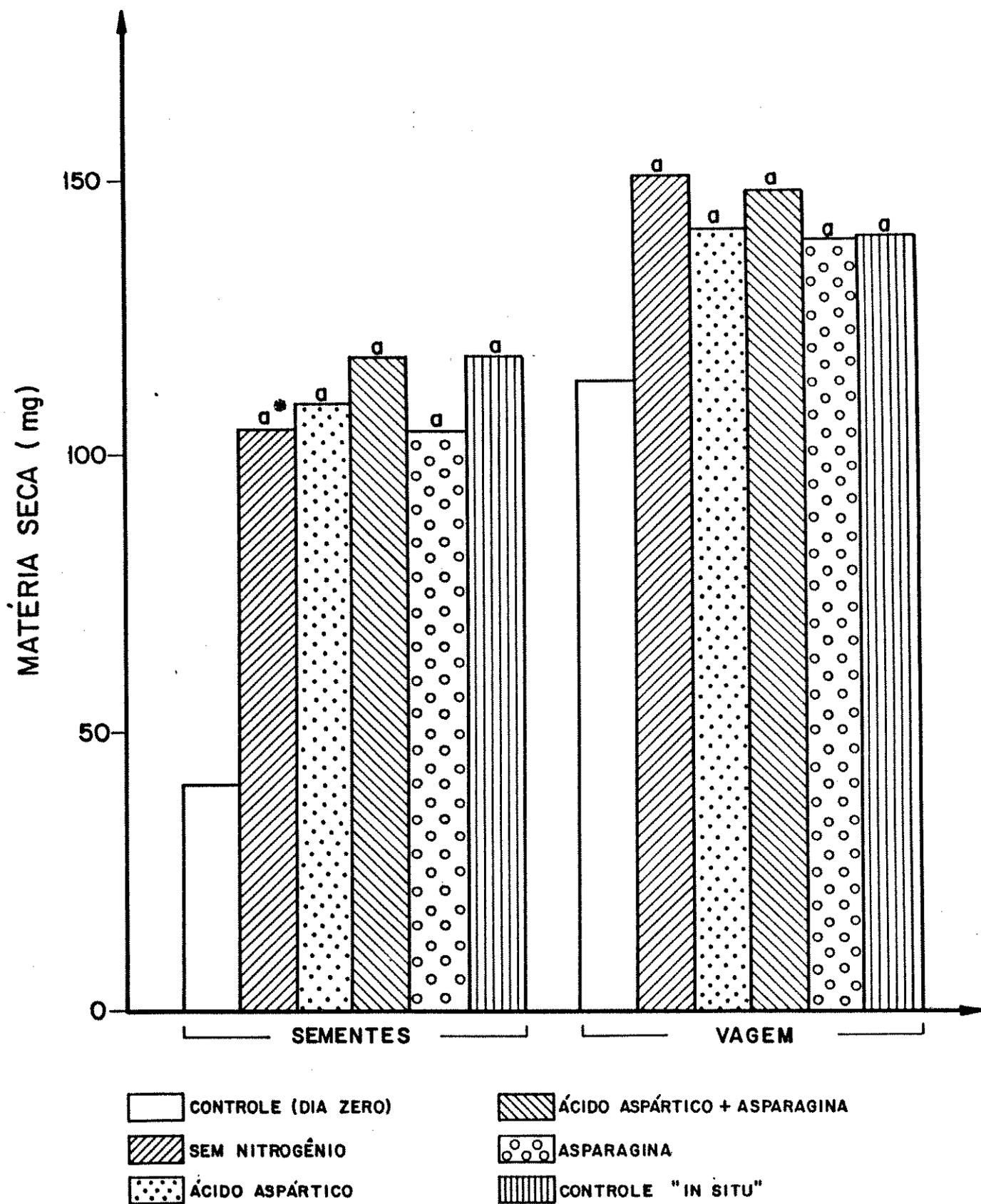
te de nitrogênio para a síntese de proteínas de reserva seja devido à perda da amônia necessária para a síntese das amidas glutamina e asparagina, os resultados aqui apresentados não sugerem que isto realmente aconteça.

Quando se utilizou asparagina, mistura de asparagina e ácido aspártico (na proporção de 1 : 1), e ácido aspártico como fontes de nitrogênio no meio de cultura, observa-se no HISTOGRAMA 15 que os pesos da matéria seca das vagens e sementes foram idênticas ao controle sem nitrogênio.

Em relação às proteínas (HISTOGRAMA 16), os maiores teores foram registrados quando da adição de asparagina ou da mistura asparagina e ácido aspártico, embora menores que o controle "in situ". O ácido aspártico, foi uma fonte menos eficiente do que a mistura de asparagina e ácido aspártico embora tenha acumulado maiores teores de proteínas do que o controle sem nitrogênio.

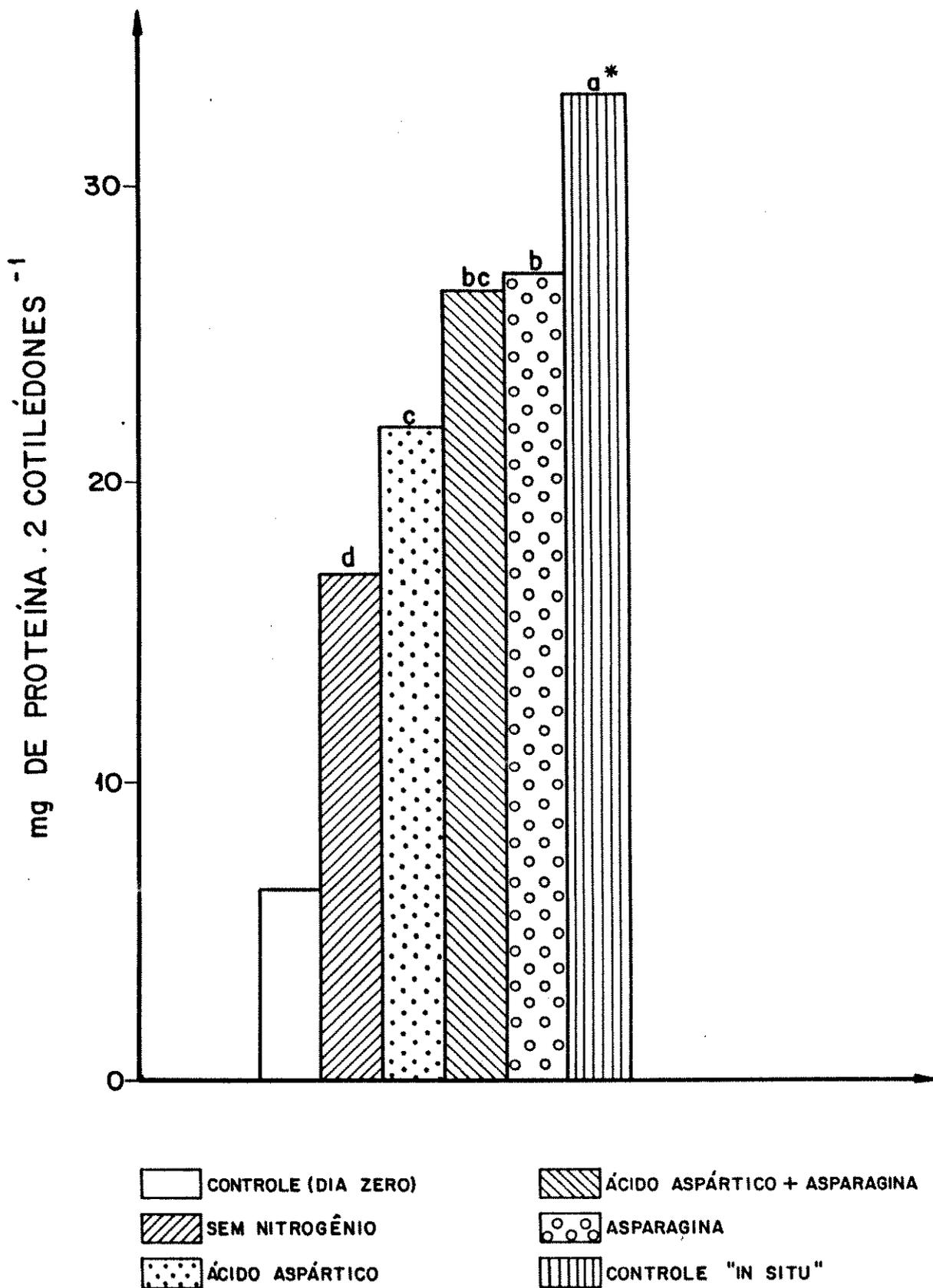
Embora alguns trabalhos tenham mostrado que a glutamina é a melhor fonte de nitrogênio para a cultura de cotilédones imaturos "in vitro" (THOMPSON et al, 1977; SKOKUT et al, 1982a; HAGA & SODEK, 1987), este experimento nos mostra que a asparagina é uma fonte de nitrogênio tão boa quanto a glutamina, no processo de biossíntese de proteínas de reserva dos cotilédones. Isto pode ser facilmente verificado, pois ao subtrairmos dos teores de proteínas do tratamento com glutamina (HISTOGRAMA 14) e asparagina (HISTOGRAMA 16) dos respectivos controles sem nitrogênio, obtém-se um aumento de aproximadamente 10 mg de proteínas para as duas

HISTOGRAMA 15 - Efeito do Ácido Aspártico, Asparagina e Mistura (Asparagina + Ácido Aspártico) no Meio de Cultivo sobre a Produção de Matéria Seca em Vagem e Sementes de "Explants" de Soja.



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

HISTOGRAMA 16 - Efeito do Ácido Aspártico, Asparagina e Mistura (Asparagina + Ácido Aspártico) no Meio de Cultivo sobre o Teor de Proteínas em Cotilédones de "Explants" de Soja.



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

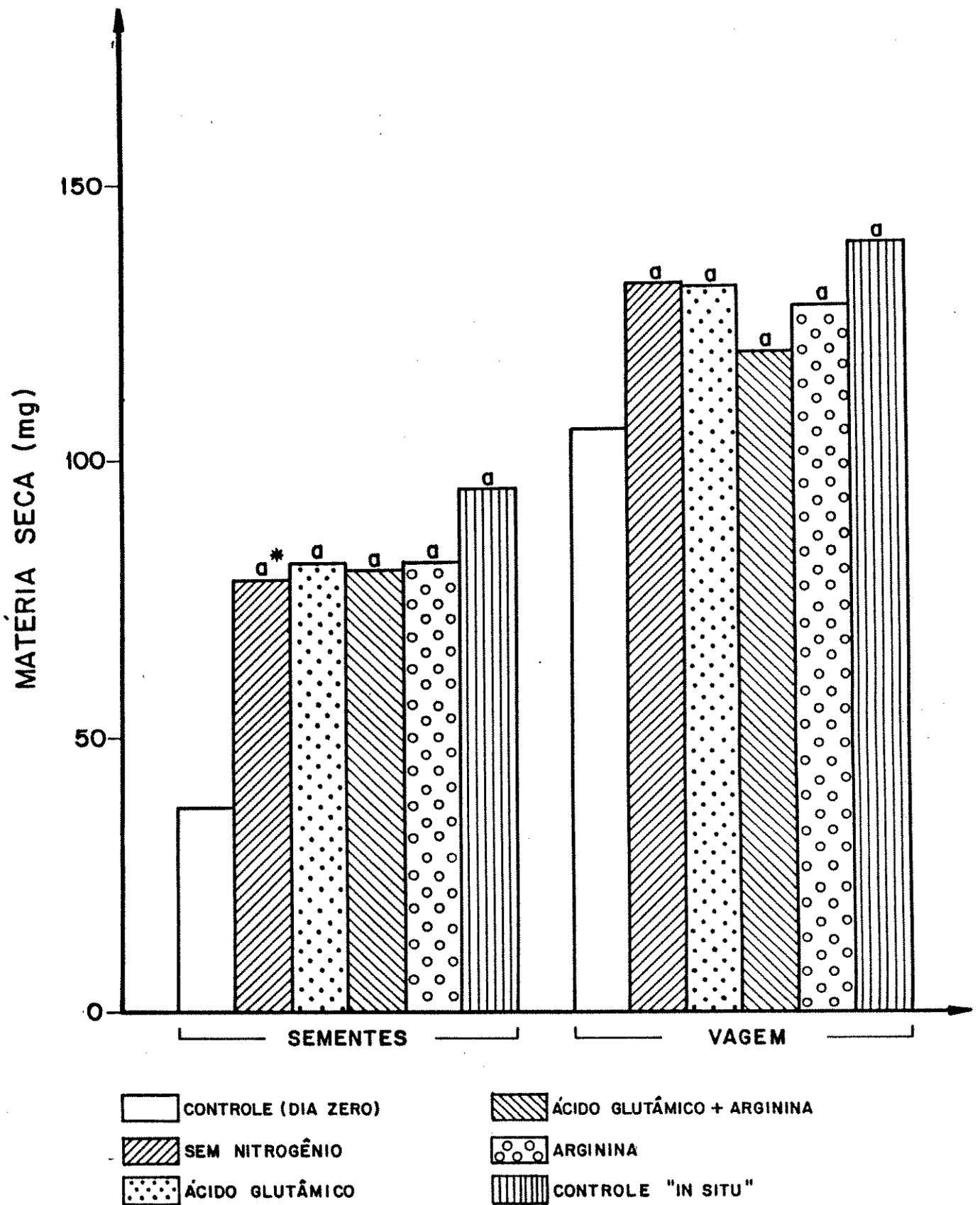
fontes estudadas.

O ácido aspártico foi uma fonte de nitrogênio melhor para o processo da biossíntese de proteínas de reserva do que o ácido glutâmico (HISTOGRAMAS 14 e 16), o que foi também observado por THOMPSON et al (1977) e HAGA & SODEK (1987) para a cultura de cotilédones imaturos de soja "in vitro".

O ácido aspártico, por sua vez, não inibiu a utilização da asparagina, embora o ácido glutâmico tenha apresentado efeito inibitório relativo à glutamina. A incapacidade do ácido aspártico de ser uma boa fonte de nitrogênio, provavelmente se deve ao fato de que, este não apresenta duas moléculas de amônia como no caso da asparagina, e, portanto, pode faltar esta molécula para a síntese de outros aminoácidos e posteriormente proteínas.

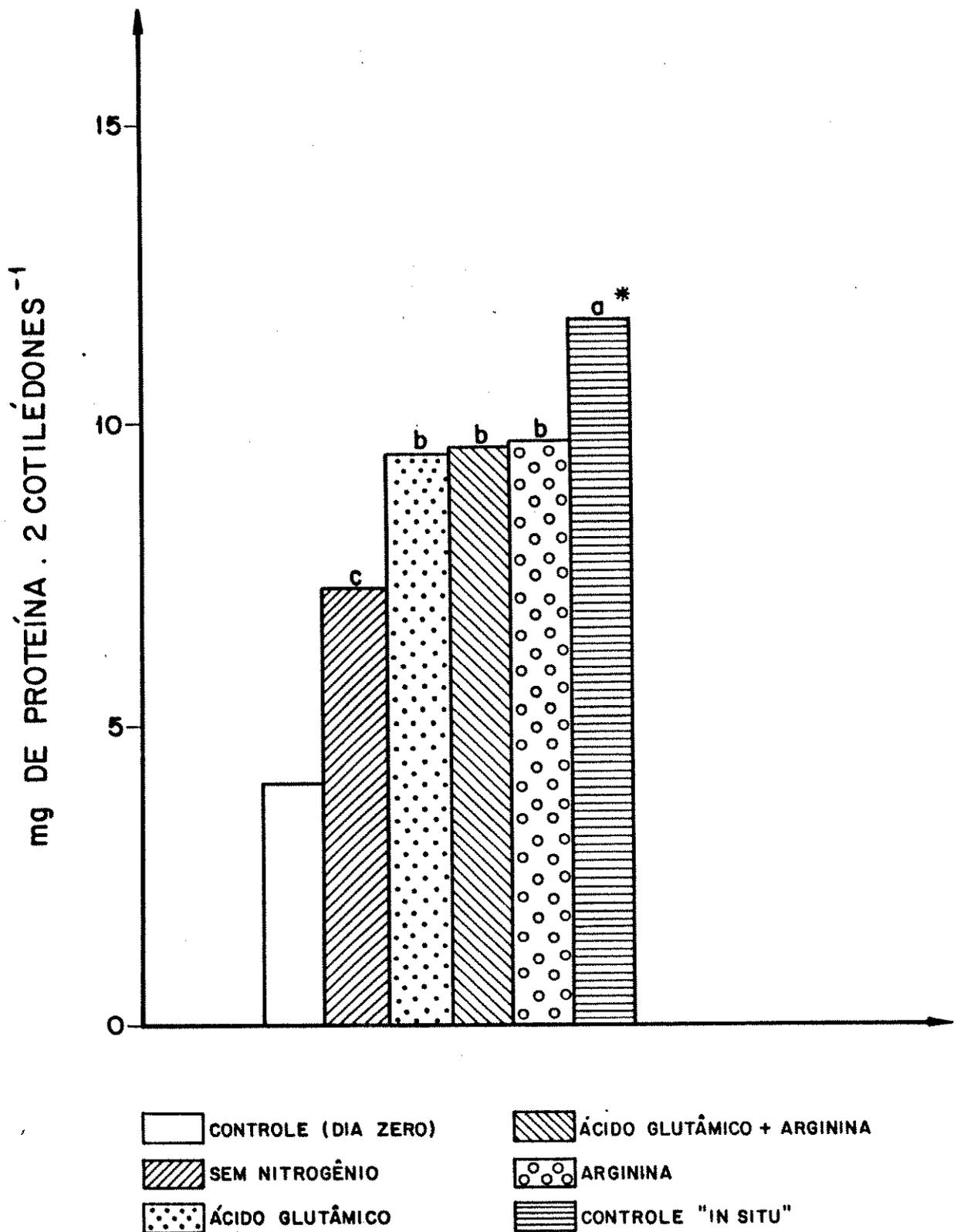
Os efeitos dos aminoácidos básico (arginina), ácido (ácido glutâmico) e mistura 1 : 1 de arginina e ácido glutâmico sobre a produção de matéria seca e teores de proteínas podem ser visualizados nos HISTOGRAMAS 17 e 18. Como podemos observar, estes aminoácidos não têm efeito sobre o peso da matéria seca das vagens e sementes quando adicionadas ao meio de cultivo. Quanto às proteínas, seus teores são maiores do que o controle sem nitrogênio, mas menores do que as fontes glutamina e asparagina (HISTOGRAMAS 14 e 16). A baixa eficiência do ácido glutâmico já foi discutida anteriormente. Para a arginina, uma possível explicação é que esta substância nitrogenada deve ser pouco translocada das vagens para as sementes, já que sementes de caupi recebem quantidades insignificantes de arginina (PEOPLES et al, 1985a).

HISTOGRAMA 17 - Efeito do Ácido Glutâmico, Arginina e Mistura (Ácido Glutâmico + Arginina) sobre a Produção de Matéria Seca das Sementes e Vagem de "Ex-plants" de Soja.



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

HISTOGRAMA 18 - Efeito do Ácido Glutâmico, Arginina e Mistura
(Ácido Glutâmico + Arginina) sobre o Teor de
Proteínas de Cotilédones de "Explants" de Soja.



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

Reforçando ainda esta idéia, temos o trabalho de HSU et al (1984), mostrando-nos que a concentração apoplástica dos aminoácidos básicos nos cotilédones e tegumentos de soja é baixa, quando comparadas aos aminoácidos neutros e ácidos.

Os efeitos da adição de glicina (aminoácido neutro) ao meio de cultivo sobre os pesos da matéria seca e teores de proteínas podem ser visualizados nos HISTOGRAMAS 19 e 20.

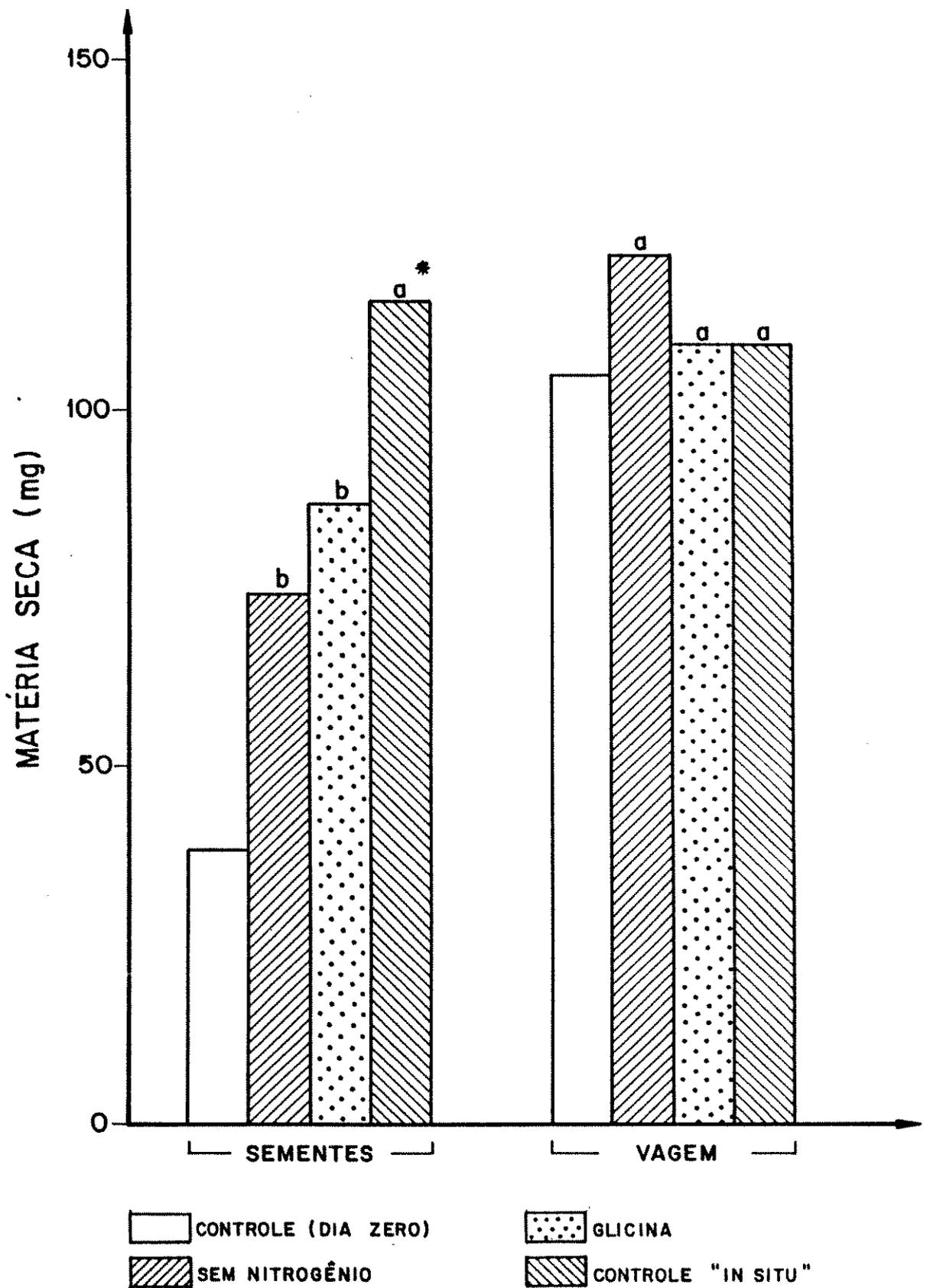
Como podemos observar não ocorreu aumento da matéria seca das vagens e sementes em relação ao controle sem nitrogênio, quando da adição da glicina ao meio de cultivo. Por outro lado, os teores de proteínas aumentaram bastante em relação a este mesmo controle.

Embora a glicina tenha sido uma fonte eficiente para o processo da biossíntese de proteínas de reserva, ela não é tão boa quanto as fontes glutamina e asparagina. Para isto, ao verificarmos os HISTOGRAMAS 14 e 16 poderemos notar que o aumento real dos teores de proteínas nos tratamentos com estas duas amidas (cerca de 10 mg de proteínas) foi maior do que a fonte glicina (aproximadamente 6.4 mg).

Resultados semelhantes foram encontrados por THOMPSON et al (1977) e SKOKUT et al (1982b) para cotilédones de soja crescendo "in vitro".

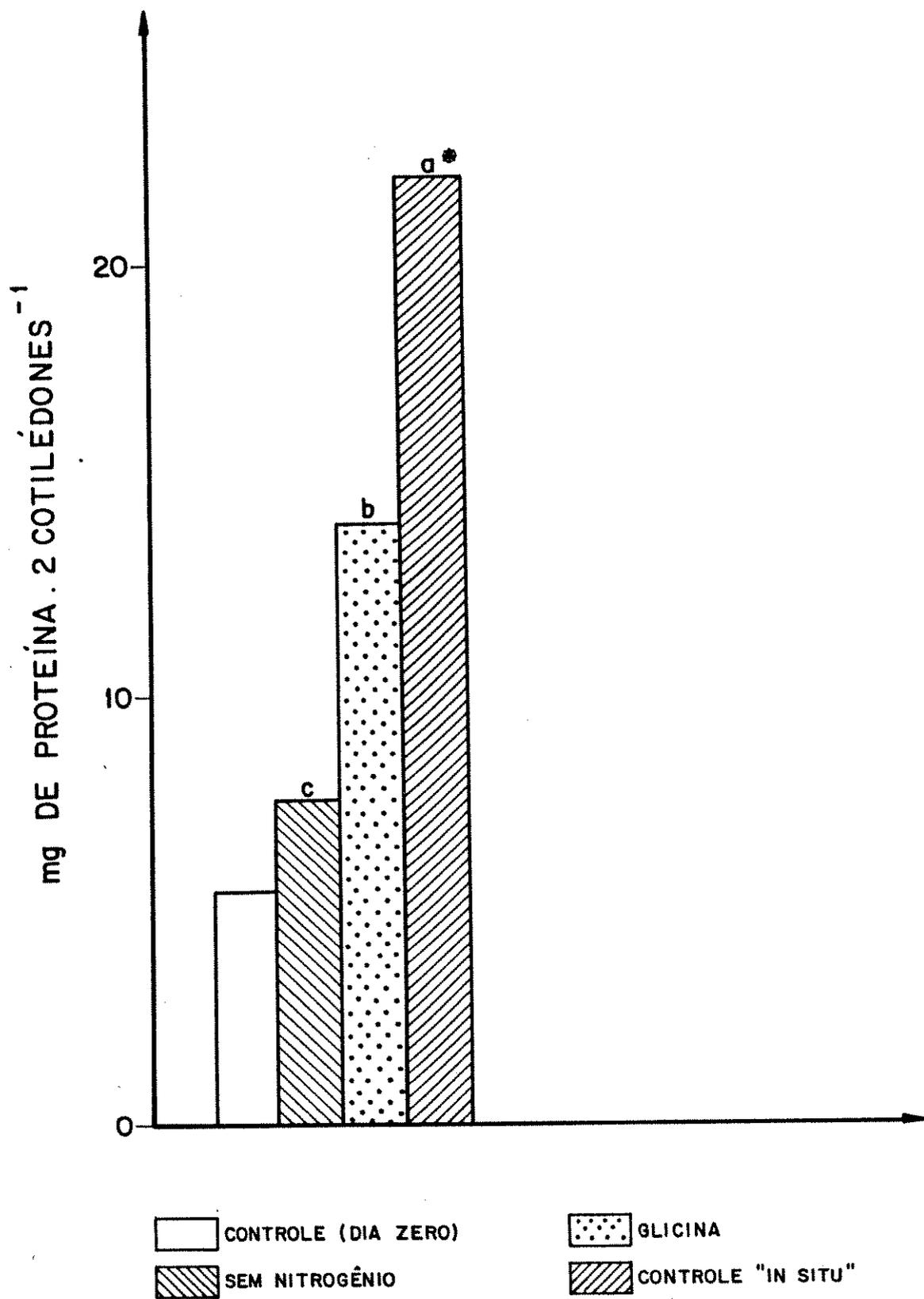
Este teor protéico, em torno de 60 % dos valores obtidos com a glutamina e a asparagina com fontes de nitrogênio, pode ser devido à utilização do nitrogênio da glicina nas reações de transaminação, originando portanto vários aminoácidos que poderão

HISTOGRAMA 19 - Efeito da Adição da Glicina no Meio de Cultivo,
sobre a Produção de Matéria Seca de Sementes e
Vagem de "Explants" de Soja.



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

HISTOGRAMA 20 - Efeito da Adição da Glicina no Meio de Cultivo,
sobre o Teor de Proteínas de Cotilédones de
"Explants" de Soja.



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

ser utilizados na biossíntese de proteínas de reserva, conforme sugestões de SKOKUT et al (1982b).

Os ureídeos, principais substâncias translocadas em plantas de soja noduladas (MATSUMOTO et al, 1977; McCLURE & ISRAEL, 1979; STREETER, 1979; LAYZEL & LARUE, 1982) têm pouco efeito sobre a produção de matéria seca e síntese de proteínas de reserva em cotilédones imaturos de soja cultivados "in vitro" (THOMPSON et al, 1977; HAGA & SODEK, 1987).

Por outro lado, as plantas de soja não noduladas translocam principalmente a asparagina (OHYAMA & KAMAZAWA, 1979), mas esta fonte é bastante eficiente na produção de proteínas de reserva em cultura de cotilédones "in vitro" (HAGA & SODEK, 1987).

A partir desses fatos procurou-se então preparar meios de cultivo que simulassem plantas de soja noduladas e suas influências sobre a produção de matéria seca das vagens e sementes e proteínas nos cotilédones de "explants" de soja.

Os meios de cultivo continham asparagina, alantoína, ácido alantóico como fontes únicas de nitrogênio e uma mistura de ácido alantóico, alantoína e asparagina nas proporções de 56 %, 24 % e 20 % do nitrogênio total, respectivamente. As proporções utilizadas nesta mistura foram idênticas às encontradas por SAWAZAKI (1986) em exsudatos de plantas de soja noduladas da mesma variedade utilizada no presente trabalho.

Os resultados apresentados nos HISTOGRAMAS 21 e 22 nos mostram que as 4 fontes utilizadas neste experimento não diferem significativamente entre si, quer seja o peso da matéria seca das

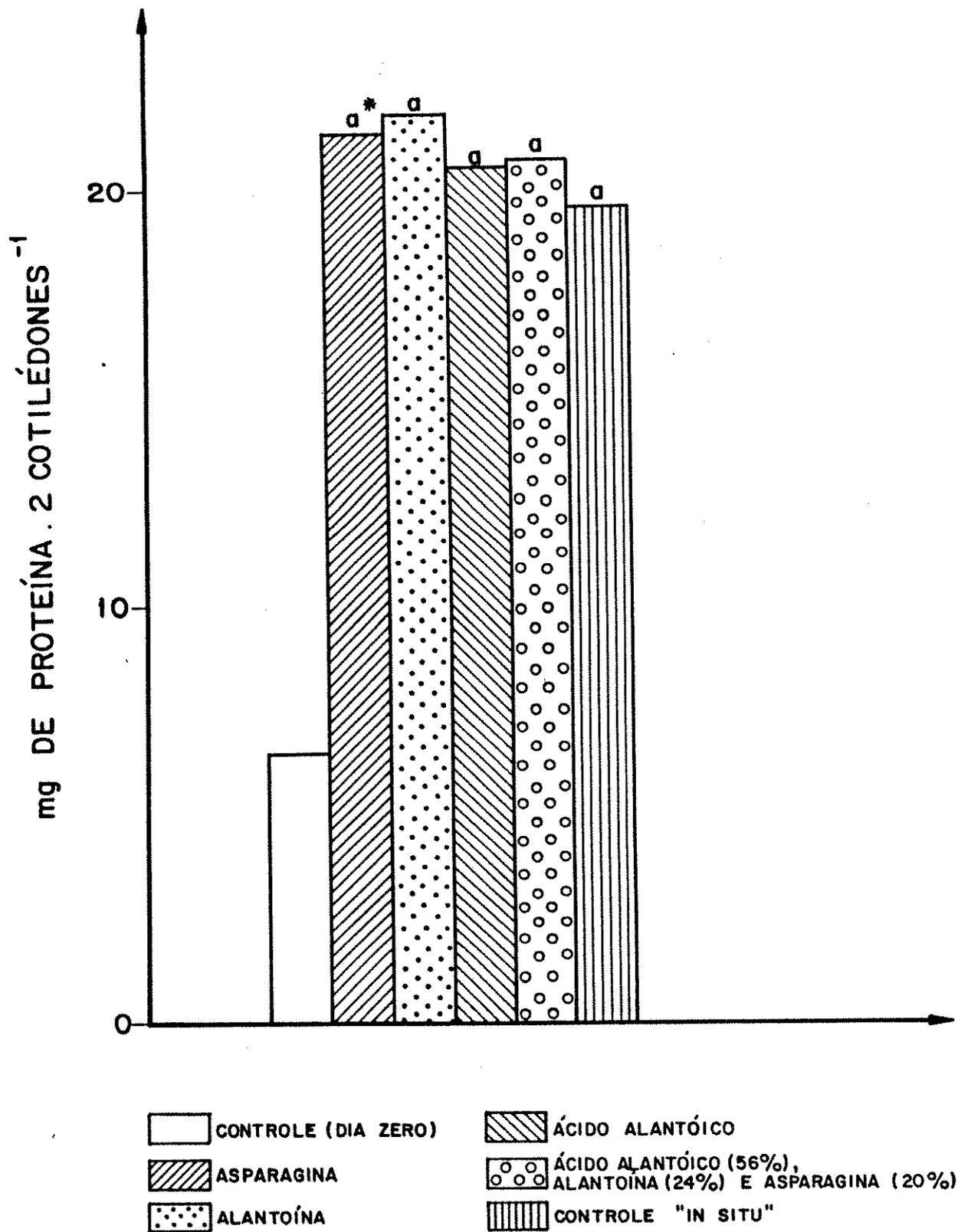
vagens e sementes ou teores de proteínas. Um fato interessante de se notar é que na cultura de "explants", a alantoína acompanha a asparagina na produção de proteína. Estes resultados são bastante diferentes daqueles obtidos por THOMPSON et al (1977), RAINBIRD et al (1984) e HAGA & SODEK (1987), nos quais a alantoína foi uma fonte de nitrogênio ineficiente em relação à asparagina para a cultura de cotilédones imaturos "in vitro".

A adição de alantoína e ácido alantóico como fontes únicas de nitrogênio ao meio de cultivo não resultaram em teores diferentes de proteínas de reserva. Entretanto, estes resultados diferiram daqueles obtidos por HAGA & SODEK (1987), em cultura de cotilédones "in vitro", onde o ácido alantóico foi mais eficiente do que a alantoína. Uma provável explicação é que a alantoína pode ter sido degradada à ácido alantóico antes de atingir os cotilédones, já que GOMES & SODEK (1984) mostraram altas atividades de alantoinase em vagens e tegumentos de plantas crescendo "in vivo".

Quando da utilização da mistura das fontes de nitrogênio (simulação das plantas de soja noduladas), verificou-se o mesmo crescimento das vagens e sementes mantidas sob asparagina (simulação de plantas não noduladas). Embora GOMES & SODEK (1984) tenham mostrado um crescimento máximo de cotilédones e vagens de soja em períodos de tempo diferentes conforme a nutrição (53º dia após o florescimento para plantas noduladas e 65º dia para plantas tratadas com NO_3^-), isto não ocorreu nestes tratamentos, provavelmente devido ao curto período experimental utilizado neste

HISTOGRAMA 21 - Efeito da Adição ao Meio de Cultivo de Asparagina, Alantoína, Ácido Alantóico e Mistura (Ácido Alantóico 56 %, Alantoína 24 % e Asparagina 20 %) sobre a Produção de Matéria Seca das Sementes e Vagem de "Explants" de Soja.

HISTOGRAMA 22 - Efeito da Adição ao Meio de Cultivo de Asparagina, Alantoína, Ácido Alantóico e Mistura (Ácido Alantóico 56 %, Alantoína 24 % e Asparagina 20 %) sobre os Teores de Proteínas em Cotilédones de "Explants" de Soja.



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

trabalho (7 dias).

Em conclusão, as melhores fontes para a síntese de proteína de reserva nos cotilédones foram a asparagina, glutamina, alantoína e ácido alantóico, alcançando ou às vezes superando a síntese "in situ". São justamente estes os compostos de nitrogênio mais importantes na nutrição da semente de soja.

5.8. EFEITO DA ADIÇÃO DE GLUTAMINA, ASPARAGINA E ALANTOÍNA AO MEIO DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA, TEORES DE PROTEÍNAS, AMINOÁCIDOS LIVRES E UREÍDEOS EM TODAS AS PARTES DOS "EXPLANTS" DE SOJA

Como observamos até o presente momento, as melhores fontes de nitrogênio que proporcionaram maiores teores protéicos em cotilédones dos "explants" de soja foram a glutamina, asparagina e alantoína.

Para um esclarecimento melhor do comportamento destas três fontes sobre o metabolismo ou armazenamento do nitrogênio, caules, vagens, tegumentos e cotilédones foram analisados quanto ao peso da matéria seca, teores de proteínas, aminoácidos livres e ureídeos, em conjunto ou em partes do "explant".

Nesse experimento foram utilizadas as amidas glutamina e asparagina e ureídeo alantoína.

Como ponto de referência foi incluído um tratamento sem nitrogênio, para se ter uma idéia da influência das substâncias nitrogenadas armazenadas anteriormente pelas plantas ou que foram metabolizadas ou translocadas de uma região para outra dentro do "explant" durante o período experimental de 7 dias.

Para se obter uma segurança maior na interpretação dos resultados, o experimento foi repetido 3 vezes, com 7 repetições de cada tratamento. As amostras dos tratamentos foram liofilizadas e reunidas em uma única amostra, trituradas e utilizadas para as análises como descrito em materiais e métodos.

Os dados expressos com base na matéria seca, são apresentados nos HISTOGRAMAS 23, 24, 25 e 26, e os dados para o peso seco na TABELA 2.

5.8.1. Peso da Matéria Seca

Como podemos verificar na TABELA 2, todas as partes dos "explants" aumentaram os pesos da matéria seca em relação ao controle (dia zero). O aumento da matéria seca nas vagens, tegumentos e cotilédones no tratamento sem nitrogênio pode ser um reflexo da utilização de sacarose do meio. A sacarose pode ser translocada e transformada em carboidratos nestas partes dos "explants", já que estes são os principais contribuintes do peso da matéria seca em tecidos vegetais.

TABELA 2 - Efeito da adição de várias fontes de nitrogênio ao meio de cultivo, sobre a produção de matéria seca no caule, vagem, tegumento e cotilédones de "explants" de soja.

TRATAMENTO	Matéria Seca(mg)			
	Caule	Vagem	Tegumento	Cotilédones
Ø	206 b *	116 d	9 c	26 c
S/N	271 ab	158 a	15 b	27 c
GLN	262 ab	147 bc	17 a	99 ab
ASN	294 a	150 b	18 a	102 a
ALN	306 a	151 b	18 a	95 ab
Contr. "in situ"	246 b	133 c	18 a	96 ab

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

Quanto ao aumento da matéria seca dos caules, os resultados não podem ser conclusivos, uma vez que, na seleção dos "explants" foram levados em consideração apenas o tamanho das vagens e sementes e não o diâmetro do caule.

5.8.2. Teores de Proteínas, Aminoácidos Livres e Ureídeos em Todas as Partes dos "Explants" de Soja

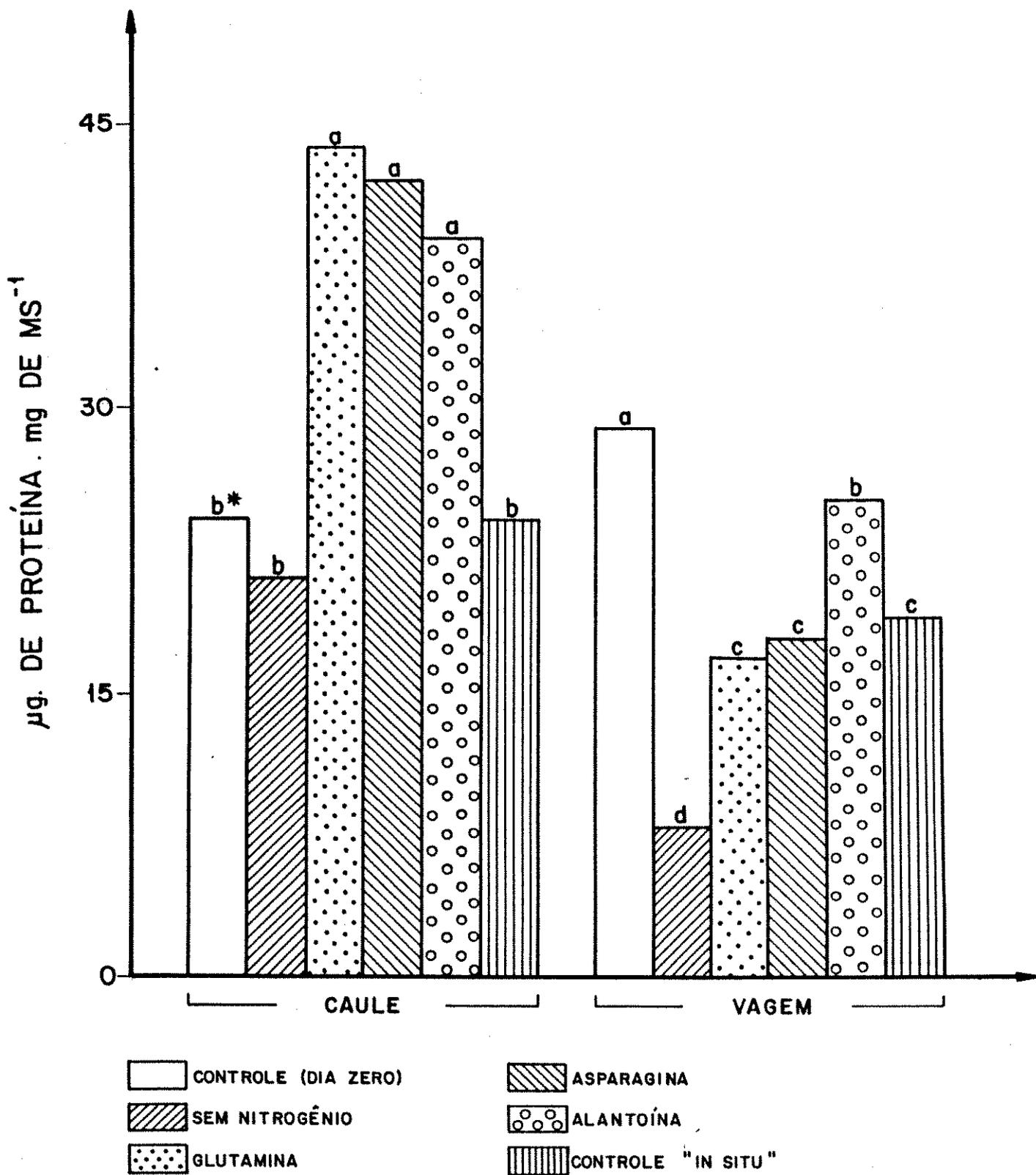
5.8.2.1. Caule

Os teores de proteínas totais, com base na matéria seca (HISTOGRAMA 23), aumentaram no caule em relação ao tratamento sem nitrogênio e ao controle "in situ", mas não houve qualquer variação entre as três fontes estudadas.

Deve-se atribuir este aumento ao acúmulo de aminoácidos ou ureídeos com subsequente metabolismo e transformação dos mesmos em proteínas. Como podemos observar no HISTOGRAMA 25, quando se adiciona glutamina ou asparagina ao meio de cultivo, há um grande aumento no teor de aminoácidos, ou ureídeos quando da adição da alantoína. Uma parte, pelo menos, deste aumento deve também representar o influxo da fonte nitrogenada que está sendo translocada a partir do meio.

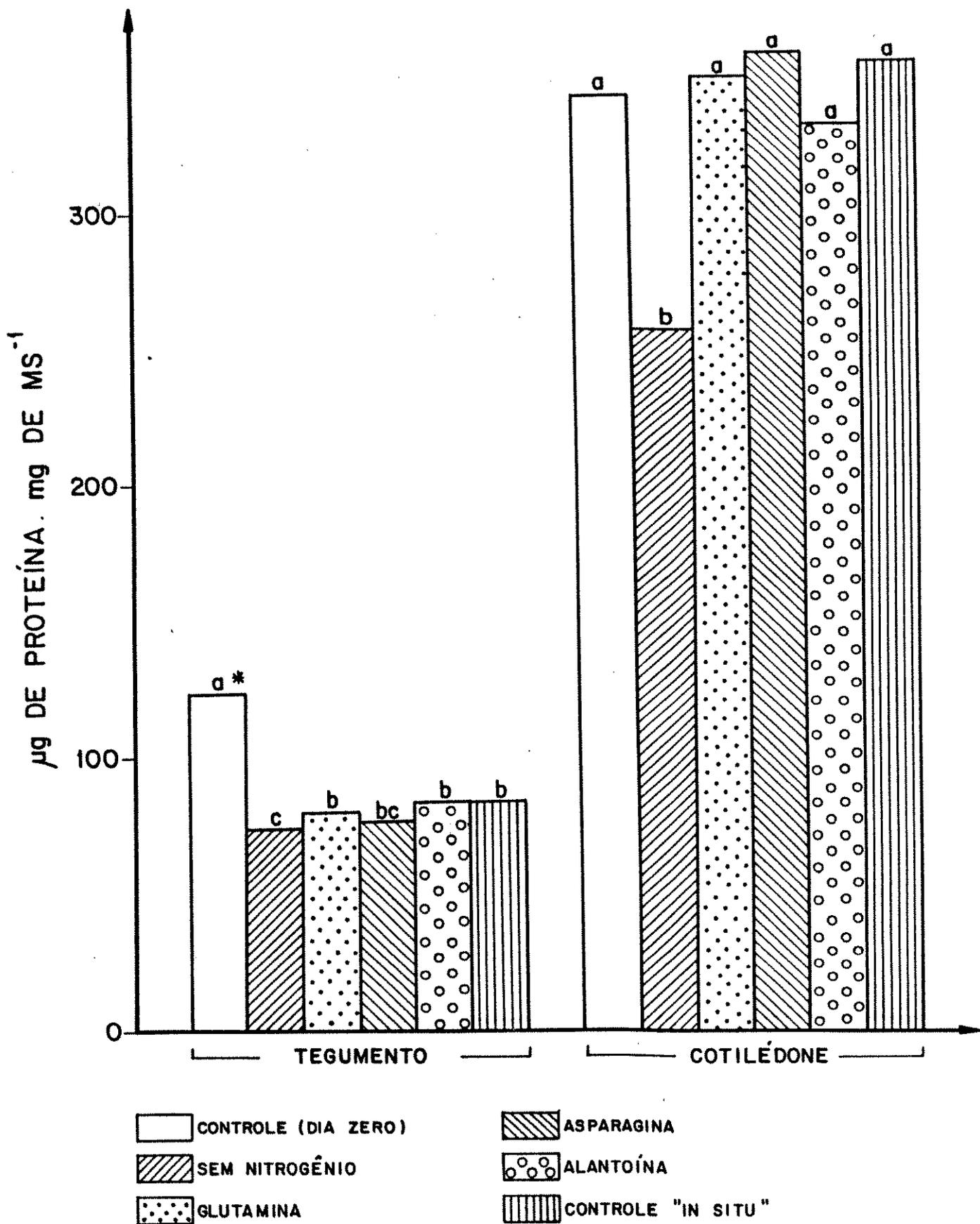
Um fato interessante de se notar no HISTOGRAMA 25 é que os ureídeos parecem ser as primeiras substâncias metabolizadas ou mobilizadas nos caules, pois, quando se utiliza a glutamina ou asparagina como fontes de nitrogênio, seus teores caem a valores

HISTOGRAMA 23 - Efeito de Várias Fontes de Nitrogênio, no Meio de Cultivo, sobre os Teores de Proteínas em Caule e Vagem de "Explants" de Soja.



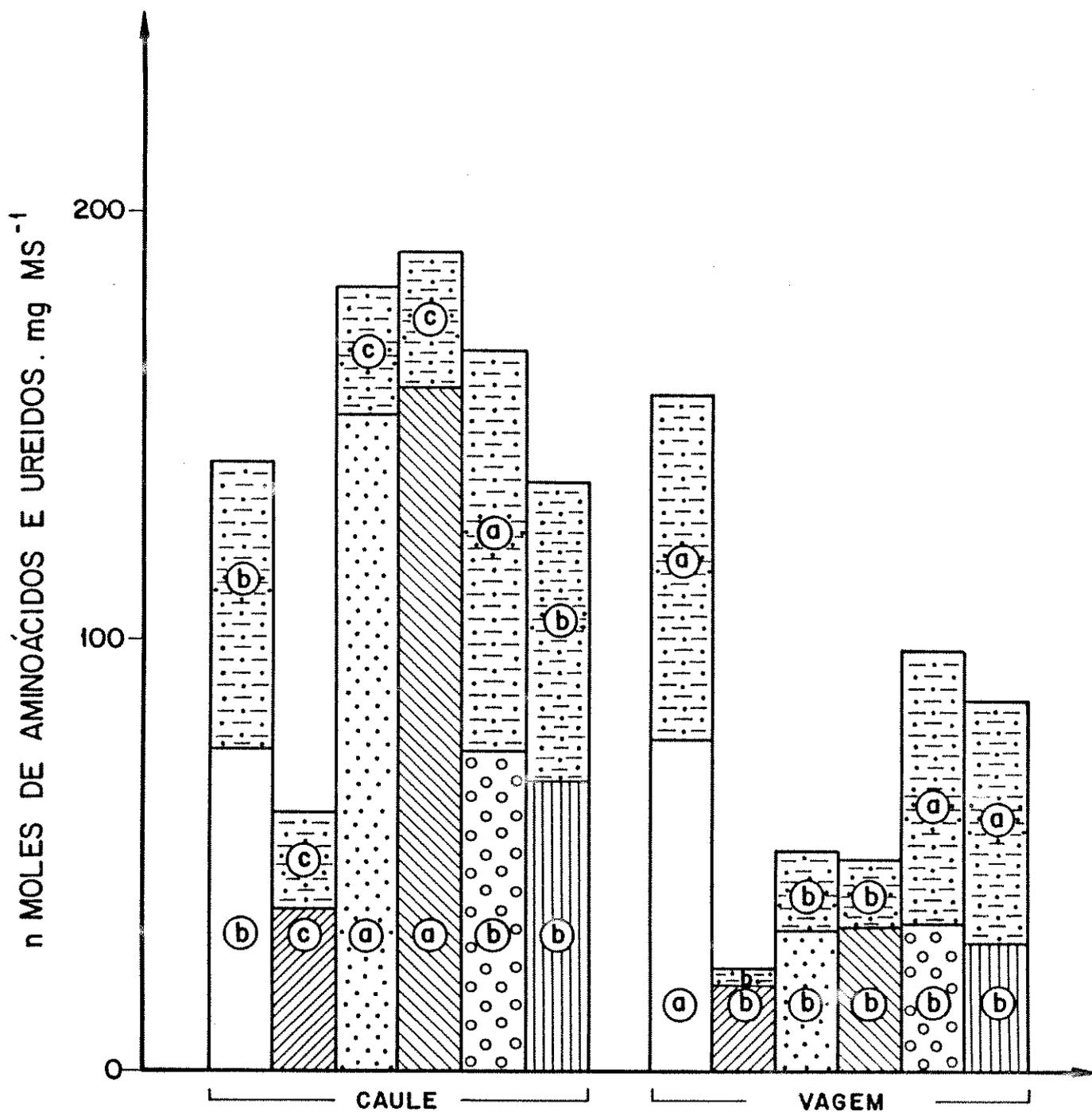
* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

HISTOGRAMA 24 - Efeito de Várias Fontes de Nitrogênio, no Meio de Cultivo, sobre os Teores de Proteínas em Tegumentos e Cotilédones de "Explants" de Soja.



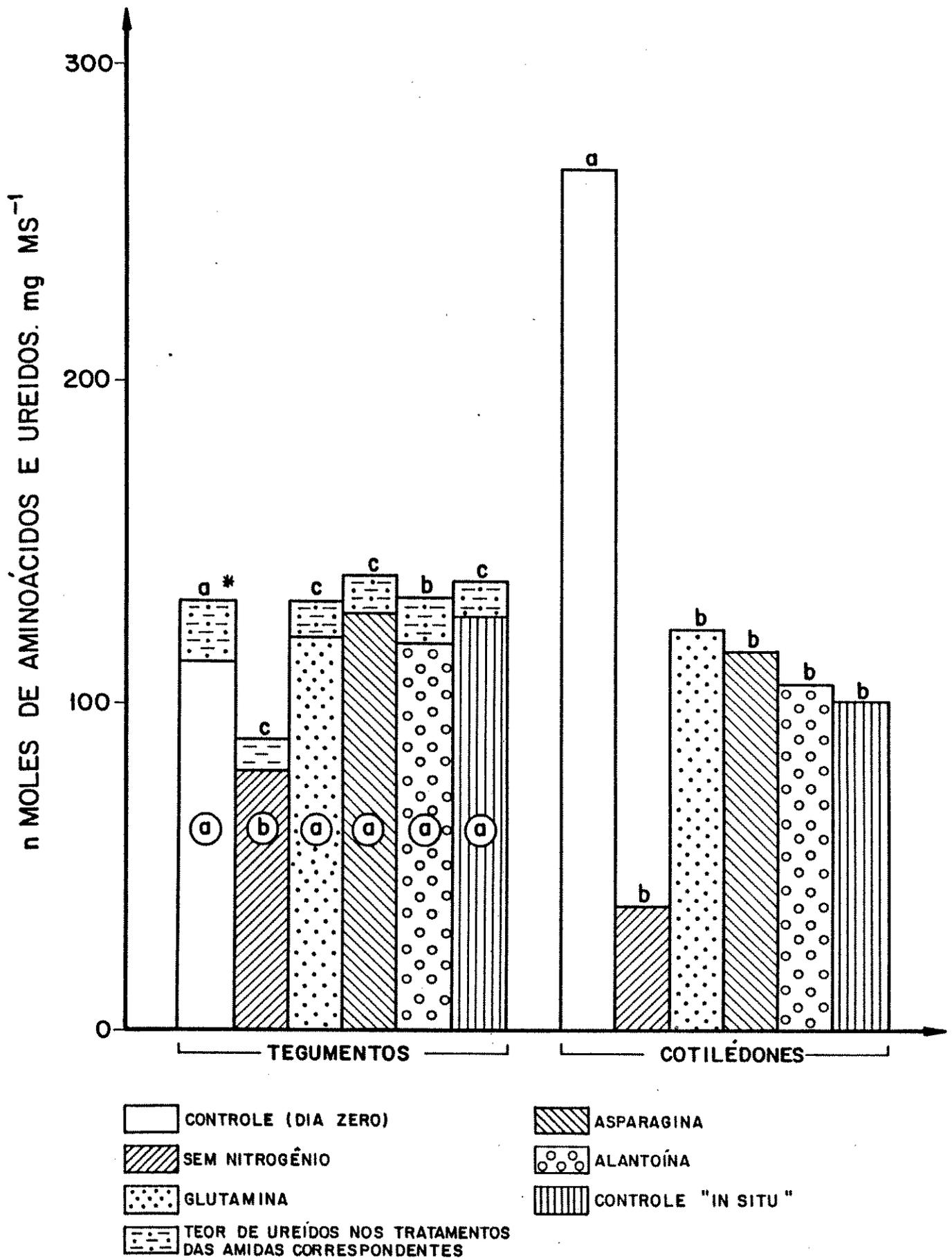
* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

HISTOGRAMA 25 - Efeito de Várias Fontes de Nitrogênio no Meio de Cultivo sobre os Teores de Aminoácidos e Ureídeos em Caule e Vagem de "Explants" de Soja.



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

HISTOGRAMA 26 - Efeito de Várias Fontes de Nitrogênio no Meio de Cultivo sobre os Teores de Aminoácidos e Ureídeos em Tegumentos e Cotilédones de "Ex-plants" de Soja.



* As médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade.

de aproximadamente 50 % em relação ao controle "in situ", ou ao controle dia zero. Uma evidência da metabolização dos ureídeos é que, quando a alantoína foi adicionada ao meio de cultivo como fonte única de nitrogênio, além do aumento em proteínas no caule (HISTOGRAMA 23), os teores de aminoácidos livres permanecem constantes em relação ao controle "in situ" e ao controle dia zero (HISTOGRAMA 25), embora maiores do que no controle sem nitrogênio.

Quanto ao controle sem nitrogênio, observa-se que os aminoácidos e principalmente os ureídeos são mobilizados nos caules, mas não acarretaram quedas significativas nos teores de proteínas (HISTOGRAMA 23), sugerindo que as proteínas dos caules são bastante estáveis.

Os aumentos dos teores de proteínas do caule, quando foram fornecidos aos "explants" as três fontes de nitrogênio mostram que, na planta "in situ", a capacidade de armazenar nitrogênio está abaixo de seu limite.

Os trabalhos até o presente momento trataram principalmente das análises dos teores de aminoácidos ou ureídeos em caules de plantas intactas de soja (MATSUMOTO et al, 1977; STREETER, 1979; SERRES et al, 1985; WAREMBOURG & FERNANDES, 1985) ou caupi (HERRIDGE et al, 1978; ATKINS et al, 1982), ou introdução de asparagina, glutamina e ureídeos marcados com ^{14}C ou ^{15}N na corrente transpiratória (ATKINS et al, 1982; RAINBIRD et al, 1984).

Embora no cultivo de "explants" as amidas glutamina e asparagina e os ureídeos (alantoína) sejam introduzidas diretamente no caule, por um período de 7 dias, os resultados não foram diferentes daqueles encontrados por RAINBIRD et al (1984), quando verificaram acúmulo de asparagina, glutamina e alantoína nos caules de soja durante um período de 5 horas. Por sua vez, em experimentos de longa duração (condições de campo), SERRES et al (1985) encontraram acúmulo de asparagina e ureídeos em duas variedades de soja. Parece, portanto, que os caules podem funcionar como órgãos de armazenamento de substâncias nitrogenadas.

Além do acúmulo das amidas e ureídeos nos caules de soja mostrados por WAREMBOURG & FERNANDEZ (1985) e em caupi por HERRIDGE et al (1978), ATKINS et al (1982), os ureídeos são metabolizados nos caules e pecíolos dessas plantas. Ao que tudo indica, esta metabolização pode ser direcionada para a síntese e armazenamento de proteínas nos caules, como visto no HISTOGRAMA 23, para posterior hidrólise, translocação e preenchimento das sementes.

5.8.2.2. Vagens

Os teores de proteínas, aminoácidos livres e ureídeos nas vagens dos "explants" podem ser visualizados nos HISTOGRAMAS 23 e 25. Como podemos notar, os teores de aminoácidos permaneceram constante em relação aos controles "in situ" e sem nitrogênio, mas os teores de ureídeos foram bem menores quando da pre-

sença da glutamina ou asparagina no meio de cultivo. Por outro lado, os ureídeos praticamente desapareceram no controle sem nitrogênio.

O tratamento com alantoína aumentou o teor de proteínas nas vagens e a quantidade de ureídeos ficou acima do valor das outras duas fontes. A quantidade de ureídeos permaneceu igual aos controles "in situ" ou dia zero.

Um fato interessante de se notar é que os teores de proteínas das vagens no tratamento sem nitrogênio caíram muito em relação ao dia zero ou aos outros tratamentos. Isto pode sugerir que as proteínas das vagens são menos estáveis do que as do caule, sendo portanto metabolizadas ou translocadas numa situação de deficiência de nitrogênio.

Os resultados nos mostram, portanto, que as amidas (glutamina e asparagina) e ureídeos chegam até as vagens. Este fato foi também observado por RAINBIRD et al (1984), os quais encostraram 14 %, 14 % e 12 % de asparagina, glutamina e alantoína, respectivamente, nos frutos de soja, após um período de 5 horas de aplicação dessas substâncias marcadas com ^{14}C na corrente transpiratória. Destas percentagens, metade delas estavam nas sementes, quando o tratamento foi asparagina; 30 % quando glutamina e apenas 1 % quando alantoína.

As amidas (glutamina e asparagina) e os ureídeos (alantoína) podem ser metabolizadas nas vagens, pois foram observadas altas atividades de alantoinase e sintetase da glutamina por GOMES & SODEK (1984) e GOMES (1982), respectivamente. GOMES (1982)

notou também a presença da enzima L-glutamina (amida) oxoglutarato amida transferase (GOGAT).

Parece, portanto, que as vagens são locais de intenso metabolismo, principalmente dos ureídeos. Estes podem ser degradados, utilizados no processo de biossíntese de proteínas ou enviados às sementes, resultando num aumento de proteínas de reserva nos cotilédones.

5.8.2.3. Tegumentos

Os teores de aminoácidos, ureídeos e proteínas nos tegumentos das sementes são observados nos HISTOGRAMAS 24 e 26. Como podemos observar, os teores de proteínas permaneceram iguais ao controle "in situ". Os aminoácidos livres totais só diminuíram significativamente nos seus teores no tratamento sem nitrogênio. Os teores de ureídeos foram maiores no tratamento com alantoína, embora menores que o controle dia zero.

Um fato interessante de se notar é que o nível de aminoácidos livres não cai quando do tratamento com alantoína. Isto sugere um metabolismo intenso no tegumento (ureídeos sendo transformados em aminoácidos) ou um suprimento normal de aminoácidos livres provenientes da vagem, isto é, metabolismo dos ureídeos pelo menos nas vagens. Para reforçar esta idéia, PEOPLES et al (1985), trabalhando com caupi, mostraram que os ureídeos foram metabolizados principalmente nas vagens e tegumentos das sementes e que esta última libera o nitrogênio para os cotilédones princi-

palmente como arginina, histidina, glutamina e asparagina, dificilmente como ureídeo. Este fato foi também confirmado por RAINBIRD et al (1984), os quais observaram nos exsudatos dos tegumentos das sementes de soja 52 % do nitrogênio sob a forma de glutamina, seguida pela asparagina (19 %).

Em ervilha, foi mostrado por MURRAY & CORDOVA-EDWARDS (1984b) que nos tegumentos das sementes ocorre a principal conversão das unidades C₄ derivadas do ASP e ASN para os compostos glutamina e ácido glutâmico.

Ao que tudo indica, os tegumentos têm a função de metabolizar a asparagina e ureídeos e os produtos desta degradação são enviados aos cotilédones para o processo de biossíntese de proteínas de reserva.

5.8.2.4. Cotilédones

Nas determinações dos teores de proteínas, aminoácidos livres e ureídeos nos cotilédones dos "explants" de soja, observa-se que as três fontes utilizadas foram mais eficientes na síntese de proteínas de reserva, em relação ao controle sem nitrogênio (HISTOGRAMA 24) principalmente levando-se em conta o aumento de matéria seca na presença das três fontes (TABELA 2).

Os teores de aminoácidos não diferiram em relação ao controle "in situ" e não foi detectada a presença de ureídeos nos cotilédones.

Embora THOMPSON et al (1977), LEA et al (1979), SKOKUT et al (1982a), RAINBIRD et al (1984), COKER & SCHAEFER (1985), HAGA & SODEK (1987), tenham demonstrado que a glutamina é a principal fonte nitrogenada para a síntese de proteínas de reserva em cultivo de cotilédones isolados "in vitro", os resultados aqui apresentados discordam dos autores acima. Isto pode ser devido ao sistema de "explants" desenvolvido neste trabalho se aproximar mais da planta de origem do que ao sistema de cultivo de cotilédones isolados "in vitro".

A ausência de ureídeos nos cotilédones sugere que estes compostos são metabolizados nas vagens e tegumentos antes de entrarem nos cotilédones, já que RAINBIRD et al (1984) observaram que as principais substâncias nitrogenadas liberadas dos tegumentos para as sementes foram a glutamina e a asparagina. Esta hipótese pode ser reforçada por COKER & SCHAEFER (1985) os quais demonstraram que os tegumentos das sementes apresentam maiores atividades de glutamina sintetase e maiores taxas de degradação da alantoína do que os cotilédones, indicando que os tegumentos têm um papel importante na assimilação e degradação da alantoína.

A alta síntese de proteínas de reserva nos cotilédones pode ser devido principalmente ao metabolismo dos aminoácidos, pois nesta parte do fruto foram detectadas altas atividades de asparaginase e alantoinase (GOMES & SODEK, 1984; TONIN, 1988), sintetase do glutamato e sintetase da glutamina (STOREY & BEEVERS, 1978; STOREY & REPORTER, 1978 e TONIN, 1988).

Como podemos observar, as três fontes de nitrogênio utilizadas percorreram um caminho normal de transporte, ou seja, caule, vagem, tegumento e cotilédones, podendo acumular-se ou serem metabolizadas, resultando, portanto, em maiores teores de proteínas nos cotilédones.

5.9. DISCUSSÃO GERAL DO EFEITO DAS AMIDAS (GLUTAMINA E ASPARAGINA) E UREÍDEOS (ALANTOÍNA) SOBRE OS "EX-PLANTS" DE SOJA

Dos resultados até agora discutidos, tomou-se por base o peso da matéria seca das 4 partes do "explant".

Se observarmos a TABELA 2, notaremos que o peso da matéria seca aumentou, principalmente se relacionarmos os tratamentos ao controle dia zero. Este efeito deveu-se principalmente à fonte de carbono, pois a sacarose foi adicionada a todos os meios de cultivo na mesma concentração, onde se variava apenas as fontes de nitrogênio. Como os carboidratos são os principais contribuintes da matéria seca e sabendo-se que o nitrogênio contribuiu em apenas 2 % do total do peso seco em milho (LATSHAW & MILLER, 1924, citados por SALISBURY & ROSS, 1978), os resultados serão então analisados com base nos níveis de nitrogênio, em vez de matéria seca.

Para se conseguir valores aproximados de nitrogênio total, os teores de proteínas (TABELA 4) foram divididos pelo fator 6.25 (transforma peso de proteína em peso de nitrogênio) e poste-

TABELA 3 - Efeito de glutamina, asparagina, alantoína ao meio de cultivo sobre a quantidade de nitrogênio (umol), em caules, vagens, tegumentos e cotilédones de "explants" de soja.

TRAT.	Proteínas (umol de N)			Aminoácidos (umol de N)			Ureídeos (umol de N)			umoles de N Total		
	caule	vagem	tegumento cotilédone	caule	vagem	tegumento cotilédone	caule	vagem	tegumento			
Ø	59.30b*	40.62ab	15.44a	102.00c	21.66bc	13.72a	1.57b	9.96bc	49.74c	37.98a	0.70bc	354.31
S/N	71.82b	16.66c	15.34a	261.35b	15.27c	4.73b	1.88b	5.02c	14.81e	2.40b	0.62c	409.91
GLN	136.87a	29.39b	17.54a	403.87a	57.05a	7.22b	3.28a	18.94a	25.24de	10.95b	0.77b	727.78
ASN	151.62a	32.62ab	18.03a	429.05a	67.58a	7.53b	3.70a	18.40a	33.65d	9.32b	0.84b	772.44
ALN	147.80a	44.30a	18.91a	369.15a	32.60b	7.89b	3.32a	15.36ab	106.04a	38.37a	1.07a	784.82
CIS	69.22b	31.04ab	18.43a	397.60a	23.77bc	5.93b	3.41a	15.95ab	63.80b	29.83a	0.78b	659.76

Ø - Controle Dia zero

CIS - Controle "in situ"

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

TABELA 4 - Efeito da adição de glutamina, asparagina e alantoina sobre os teores de proteínas, aminoácidos livres e ureídeos totais em caules, vagens, tegumentos e cotilédones de "explants" de soja.

TRAT	Proteínas (ug)			Aminoácidos (nmoles)			Ureídeos (nmoles)				
	Caule	Vagem	Tegumento Cotilédone	Caule	Vagem	Tegumento Cotilédone	Caule	Vagem	Tegumento Cotilédone		
Ø	5331b*	3558a	1351a	8925c	14439b	1046b	6640b	12434c	9495a	174bc	Ø
S/N	6284b	1458c	1342a	22868b	10180b	1257b	3350b	3703e	600b	155c	Ø
GLN	11796a	2572b	1535a	35339a	38032a	2187a	12624a	6310de	2738b	193b	Ø
ASN	13267a	2854ab	1578a	37542a	45051a	2465a	12270a	8412d	2329b	210b	Ø
ALN	12933a	3876a	1655a	32301a	21733b	2212a	10239a	26510a	9592a	269a	Ø
CIS	6057b	2590b	1613a	34790a	15847b	2275a	10129a	15950b	7458a	194a	Ø

Ø - Controle Dia zero

CIS - Controle "in situ"

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

riormente por 14 (peso molecular do nitrogênio), obtendo-se assim umoles de N.

Os teores de N-amino ou amídico foram obtidos multiplicando-se os teores de aminoácidos livres pelo fator 1.5, como uma média do número de átomos de N por mol de aminoácido, considerando a predominância da glutamina e asparagina, as quais possuem 2 átomos de N por mol.

Os teores de ureídeos foram multiplicados pelo fator 4, já que existem 4 átomos de nitrogênio em suas moléculas.

Os resultados apresentados na TABELA 3 nos mostram, inicialmente, que o tratamento sem nitrogênio pode acumular N-protéico nos caules, pois há uma tendência de aumento nos teores desse elemento em relação ao controle dia zero.

A maior contribuição para este armazenamento do N-protéico em caules, na ausência da adição de qualquer fonte de nitrogênio ao meio de cultivo do "explant" deveu-se principalmente ao N-ureídeo, pois se observarmos os teores desses elementos nos caules, ocorreu diminuição em cerca de 70 % relativo ao tratamento sem nitrogênio e controle dia zero. Ocorreu ainda uma pequena contribuição dos aminoácidos. Além do armazenamento nos caules de N-protéico, os ureídeos podem ser translocados para os frutos.

Nas vagens os ureídeos são as principais substâncias metabolizadas, pois os teores de N-ureídeo no tratamento sem nitrogênio caem cerca de 93 % em relação ao controle dia zero.

Nos tegumentos das sementes, os teores de ureídeos apresentam valores bastante baixos, relativos às vagens, mas não houve diferenças entre o dia zero e controle sem nitrogênio.

No tratamento sem N, houve um acréscimo de 160 μmol de N na fração protéica dos cotilédones (TABELA 3). Boa parte deste aumento pode ser explicada pela mobilização de nitrogênio de outras partes da planta. Os maiores contribuintes são a fração ureídica do caule (35 μmol) e da vagem (35.5 μmol) e a fração protéica da vagem (24 μmol). Em menor grau contribuíram as frações de aminoácidos livres da vagem (9 μmol), caule (5.5 μmol) e cotilédones (5 μmol). Estes dados também sugerem que a fração ureídica é a mais rapidamente mobilizada e metabolizada, e a vagem a preferida fornecedora de N.

A adição de alantoína ao meio de cultivo, relacionada ao controle dia zero, resultou num aumento do N-protéico de 85.5 μmol nos caules e 267 μmol nos cotilédones. O N-amino aumentou 1.7 μmol nos tegumentos das sementes e decresceu 5.8 μmol nas vagens. O N-ureídeo aumentou em 56 μmol nos caules e 0.38 μmol nos tegumentos.

Embora as plantas de soja no experimento não fossem inoculadas e estivessem sendo irrigadas duas vezes por semana com uma solução nutritiva completa de HOAGLAND (HOAGLAND & ARNON, 1950), esperaríamos uma inibição da fixação simbiótica do nitrogênio. (OHYAMA & KAMAZAWA, 1979). A quantidade de ureídeos transportada deveria ser muito baixa. Entretanto, os teores de N-ureídeo nos caules e vagens dos "explants" no dia zero ou no controle

"in situ" foram bastante altas. Os resultados encontrados foram de 49.7 e 63 umoles para o caule e 37.9 e 28.9 umoles para as vagens, respectivamente. Estes teores são bem maiores daqueles obtidos por GOMES & SODEK (1984) para vagens de plantas de soja não noduladas, mas baixos em relação às plantas noduladas. Uma possível explicação para este fato pode ser devido à fixação simbiótica do nitrogênio, pois McCLURE & ISRAEL encontraram que plantas de soja não noduladas, crescendo sob KNO_3^- 20 mM apresentaram 6 % do N total como N-ureídeo.

Podemos estabelecer para o transporte e metabolismo dos ureídeos nos "explants" sob estudo uma analogia às plantas de soja crescendo em condições naturais, pois :

O processo de translocação em plantas de soja observado por OHYAMA & KAMAZAWA (1979), McCLURE & ISRAEL (1979), GOMES & SODEK (1984), se repete nos "explants" resultando em aumentos nos teores de N-protéico nos cotilédones.

Os acúmulos de N-ureídeos nos caules, verificados por SERRES et al (1985), STREETER (1979), WAREMBOURG & FERNANDES (1985), se repete aos caules dos "explants", embora parte dos teores de ureídeos encontrados pode ser devido aos que estão no sistema de transporte sob o sistema em estudo. Parte do N-ureídeo é transformado em N-protéico e se acumula nos caules do "explant" para posterior utilização, pois STREETER (1979) notou que o N-ureídeo dos caules e pecíolos foi consumido ou exportado durante a formação da semente.

Nas vagens, os ureídeos podem ser metabolizados, pois GOMES & SODEK (1984) observaram teores baixos dessas substâncias nestas partes do fruto de soja, quando do período de preenchimento das sementes. Os mesmos autores verificaram que a atividade de alantoinase foi máxima ($20 \text{ umol.vagem}^{-1}.\text{h}^{-1}$), quando as vagens apresentaram sua completa expansão. Nos "explants", como resultado desse metabolismo dos ureídeos foi o aumento na síntese de proteínas da vagem.

Nos tegumentos, existem evidências que os ureídeos são metabolizados nos tegumentos ou vagens, pois RAINBIRD et al (1984), mostraram que as principais substâncias nitrogenadas liberadas pelos tegumentos das sementes de soja foi a glutamina, chegando a atingir 52 % do nitrogênio total, seguida da asparagina 19 %. Os mesmos autores observaram que não ocorreu qualquer liberação de alantoína e ácido alantóico dos tegumentos das sementes para os cotilédones. Em relação aos tegumentos das sementes dos "explants" de soja, os dados não permitem chegar a uma conclusão definitiva quanto ao metabolismo dos ureídeos a qual chegaram os autores acima, pois os teores de ureídeos aumentaram quando da adição da alantoína ao meio de cultivo em relação ao controle dia zero ou ao controle "in situ".

Nos cotilédones, o N-amino ou N-amida (resultantes do metabolismo de ureídeos) que chegam são utilizados na biossíntese de proteínas de reserva. O sucesso deste experimento em relação à cultura de cotilédones isolados advém do fato que, na cultura de cotilédones a alantoína está em contato direto com estas partes

das sementes, enquanto que no sistema de "explant" a alantoína pode chegar como uma fonte diferente de N-ureídeo.

O aumento do N total (55.6 μmol de N) do tratamento sem nitrogênio em relação ao controle dia zero, pode ser explicado pela quantidade de nitrato que estava sendo translocado para os frutos e transformados em proteínas, durante a incubação do "explant", já que no experimento utilizando apenas nitrato como fonte nitrogenada houve um ganho real de 35.5 μmoles de N em relação ao controle sem nitrogênio. Além disto, pode ter ocorrido durante o experimento uma hidrólise parcial das bases púricas resultantes do metabolismo dos cotilédones, como proposto por FUJIHARA & YAMAGUCHI (1978).

Relativo à glutamina, verificou-se que esta fonte quando comparada ao controle sem nitrogênio apresentou aumentos nos teores de N-protéico de 52,8 μmoles nos caules e 142,5 μmoles nos cotilédones. Os teores de N-amino ou N-amida aumentaram em 41,7 μmoles nos caules, 1,4 μmoles nos tegumentos e 13,9 μmoles nos cotilédones. Ocorreram decréscimos nos teores de N-amino ou N-amidas de 2,8 μmoles nas vagens. O N-ureídeo aumentou nos caules e vagens de 10,45 μmoles e 8,55 μmoles , respectivamente.

O efeito da asparagina resultou em aumentos nos teores de N-protéico nos caules de 79.8 μmoles e de 167.7 μmoles nos cotilédones. O N-amino ou N-amida aumentou de 52.3 μmoles nos caules, 1.4 μmoles nos tegumentos e 3.2 μmoles nas vagens e 13.4 nos cotilédones. O N-ureídeo aumentou de 18.8 μmoles e 6.9 μmoles nos caules e vagens, respectivamente, em relação ao controle sem ni-

trogênio.

Como podemos verificar, o comportamento das amidas glutamina e asparagina foram praticamente idênticos.

Tentando verificar o comportamento dessas fontes nitrogenadas sobre os "explants" em relação às plantas crescendo sob regime de nitrato em condições normais, podemos estabelecer que :

Em plantas de soja não noduladas, a principal substância nitrogenada translocada pelo xilema é a asparagina (OHYAMA & KAMAZAWA, 1979). Isto também acontece nos "explants", pois ocorreu aumento do teor de aminoácidos e proteínas nos cotilédones quando a asparagina foi fornecida.

Nos caules de soja pode ocorrer acúmulo de asparagina, como verificado por SERRES et al (1985). Nos "explants", esta amida pode se acumular ou ser estocada sob a forma de N-protéico.

Nas vagens os teores de N-protéico não diferiram significativamente em relação ao controle dia zero. O N-amino ou N-amida decresceram 45 % em relação ao controle dia zero e o N-ureídeo decresceu 75 %. Para soja, GOMES & SODEK (1984) mostraram que os aminoácidos livres caíram a valores muito baixos durante o período de preenchimento das sementes.

Nos tegumentos, RAINBIRD et al (1984) têm demonstrado pela técnica do tegumento vazio, que boa parte da asparagina foi liberada pelo tegumento sem sofrer metabolização, o que está de acordo com GOMES & SODEK (1984), pois estes autores encontraram baixa atividade de asparaginase nos tegumentos das sementes de soja.

COKER & SCHAEFER (1985) têm ainda demonstrado que a atividade da sintetase do glutamato foi de 7 a 12 vezes maior do que a atividade desta enzima nos extratos cotiledonares, tomando por base o peso da matéria fresca. Portanto, o aumento do N-amino ou N-amida nas vagens podem ser explicados pela quantidade de asparagina que chega aos tegumentos e pelas transformações dessa amida em outros aminoácidos, que são então enviados aos cotilédones.

Nos cotilédones, a asparagina ou produtos de sua metabolização são então utilizados para a síntese de proteínas de reserva.

O sistema de cultura de cotilédones "in vitro" tem demonstrado que a glutamina e asparagina são fontes bastante eficientes de proteínas de reserva em soja (THOMPSON et al, 1977; HAGA & SODEK, 1987; TONIN, 1988). Isto também foi confirmado pelo sistema de "explants" desenvolvido neste trabalho.

Embora a glutamina não seja uma amida transportada naturalmente na soja, ela é uma fonte excelente para a síntese de proteínas de reserva em cotilédones isolados de soja (HAGA & SODEK, 1987; TONIN, 1988) ou para o sistema de "explant". Isto pode ser demonstrado pelo trabalho de RAINBIRD et al (1984), os quais encontraram pela técnica dos tegumentos vazios, que a principal substância nitrogenada liberada pelos tegumentos é a glutamina. Além disso, nos cotilédones a sintetase da glutamina e a L-glutamina (amida); oxoglutarato amida transferase (GOGAT) apresentaram altas atividades, quando na síntese de proteínas de reserva. As

observações dos autores acima citados, explicam o aumento de 295 % do N-protéico e de 90 % do N-amino ou N-amida nos cotilédones de soja.

Tanto a asparagina, quanto a glutamina têm um papel semelhante na nutrição nitrogenada de sementes de soja. Se a asparagina é translocada para os cotilédones, como observado por RAINBIRD et al (1984) ela é rapidamente metabolizada, pois GOMES & SODEK (1984) e TONIN (1988) demonstraram que as maiores atividades de asparaginase foram registradas durante o acúmulo de proteínas neste tecidos. A amônia liberada pela ação da asparaginase pode então ser utilizada pela sintetase da glutamina e L-glutamina (amida) : oxoglutarato amida transferase (GOGAT), como observado por TONIN(1988) em cultura de cotilédones de soja isolados. Assim o ácido glutâmico poderá ser utilizado como um precursor de vários aminoácidos e estes então serão responsáveis pelas proteínas de reserva nos cotilédones dos "explants".

6. CONCLUSÕES

Com relação aos dados obtidos neste sistema de cultura semi-asséptica de "explants" de soja podemos concluir que :

- Para assegurar um bom crescimento de sementes dos "explants" de soja não houve necessidade de adição ao meio de cultivo de vitaminas ou cofatores.
- Não houve queda na produção de matéria seca das sementes por um período de 8 dias de cultivo dos "explants", no sistema desenvolvido por este trabalho.
- A melhor composição de macronutrientes foi a mesma utilizada por CHANDLER et al (1983), para a cultura de "explants" de ervilha.
- Os caules, vagens e sementes não possuem reservas suficientes de macronutrientes para assegurar um ótimo crescimento dos cotilédones.
- As melhores concentrações de sacarose utilizadas para o estudo do preenchimento das sementes estão localizadas entre 33,3 mg/ml e 66,6 mg/ml do meio.
- O maior acúmulo de matéria seca nas sementes de soja, ocorreu quando a glutamina estava presente no meio, na concentração de 6,26 mg/ml.
- Os caules e vagens aparentemente não apresentam reservas de carboidratos, mas podem estocar substâncias nitrogenadas.

- Pode-se manter o meio de cultivo por um período de 7 dias, sem prejudicar o crescimento das sementes.
- A substância nitrogenada que mais reduziu ou inibiu a síntese de proteínas nos cotilédones de soja foi a amônia.
- As melhores fontes de nitrogênio para o processo da biossíntese de proteínas de reserva foram a glutamina, asparagina, ácido alantóico e alantoína.
- O ácido glutâmico parece ser um forte inibidor da utilização da glutamina nos cotilédones dos "explants" de soja.
- O aumento da matéria seca nas vagens, tegumentos e cotilédones no tratamento sem nitrogênio pode ser um reflexo da utilização da sacarose do meio de cultivo.
- Nos caules das plantas crescendo "in situ", o armazenamento do nitrogênio está abaixo de suas capacidades normais de estocagem.
- Os caules podem transformar parte do N-ureídeo em N-protéico e armazenar esta última substância nitrogenada, ou acumular as amidas glutamina e asparagina.
- Os ureídeos são metabolizados nas vagens, pois resultaram num aumento do N-protéico nesta parte do "explant", quando da adição da alantoína.
- A fração ureídica é rapidamente mobilizada e metabolizada e a vagem é a fornecedora preferencial de nitrogênio.
- Não foi detectada a presença de ureídeos nos cotilédones dos "explants", sugerindo que seu metabolismo ocorreu principalmente nas vagens.

- O sistema de "explant" desenvolvido por este trabalho está mais relacionado com as plantas de soja crescendo em casa-de-vegetação, do que a cultura de cotilédones imaturos isolados crescendo "in vitro".

7. RESUMO

No presente trabalho desenvolveu-se um sistema de "explant" que possibilitou verificar o transporte e o metabolismo de substâncias nitrogenadas, em caules, vagens, tegumentos das sementes e cotilédones das sementes de soja (*Glycine max* [L] Merrill) cv. Santa Rosa.

O "explant" utilizado continha apenas uma vagem completamente expandida com duas sementes (pesando em torno de 200 mg) um caule com cerca de 6 cm de comprimento e um pedaço de pecíolo remanescente. A base do caule era então mergulhada em frasco contendo um meio de cultura definido, pH 5.0, mantido a 20°C, em banho de gelo. As vagens permaneceram a uma temperatura de 25°C, sob luz contínua em uma câmara de germinação.

Nos testes para verificar as melhores condições do meio de cultivo que assegurassem melhores crescimentos das sementes verificou-se que :

Não houve necessidade da adição de cofatores ou vitaminas. A melhor composição de macronutrientes do meio foi a de CHANDLER et al (1983). As melhores concentrações de sacarose estão entre 33,3 e 66,6 mg/ml do meio e a de glutamina foi de 6,26 mg/ml. Os caules apresentaram pouca reserva de carboidratos, mas continham reservas de substâncias nitrogenadas. Não houve necessidade da substituição dos meios de cultivo durante o período de análise. As sementes apresentaram um crescimento linear até o 89

dia de duração experimental.

No estudo dos efeitos das fontes de nitrogênio, foi estabelecido que as melhores fontes nitrogenadas que asseguraram um bom armazenamento de proteínas de reserva nos cotilédones dos "explants" foram a glutamina, asparagina, alantoína e ácido alantóico, seguidos pela glicina. As piores fontes de nitrogênio foram o ácido aspártico, arginina, ácido glutâmico, nitrato e amônia.

Quanto aos teores de proteínas, aminoácidos livres e ureídeos, com base na matéria seca e relacionados ao tratamento sem nitrogênio em caules, vagens, tegumentos das sementes e cotilédones, podemos estabelecer que :

Os caules e cotilédones acumularam proteínas na presença de glutamina, asparagina e alantoína. O mesmo fato ocorreu nas vagens, apenas na presença de alantoína. Os teores de aminoácidos livres aumentaram nos caules dos "explants" na presença da glutamina e asparagina e decresceu na presença da alantoína. Na vagem não houve diferenças estatísticas significativas nos teores dessas substâncias nitrogenadas. Ocorreu aumento nos teores de aminoácidos livres nos tegumentos quando as três fontes foram adicionadas ao meio de cultivo. Nos cotilédones houve apenas uma tendência de aumento nestes teores com as mesmas fontes asparagina, glutamina e alantoína. Os teores de ureídeos só aumentaram significativamente nos caules, vagens e tegumentos na presença de alantoína, e não foram detectados nos cotilédones.

Após a conversão de proteínas, aminoácidos livres e ureídeos em umoles de N-protéico, N-amina ou N-amida e N-ureídeo, relacionados ao controle sem nitrogênio, notou-se que os teores de N-protéico aumentou nos caules, vagens e cotilédones dos "ex-plants" quando do tratamento com as amidas (glutamina e asparagina) e ureídeos (alantoína). Os teores de N-amino ou N-amida foram maiores nos caules, tegumentos e cotilédones nos tratamentos com glutamina e asparagina e nos tegumentos e cotilédones no tratamento com alantoína. Os teores de N-ureídeos tiveram aumentos nos caules, vagens e tegumentos na presença da alantoína no meio de cultivo, nos caules no tratamento com asparagina e nos tegumentos das sementes na presença de glutamina e asparagina.

Os resultados aqui apresentados, relativos ao transporte e metabolismo das substâncias nitrogenadas e acúmulo de proteínas de reserva em sementes de soja, aproximam-se mais da planta "in vivo" do que ao sistema de cultura de cotilédones imaturos "in vitro".

8. 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.; RITCHIE, A. & PEOPLES, M.B. 1982. Metabolism key translocation of allantoin in ureide-producing grain legumes. *Plant Phusiol.* 70 : 476 - 482.
- BARRAT, D.H.P. 1986. In vitro pod culture of Pisum sativum. *Plant Sci.* 43 : 223 - 228.
- BEEVERS, L. & STOREY, R. 1976. Glutamato syntetase in developing cotyledons of Pisum sativum. *Plant Physiol.* 57 : 862 - 866.
- BIELESKI, L.R. & TURNER, N.A. 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and cromatography. *Anal. Biochem.* 17 : 278 - 293.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248 - 251.

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

COKER, G.T. & SCHAEFER, J. 1985. ^{15}N and ^{13}C NMR determination of allantoin metabolism in developing soy bean cotyledons. *Plant Physiol.* 77 : 129 - 135.

DOBEREINER, J. 1985. Simpósio de Biotecnologia. In Barros, Pedro Motta. *Biotecnologia em São Paulo : Recomendações para uma Política*. ED. 1. Imprensa Oficial do Estado S.A. IMESP. São Paulo, pp. 75 - 80.

EGLI, D.B.; GUFFY, R.D.; MECKEL, L.W. & LEGGETT, J.E. 1985. The effect of source sink alterations on soybean seed growth. *An. Bot.* 55 : 395 - 402.

FADER, G.M. & KOLLER, H.R. 1985. Seed growth rate and carbohydrate pool sizes of the soybean fruit. *Plant Physiol.* 79 : 663 - 666.

FUJIHARA, S. & YAMAGUCHI, M. 1978. Effects of allapurinol (4-hydroxypyrozolo (3,4 - d) pyrimidine) on the metabolism of allantoin in soybean plants. *Plant Physiol.* 62 : 134 - 138.

GIFFORD, R.M. & THORNE, J.H. 1986. Phloem unloading in soybean seed coats : dynamics and stability of efflux into attached "empty ovules". *Plant Physiol.* **80** : 464 - 469.

GOMES, M.A.F. 1982. Metabolismo de ureídeos e asparagina durante a ontogenia do fruto de plantas de soja nodulados e não nodulados. Tese de Mestrado. Inst. de Biologia, UNICAMP, Campinas, S.P.

GOMES, M.A.F. & SODEK, L. 1984. Allantoinase and asparaginase activities in maturing fruits of nodulated and non-nodulated soybeans. *Physiol. Plant* **62** : 105 - 109.

HAGA, K.I. & SODEK, L. 1984. Utilization of nitrogen sources by immature soybean cotyledons in culture. *Ann. Bot.* **59** : 597 - 601.

HERRIDGE, D.F.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. & RAINBIRD, R.M. 1978. Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of the cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] WALP). *Plant Physiol.* **62** : 495 - 498.

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

- HSU, F.C.; BENNETT, A.B. & SPANSWICK, R.M. 1984. Concentrations of sucrose and nitrogenous compounds in the apoplast of developing soybean seed coats and embryos. *Plant Physiol.* 75 : 181 - 186.
- IRELAND, R.J. & JOY, K.W. 1981. Two routes for asparagine metabolism in Pisum sativum L. *Planta* 151 : 289 - 292.
- LAYZELL, D.B. & LA RUE, T.A. 1982. Modeling C and transport to developing soybean fruits. *Plant Physiol.* 70 : 1290 - 1298.
- LEA, P.J.; HUGHES, J.S. & MIFLIN, B.J. 1979. Glutamine and asparagine dependent protein synthesis in maturing legume cotyledons cultured "in vitro". *J. Exp. Bot.* 30 (116) : 529 - 537.
- LEWIS, O.A.M. & PATE, J.S. 1973. The significance of transpirationally derived nitrogen in protein synthesis in fruiting plants of pea (Pisum sativum L.). *J. Exp. Bot.* 24 (80) : 596 - 606.
- MATSUMOTO, T.; YAMAMOTO, M. & YATAZAWA, Y. 1976. Role of root nodules in the nitrogen nutrition of soybeans. II. Fluctuation in allantoin concentration of the bleeding sap. *J. Sci. Soil Manure.* 47 : 463 - 469.

- MATSUMOTO, T.; YATAZAWA, M. & YAMAMOTO, Y. 1977. Distribution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulating and non-nodulating soybean plants. *Plant & Cell Physiol.* 18 : 353 - 359.
- McCLURE, P.R. & ISRAEL, D.W. 1979. Transport of nitrogen in the xilem of soybean plants. *Plant Physiol.* 64 : 411 - 416.
- MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. 1977. Amino acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28 : 299 - 329.
- MILLERD, A.; SPENCER, D.; DUDMAN, W.F. & STILLER, M. 1975. Growth of immature pea cotyledons in culture. *Aust. J. Plant Physiol.* 2 : 51 - 59.
- MORI, T.E.S. & SODEK, L. 1983. Nitrogen economy of a single fruiting node of soybean. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd 111.S.29 - 38
- MORI, T.E.S.; MAGALHÃES, A.C.N. & SODEK, L. 1985. Assimilate movement between determined leaves and fruits of soybean Glycine max [L.] Merr.). *Revista Bras. Bot.* 8 : 87 - 91.
- MURRAY, D.R. 1980. Changes in activities of enzymes of nitrogen metabolism in seed coats and cotyledons during embryo development in pea seeds. *Plant Physiol.* 66 : 782 - 786.

- MURRAY, D.R. & CORDOVA-EDWARDS, M. 1984a. Amino acid and amide metabolism in the hulls and seeds of developing fruits of garden pea, Pisum sativum I. Glutamine. *New Phytol.* 97 : 243-252.
- MURRAY, D.R. & CORDOVA-EDWARDS, M. 1984b. Amino acid and amide metabolism in the hulls and seeds of developing fruits of garden pea, Pisum sativum II. Asparagine. *New Phytol.* 97 : 253-260.
- MURRAY, D.R. & KENNEDY, D.R. 1980. Changes in activities of Enzymes of nitrogen metabolism in seedcoats and cotyledons during development in pea seeds. *Plant Physiol.* 66 : 782 - 786.
- NELSON, D.R.; BELLVILLE, R.J. & PORTER, C.A. 1984. Role of nitrogen assimilation in seed development of soybean. *Plant Physiol.* 74 : 128 - 133.
- OBENDORF, R.L.; RYTKO, G.T. & BYRNE, M.C. 1983. Soya bean seed growth and maturation by in vitro pod culture. *Ann. Bot.* 51 : 217 - 227.
- OHYAMA, T. & KAMAZAWA, K. 1979. Assimilation and transport of nitrogenous compounds originated from $^{15}\text{N}_2$ fixation and $^{15}\text{NO}_3$ absorption. *Soil Sci Plant Nutr. (Tokyo)* 25 : 9 - 19.

- PATE, J.S. 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31 : 313 - 340.
- PATE, J.S.; SHARKEY, P.J. & ATKINS, C.A. 1977. Nutrition of a developing legume fruit (functional economy in terms of carbon nitrogen, water). *Plant Physiol.* 59 : 506 - 510.
- PEOPLES, M.B.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. & MURRAY, D.R. 1985a. Nitrogen nutrition and metabolic interconversions of nitrogenous solutes in developing cowpea fruits. *Plant Physiol.* 77 : 382 - 388.
- PEOPLES, M.B.; PATE, J.S. & ATKINS, C.A. 1985b. The effect of nitrogen in fruiting plants of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp). *J. Exp. Bot.* 36 (165) : 567 - 582.
- 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.
- SALADO-NAVARRO, L.R.; HINSON, K. & SINCLAIR, T.R. 1985. Nitrogen partitioning and dry matter allocation in soybeans with different seed protein concentration. *Crop. Sci.* 25 : 451 - 455

- SAWAZAKI, H.E. 1986. Efeito da fonte externa de nitrogênio no transporte de compostos nitrogenados em plantas de soja Glycine max [L.] Merril, cultivar Santa Rosa. Tese de Mestrado. Inst. de Biologia, UNICAMP, Campinas, S.P.
- SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. 1978. Nutrição Mineral. In J.C. CAREY ed. Plant Physiol. Ed. 2 Wadsworth Publishing Company, Inc. C. Belmont, pp. 79 - 82.
- SCHULLER, K.A.; DAY, D.A.; GIBSON, A.H. & GRESSHOFF 1986. Enzymes of ammonia assimilation and ureide biosynthesis in soybean nodules : effect of nitrate. Plant Physiol. 80 : 646 - 650.
- SERRES, E.; CALMÉS, J.; VIALA, G. & CAVALIÉ, G. 1985. Uréides et asparagine chez deux variétés de soja cultivées au champ : stockage dans la tige et utilisation. Agron. 5 (10) : 899 - 904.
- SKOKUT, T.A.; VARNER, J.E.; SCHAEFER, J.; STEJSKAL, E.O. & MCKAY, R.A. 1982a. [¹⁵N] NMR determination of asparagine and glutamine nitrogen utilization for synthesis of storage protein in developing cotyledons of soybean in culture. Plant Physiol. 69 308 - 313.

- SKOKUT, T.A.; VARNER, J.E.; SCHAEFER, J.; STEJSKAL, E.O. & MCKAY, R.A. 1982b. [¹⁵N] NMR determination of glycine for synthesis of storage protein in the presence of glutamine in developing cotyledons of soybean. *Plant Physiol.* 69 : 314 - 316.
- 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.
- STOREY, R. & REPORTER, M. 1978. Amino acid metabolism in developing soybeans (Glycine max) : glutamate synthase in the cotyledons. *Can. J. Bot.* 56 (11) : 1349 - 1356.
- STREETER, J.G. 1979. Allantoin and allantoic acid in tissue and stem exudate from field-grown soybean plants. *Plant Physiol.* 63 : 478 - 480.
- THOMAS, R.J.; FELLER, V. & ERISMANN, K.H. 1980. Ureide metabolism in non-nodulated Phaseolus vulgaris L. *J. Exp. Bot.* 31 : 409 - 417.

- THOMAS, R.J. & SCHRADER, L.E. 1981. The assimilation of ureides in shoot tissues of soybeans. 1. Changes in allantoinase activity and ureide contents of leaves and fruits. *Plant Physiol.* 67 : 973 - 976.
- THOMPSON, J.F., MADISON, J.T. & MUENSTER, A.M.E. 1977. "In vitro" culture of immature cotyledons of soya bean (*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 ^{14}C -Photosynthetase uptake by developing soybean fruit. *Plant Physiol.* 65 : 975 - 979.
- THORNE, J.H. 1982. Temperature and oxygen effects on ^{14}C -photosynthetase and accumulation in developing soybean seeds. *Plant Physiol.* 69 : 48 - 63.
- 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 : 0268 - 0271.
- TONIN, G.S. 1988. Influência da fonte de nitrogênio na atividade de enzimas envolvidas no processo de assimilação de amidas e ureídeos em cotilédones imaturos de soja mantidos em cultura

Tese de Doutorado Inst. de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP.

- TRIJBELS, F. & VOGELS, G.D. 1966. Degradation of allantoin by Pseudomonas acidovorans. Biochem. Biophys. Acta. 113 : 292 - 301.
- WAREMBOURG, F.R. & FERNANDES, M.P. 1985. Distribution and remobilization of symbiotically fixed nitrogen in soybean (Glycine max). Physiol. Plant. 65 : 281 - 286.
- WINKLER, R.G.; POLLACO, J.C.; BLEVINS, D.G. & RANDALL, D.D. 1985. Enzymic degradation of allantoate in developing soybeans. Plant Physiol. 79 : 787 - 793.
- WOLSWINKEL, P. & AMMERLAAN, A. 1983. Phloem unloading in developing seeds of Vicia faba L. Planta 158 : 205 - 215.
- YEMM, E.M. & COOKING, E.C. 1955. Estimation of amino acids by ninhydrin. Analyst 80 : 209 - 213.