

METABOLISMO DO NITROGÊNIO DURANTE A FASE DO DESENVOLVIMENTO
REPRODUTIVO DA SOJA

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

TEREZINHA ELIZABETH SOARES MORI

Orientador: LADASLAV SODEK

FEVEREIRO, CAMPINAS
1981

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais
Elim e Sérgio

dedico

AGRADECIMENTOS

A autora agradece a todos que colaboraram na realização deste trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek, pela orientação decisiva, nunca negando críticas ou apoio às minhas iniciativas.

Ao Prof. Dr. Antonio Celso Magalhães pelas sugestões oferecidas e incorporadas a este trabalho.

Ao Prof. Luiz Gonzaga Santoro, pela disponibilidade constante seja através de críticas, sugestões ou palavras de incentivo.

Aos meus pais
Elm e Sérgio
À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Clóvis de Almeida pela leitura crítica do texto.

À Sra. Clarice Diegues pelo trabalho de datilografia.

Ao Shozaburo, meu esposo, pelo incentivo constante a todas as minhas iniciativas profissionais.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUÇÃO	3
II. MATERIAIS E MÉTODOS	12
1. Cultivo das plantas	12
2. Avaliações fisiológicas	13
3. Avaliações bioquímicas	13
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
1. Alterações na relação sítio de produção - sítio de consumo em plantas de soja	20
2. Otimização da metodologia para a determinação da atividade das enzimas redutase de nitrato, glutamina sintetase e glutamato desidrogenase em folha, vagem e semente de soja	34
3. Medida do peso fresco e do conteúdo de clorofila, nitrogênio α -amino e da proteína em folha, vagem e semente, durante o desenvolvimento reprodutivo da planta	58
4. Medida das atividades da redutase de nitrato, glutamina sintetase e da glutamato desidrogenase em folha, vagem e em semente, durante o desenvolvimento reprodutivo da planta	65
5. Estimativa da quantidade de nitrogênio reduzido pelas reações catalizadas pelas enzimas redutase de nitrato, glutamina sintetase e glutamato desidrogenase	70

IV.	CONCLUSÕES	75
V.	RESUMO	76
VI.	SUMMARY	80
VII.	BIBLIOGRAFIA	84

I. INTRODUÇÃO

Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de obter o melhoramento das plantas cultivadas em termos de quantidade e qualidade de proteína da semente. Isto porque mais de 70% das proteínas utilizadas na nutrição do homem e dos animais são de origem vegetal (KAUL, 1973).

Entre todas as culturas importantes, a soja é a que apresenta a mais alta produtividade em proteína. Dados de LUSE e OKWURAIWE (1975) mostram uma produção de 9,1 kg de proteína por hectare por dia para a soja, comparada com 4,5 kg para Phaseolus lunatus, 2,7 kg para Vigna unguiculata, 1,9 kg para Oryza sativa e 1,6 kg para Zea mays.

A soja, entre outras leguminosas, é uma fonte de proteína vegetal rica no aminoácido essencial lisina. Isto é de muita importância porque a lisina é um aminoácido encontrado em pequenas quantidades nos alimentos (em especial nos cereais) consumidos pelo homem e pelos animais. Embora a soja não possua uma proteína perfeita, pois ela é deficiente nos aminoácidos que contêm enxofre (metionina e cisteína), ela complementa outros alimentos, principalmente os cereais. O efeito da interação da soja com milho, documentado por BRAY (1962) e CLAWSON et alii (1963), resultou num complexo de aminoácidos de excelente qualidade para a alimentação de animais.

A semente é o órgão das plantas cultivadas que apresenta maior concentração de proteína. As sementes maduras das leguminosas geralmente apresentam de 20 a 25%, podendo chegar, em certos casos, até 40 a 45% do seu peso seco como proteína. O acúmulo de proteína varia em torno de 1 a 4 mg por dia, num período aproximado equivalente a 25 a 35% do tempo necessário para a maturação das sementes de Pisum sativum (BEEVERS e POULSON, 1972; BASHA e BEEVERS, 1976), de Pisum arvense (FLINN e PATE, 1968), de Vicia faba (MILLERD et alii, 1971; WRIGHT e BOULTER, 1972) e de soja (HILL e BREINDENBACH, 1974).

Nessa fase de acúmulo rápido de proteína, as sementes necessitam de um grande suprimento de aminoácidos. Esses aminoácidos são fornecidos pelas raízes e folhas e transportados via xilema e floema para a vagem e, por último, para a semen-

te em desenvolvimento (PATE, 1971; LEWIS e PATE, 1973). A produção das sementes depende então, em grande parte, da eficiência com que os compostos nitrogenados são transferidos das partes vegetativas para os frutos em desenvolvimento.

Alguns trabalhos têm sugerido a importância da folha e da vagem como fornecedoras de nitrogênio e carbono para a síntese de aminoácidos e proteínas nas sementes.

LINCK e SUDIA (1962) mostraram que 90% do carbono exportado da folha de Pisum sativum foram incorporados pela vagem e pela semente do mesmo nó floral.

LEWIS e PATE (1973) verificaram a distribuição de ^{15}N na folha, vagem e semente de plantas de Pisum sativum em fase reprodutiva, através da incorporação de $^{15}\text{NO}_3$, ^{15}N - (amida) glutamina e ^{15}N -ácido glutâmico pelo caule. Para tanto, as plantas foram incubadas durante 10 horas com esses isótopos e em seguida mais 14 horas com os mesmos compostos não marcados. Comparando os dados da distribuição de ^{15}N nesses órgãos obtidos às 10 e 24 horas após o início da incorporação, os autores verificaram que 5% do ^{15}N absorvido inicialmente pelas partes vegetativas foram transportados para a semente em desenvolvimento e que o caule e as folhas foram os principais doadores.

Após a incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ na vagem de Datura stramonium, através da fotossíntese, LEWIS et alii (1971) verificaram que este órgão contribui com aminoácidos para a formação de proteínas nas sementes. Esta contribuição, no entanto, é relativamente pequena em comparação com a da folha adjacente ao fruto.

FLINN e PATE (1970), através da incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ aos folíolos, estípulas e vagens do 1º nó floral de Pisum arvense, pela fotossíntese, verificaram que a quantidade de carbono doada por esses órgãos para a semente foi, respectivamente, 174, 74 e 150 mg. Isso consistiu em 2/3 do carbono necessário para o desenvolvimento das sementes desse nó. Os autores verificaram também que, ao contrário da vagem, os folíolos e as estípulas fornecem carbono para outras partes da planta, além da semente.

A transferência de ^{14}C , incorporado como $^{14}\text{CO}_2$ pela fotossíntese, e de $^{15}\text{NO}_3$, aplicado ao sistema radicular de Pisum arvense, foi estudada por PATE e FLINN (1973). Esses autores

toplasma (RITENOUR et alii, 1967; SANTARIUS e STOCKING, 1969; DALLING et alii, 1972; WALLSGROVE et alii, 1979) e requer especificamente NADH como cofator (SCHRADER et alii, 1968; BEEVERS et alii, 1974). A redutase de nitrato é induzida pelo substrato (HAGEMAN e FLESHER, 1960) e a sua atividade nos tecidos é afetada por fatores ambientais e alterações verificadas no desenvolvimento da planta (MAGALHÃES, 1975).

O nitrito, produto da reação de redução do nitrato, é transformado em amônia através da ação da redutase de nitrito (BEEVERS e HAGEMAN, 1969). Ela está localizada no cloroplasto (DEL CAMPO et alii, 1966; RITENOUR et alii, 1967, WALLSGROVE et alii, 1979) e utiliza ferredoxina como doador de elétrons (DEL CAMPO et alii, 1966).

Durante muitos anos foi considerado que a principal via de assimilação de amônia ocorria através da aminação redutiva do α -ceto glutarato, catalizada pela glutamato desidrogenase, formando glutamato (MIFLIN e LEA, 1976). A reação ocorre nos cloroplastos (LEECH e KIRK, 1968; KRETOVICH et alii, 1970; TSUKAMOTO, 1970) e utiliza NAD(P)H como cofator (LEECH e KIRK, 1968; GIVAN et alii, 1970; LEA e THURMAN, 1972; MAGALHÃES et alii, 1976). A glutamato desidrogenase ocorre em muitos tecidos de plantas e foi purificada de raízes de ervilha (PALICH e JOY, 1973).

Trabalhos recentes mostram que a principal via de utilização de amônia em plantas superiores é a formação de glutamato pela ação combinada das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase (LEA e MIFLIN, 1974; LEWIS e PROBYN, 1978).

A presença da glutamina sintetase, responsável pela reação de síntese de glutamina a partir de glutamato e amônia nos cloroplastos, foi demonstrada por O'NEAL e JOY (1973a); GIVAN (1975) e HAYSTEAD (1973). Recentemente WALLSGROVE et alii, (1979) constataram que 60% da glutamina sintetase de células de folha de ervilha estão localizadas no cloroplasto e o restante no citoplasma.

A enzima glutamina sintetase foi purificada de folhas de ervilha por O'NEAL e JOY (1973b e 1974) e de nódulos de raízes de soja por MAC PARLAND et alii, (1976). Ela tem um baixo Km para amônia ($1,9 \times 10^{-5}M$) para a enzima de folha de ervilha (O'NEAL e JOY, 1973b), ao contrário da glutamato desi-

drogenase, cujo Km para amônia ($5,8 \times 10^{-3}M$) é maior que a concentração (2 mM) necessária para desacoplar a fotofosforilação no cloroplasto. Essa alta afinidade por amônia, apresentada pela glutamina sintetase, é que torna o sistema glutamina sintetase - glutamato sintase a principal via de assimilação de amônia.

LEA e MIFLIN (1974) demonstraram a presença da enzima glutamato sintase dependente de ferredoxina em cloroplasto de ervilha. Ela é capaz de transferir o grupo amido da glutamina para α -ceto glutarato, formando duas moléculas de glutamato.

A glutamato sintase foi purificada de folhas de Vicia faba por WALLSGROVE et alii, (1977), está localizada no cloroplasto (WALLSGROVE et alii, 1977, 1979) e possui alta afinidade por glutamina, α -ceto glutarato e ferredoxina.

A enzima asparagina sintetase, capaz de catalizar a transferência do grupo amido da glutamina para aspartato formando asparagina, foi purificada de folha de soja (STREETER, 1974), de Lupinus luteus (ROGNES, 1975), e de Lupinus albus (LEA e FOWDEN, 1975b).

O fornecimento de nitrogênio para as sementes depende inicialmente da redução e assimilação do nitrato absorvido pelas raízes e da fixação biológica do nitrogênio atmosférico, que ocorrem no início do ciclo de vida da planta.

Em geral, uma pequena quantidade do nitrato absorvido é reduzida na raiz e a maior parte é transportada via xilema, para a folha, onde ele é reduzido e incorporado em aminoácidos. O tipo e a quantidade relativa de compostos nitrogenados exportados pela raiz, decorrentes da redução do nitrato, variam de algum modo com a nutrição da planta. Entretanto, as duas amidas - glutamina e asparagina - são sempre dominantes no espectro de aminoácidos, juntas fornecendo 80 a 90% do nitrogênio exportado (PATE e WALLACE, 1964).

Os principais produtos da fixação biológica do nitrogênio, em leguminosas noduladas, são os ureídeos (alantoína e o ácido alantóico) e a amida asparagina.

Os ureídeos são compostos nitrogenados importantes numa grande variedade de plantas. Eles são encontrados nos órgãos vegetativos e reprodutivos de plantas noduladas de soja (MATSU MOTO et alii, 1977; STREETER, 1979), na seiva do xilema de

plantas noduladas de ervilha (PATE e WALLACE, 1964; PATE, 1971), de feijão (PATE, 1971) e de Vigna unguilata (HERRIDGE e PATE, 1977; HERRIDGE et alii, 1978). Em Vigna unguilata, os ureídeos alantoína e ácido alantóico representam a maior fração de nitrogênio solúvel durante o crescimento vegetativo e reprodutivo da planta.

WALLACE e PATE (1967) verificaram que as amidas são produtos orgânicos imediatos decorrentes da redução do nitrato e PATE et alii, (1975) mostraram que a biossíntese das amidas na folha de ervilha está relacionada com a redução do nitrato.

Através do fornecimento de $K^{15}NO_3$, ao xilema de folhas de Datura stramonium, LEWIS e BERRY (1975) mostraram uma transferência em massa de ^{15}N para glutamina, dependente da quantidade de nitrogênio incorporado.

Estudos cinéticos da incorporação de $^{15}NO_3$ em folhas de ervilha (BAUER et alii, 1977) mostraram que o grupo amida da glutamina possui a taxa mais alta de incorporação de amônia.

Estudos enzimáticos, realizados por LEA e FOWDEN (1975a) e ROGNES (1975), sugeriram que o grupo amida da glutamina é o doador preferencial que é transferido para o aspartato, para a síntese de asparagina.

A quantidade de nitrogênio produzido pela fixação biológica do nitrogênio e pela redução do nitrato na folha e na raiz, varia durante a ontogenia da planta.

Em feijão, a atividade da nitrogenase se evidencia antes do aumento da atividade da redutase de nitrato. A redutase de nitrato apresenta dois picos de atividade, um no início do crescimento vegetativo e outro na metade do período de enchimento da vagem. Isto mostra que o feijão absorve e reduz eficientemente o nitrato nos estágios de pós-floração (FRANCO et alii, 1979).

Em plantas de soja (noduladas), a atividade da redutase de nitrato inicia antes da atividade da nitrogenase. A redutase de nitrato atinge o pico no início do crescimento reprodutivo e depois declina continuamente (HARPER e HAGEMAN, 1972; THIBODEAUX e JAWORSKY, 1975).

Esses padrões de absorção e redução de nitrato e de fixação do nitrogênio atmosférico indicam que esses processos são eventos sucessivos, cada um contribuindo para a nutrição ni-

trogenada em estágios definidos durante o desenvolvimento da planta.

Vários trabalhos têm relatado a importância da glutamina e da asparagina no transporte de nitrogênio para a semente.

LEWIS e PATE (1973) utilizaram ^{15}N para estimar a contribuição relativa de diferentes compostos no transporte de nitrogênio da folha para o fruto de Datura stramonium e concluíram que a glutamina é o principal composto transportado. Com o estudo da incorporação de ^{15}N transportado na corrente transpiratória e de ^{14}C pela fotossíntese, no sistema folha-fruto de Datura, LEWIS (1975) indicou que a glutamina supre a semente com o nitrogênio reduzido que é necessário para a síntese de aminoácidos.

ARRUDA e SILVA (1979) analisando a seiva extraída do pedúnculo da espiga de milho, mostraram que a glutamina é o principal aminoácido transportado para o endosperma da semente.

Em Lupinus albus, ATKINS et alii, (1975) verificaram que 50 a 70% do nitrogênio transportado no sistema vascular que chega ao fruto encontram-se na forma de asparagina e STREETER (1972) mostrou que a asparagina é o principal componente do exudato do caule de soja. Em Pisum sativum (LEWIS e PATE, 1973), foi verificado que asparagina e glutamina compõem 58,7% do nitrogênio encontrado na seiva do floema que serve o fruto.

A semente, além de receber compostos nitrogenados que foram sintetizados pelas folhas e pelas raízes, pode receber também aminoácidos originados da hidrólise de proteínas que ocorre durante a senescência da folha. A observação de que a concentração de aminoácidos no floema aumenta durante a senescência da folha comprova este fato (HALL e BAKER, 1972; PATE et alii, 1974; VAN DIE e TAMMES, 1975).

PETERSON e HUFFAKER (1975); DALLING et alii (1977); FELLER et alii (1977) investigaram a função das proteases da folha na economia nitrogenada de cereais e estabeleceram uma estreita relação entre o decréscimo de proteína e o aumento da atividade de enzimas proteolíticas da folha. STOREY e BEEVERS (1977) observaram que aminoácidos livres não acumularam na folha e vagem senescentes quando ocorreu a degradação de proteí

na nesses órgãos.

STOREY e BEEVERS (1977), medindo a atividade proteolítica na folha e na vagem, durante o desenvolvimento de Pisum sativum, ressaltaram a importância das enzimas proteolíticas no fornecimento de aminoácidos para a síntese de proteínas no cotilédone em desenvolvimento. PATE e FLINN (1973), STOREY e BEEVERS (1977) verificaram que, mesmo durante o acúmulo de compostos nitrogenados, a folha de ervilha pode liberar o nitrogênio que foi assimilado no início do crescimento. Esta liberação de nitrogênio aumentou durante a senescência e os autores concluíram que a mobilização de reservas de nitrogênio, do local de produção, foi um processo contínuo que aumentou durante o desenvolvimento da semente.

Como foi visto, a corrente transportadora que fornece compostos nitrogenados para a semente em desenvolvimento é rica em glutamina e asparagina (LEWIS e PATE, 1973 e ATKINS et alii, 1975). A importância dessas amidas na nutrição nitrogenada da semente em desenvolvimento, é comprovada pela verificação de que asparagina e glutamina são utilizadas na síntese de proteína, em culturas in vitro de cotilédones de ervilha (MILLERD et alii, 1975) e de soja (THOMPSON et alii, 1977).

A proporção nitrogênio-amida : nitrogênio-amina na seiva é alta ($\approx 4:1$), o que sugere que os esqueletos de carbono são eficientemente utilizados na assimilação e transporte do nitrogênio, sendo a asparagina (2N:4C) a forma que proporciona maior economia no uso de carbono (MIFLIN e LEA, 1977).

Foi demonstrado que a corrente transportadora que fornece aminoácidos para os cotilédones não contém o espectro de aminoácidos necessários para a síntese de proteína na semente. Eles devem ser fornecidos pela síntese de novos aminoácidos, utilizando carbono e nitrogênio importados pela semente, como mostrado por LEWIS e PATE (1973); PATE et alii, (1974).

LEWIS e PATE (1973), ATKINS et alii, (1975), LEWIS (1975) utilizando asparagina e glutamina marcadas com ^{15}N no grupo amida, mostraram que o isótopo foi transferido para o grupo α -amino de muitos aminoácidos, indicando, assim, que na semente ocorre uma síntese de novo de aminoácidos.

A presença de enzimas que podem degradar a glutamina, como a glutamato sintase, em sementes imaturas de ervilha

(STOREY e BEEVERS, 1976) e milho (SODEK e SILVA, 1977), e de uma asparaginase, capaz de degradar asparagina, em sementes de Lupinus (LEA et alii, 1978) e de ervilha (SODEK et alii, 1980), indica a maneira como podem ser utilizadas estas fontes de nitrogênio.

A grande contribuição das folhas para a síntese de proteína na semente evidencia a importância da associação folha-semente no metabolismo de nitrogênio da planta durante a fase reprodutiva: a primeira, como produtora de nitrogênio orgânico e a segunda, como sítio de consumo deste nitrogênio.

Com referência às leguminosas, o sistema folha-semente é complicado pela presença dos tecidos que formam as vagens. Existem algumas evidências da importância da vagem no fornecimento de carbono para as sementes, mas pouco se conhece sobre o fornecimento de nitrogênio.

A falta de referência na literatura científica com respeito ao sistema folha-vagem-semente, especialmente com relação à contribuição da vagem no fornecimento de nitrogênio reduzido para as sementes, levou à realização deste trabalho que tem por objetivos:

1. Determinar a capacidade da vagem para assimilar o nitrato fornecido à planta, através das raízes, após a ântese.
2. Estimar a contribuição da folha e da vagem no fornecimento de nitrogênio reduzido para ser utilizado na síntese de aminoácidos e proteínas na semente.

Essas avaliações foram feitas através de estudos das enzimas envolvidas na redução e assimilação de nitrogênio, durante a fase reprodutiva da planta de soja.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Cultivo das plantas

Sementes de soja, (Glycine max (L.) Merrill), variedade Santa Rosa, obtidas na Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas - São Paulo, foram colocadas para germinar em potes de plástico, com capacidade para 3 litros, contendo areia lavada. Foi verificado que esse volume não é limitante para o crescimento das raízes da planta. Após o plantio, os potes foram colocados em ambiente natural, e as plantas, em número de duas por recipiente, foram regadas diariamente com solução nutritiva normal de Hoagland. Ao atingirem o estágio cotiledonar (10 dias de idade), as plantas foram transferidas para câmara de crescimento com ambiente controlado Conviron EF-7H. As condições de crescimento da câmara foram: fotoperíodo de 9 horas, radiação luminosa incidente de $0,18 \text{ cal cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ e iluminância de 15.000 lux ao nível das folhas das plantas. A umidade relativa oscilou entre 40 e 50% e a temperatura máxima foi de 27°C e a mínima de 22°C dia e noite, respectivamente.

O fotoperíodo curto (9 horas) foi utilizado para induzir a floração da planta. Foi determinado, em testes preliminares, que a exposição da planta, no estágio cotiledonar, a 7 fotoperíodos curtos, ocasiona o aparecimento de flores quando ela atinge o estágio de 7 folhas trifolioladas (30 dias após o plantio). Isto permite obter plantas de pequeno porte e bastante uniformes que podem ser mantidas em câmara de crescimento até o final da fase reprodutiva.

Após a indução da floração, as plantas utilizadas nas análises bioquímicas permaneceram na câmara de crescimento sob fotoperíodo de 14 horas e as plantas utilizadas nas determinações fisiológicas foram transferidas para a casa de vegetação.

2. Avaliações fisiológicas

As avaliações fisiológicas, como o comprimento da vagem, e o peso seco da semente, foram realizadas durante o desenvolvimento pós-floração com o intuito de verificar o padrão de distribuição de metabolitos através das várias estruturas vegetativas e reprodutivas da planta. Para essa averiguação foi feita a remoção de diferentes folhas e/ou frutos da planta na floração, considerando como floração o estágio onde a maioria das flores se encontra aberta.

Como a variedade Santa Rosa é uma soja de crescimento determinado, o crescimento vegetativo cessou com o início do desenvolvimento reprodutivo. Para facilitar este estudo, foram retiradas as folhas presentes no 1º, 2º, 3º, 4º e 9º nós no início da floração, e seus respectivos frutos, de todas as plantas. Com a finalidade de confinar a amostragem apenas ao caule principal, foram removidos os ramos laterais assim que estes surgiram.

A avaliação quantitativa das alterações provocadas nos vários tratamentos foi feita tomando-se medidas semanais do comprimento das vagens de cada nó, até 30 dias após a floração. No final do estágio de maturação dos frutos, as estruturas reprodutivas foram destacadas da planta e as sementes foram colocadas para secar em estufa a 60°C, durante 24 horas. Este experimento consistiu em 28 combinações da remoção de diferentes folhas e/ou frutos da planta. Todas as combinações foram feitas 3 vezes, em épocas diferentes de plantio, com uma planta por tratamento. O resultado foi a média dos 3 experimentos e expresso em termos da somatória do comprimento das vagens e da somatória do peso seco de sementes de cada nó. A somatória foi utilizada porque mostra melhor a produção de um determinado nó do que os dados expressos por unidades de vagem ou semente.

3. Avaliações bioquímicas

As análises bioquímicas realizadas para averiguar o comportamento das enzimas da assimilação do nitrogênio duran-

te a fase reprodutiva da planta foram feitas periodicamente, de 3 em 3 dias. A sétima folha trifoliolada e as vagens e sementes desse nó foram utilizadas neste estudo, sendo que esse nó apresenta, em média, 4 vagens e cada vagem, 2 sementes. Os tecidos folha, vagem e semente, utilizados nas determinações enzimáticas, foram coletados 5 horas após o início do período de luz na câmara de crescimento. Esse tempo de iluminação é necessário para se obter a máxima indução da atividade da enzima redutase de nitrato (NICHOLAS *et alii*, 1976a, 1976b).

Após a coleta, os tecidos foram lavados, enxugados e, depois da pesagem, foram utilizados para as determinações bioquímicas.

3.1. Determinação in vivo da atividade da redutase de nitrato

O método para estimar a atividade da redutase de nitrato in vivo foi descrito por HAGEMAN e HUCKLESBY (1971). Ele consiste em infiltrar o tecido com uma solução contendo nitrato e na subsequente dosagem do nitrito produzido na reação, que se difunde para o meio de incubação.

O tecido foi cortado em pedaços de aproximadamente 5 x 5 mm e 0,5 g foi colocado em recipientes de vidro de 30 mm de diâmetro por 60 mm de altura, contendo meio de in filtração na proporção 1:10 (p/v). O meio de infiltração con sistiu de 0,1 M de tampão fosfato pH 7,5, 1% de n-propanol e 0,1 M de nitrato de potássio. Foi introduzido no frasco um suporte plástico revestido com tela de nylon para manter os pedaços de tecido submersos na solução. A seguir, os frascos foram colocados sob vácuo de aproximadamente 5 mm de mercúrio. Decorridos 30 segundos, o ar foi rapidamente reintroduzido e este procedimento repetido. Após a liberação do vácuo, os frascos foram incubados em banho-maria à 30°C e man tidos sob agitação constante. Durante a reação, os frascos foram mantidos no escuro para evitar a utilização do nitrito formado na reação catalizada pela enzima redutase de nitrito.

Em intervalos de tempo de 15 e 45 minutos, foi removida uma alíquota de 0,2 ml do meio de reação e colocada

num tubo contendo 1,8 ml de água, 1,0 ml de 1% (p/v) de sulfanilamida em HCL 1N e 1,0 ml de 0,01% (p/v) de N-(1-naftil) etilenodiamino dicloreto, para a determinação colorimétrica do nitrito. A leitura foi realizada à 540 nm e a quantidade de nitrito foi calculada utilizando-se uma reta padrão na faixa de concentração de 10^{-2} à 10^{-1} μmol de NO_2 .

3.2. Determinação in vitro da atividade da redutase de nitrato

A atividade da redutase de nitrato in vitro foi determinada segundo o método descrito por HAGEMAN e HUCKLESBY (1971). A enzima foi extraída do tecido e incubada com o substrato nitrato e o cofator NADH, dosando-se o nitrito formado que é o produto da reação.



O método de ensaio consistiu de uma modificação de MAGALHÃES (1973), da técnica descrita por WELLS, (1971).

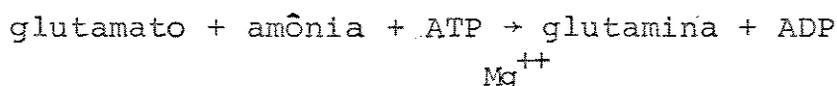
O tecido foi homogeneizado em meio de extração na proporção de 1:6 (p/v), à temperatura de 0 a 4°C, em banho de gelo. O meio de extração consistiu de 25 mM de tampão fosfato, pH 7,8, 5 mM de EDTA, 10 mM de L-cisteína na forma de hidrocloreto e 3% (p/v) de caseína. O extrato foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos a 0°C. A seguir, uma alíquota de 0,2 ml do sobrenadante foi incubada no meio de reação contendo 125 mM de tampão fosfato, pH 7,8, 10 mM de nitrato de potássio e 0,2 mM de NADH e o volume final foi de 2,0 ml. Os tubos de reação permaneceram em banho-maria a 30°C, durante 30 minutos.

A reação foi interrompida pela adição de 1,0 ml de 1% (p/v) de sulfanilamida em HCL 1N e 1,0 ml de 0,01% (p/v) de N-(1-naftil) etilenodiamino dicloreto. As amostras foram deixadas em repouso durante 30 minutos para a estabilização da cor e, em seguida, centrifugadas a 2.500 x g. A densidade ótica do sobrenadante foi lida a 540 nm e a quantidade de nitrito foi calculada utilizando-se uma reta padrão na fai

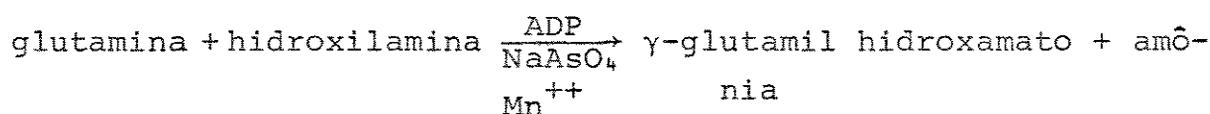
xa de concentração de 10^{-2} a 10^{-1} μmol de nitrito.

3.3. Determinação da atividade da glutamina sintetase

Para avaliar a atividade da glutamina sintetase foi utilizado o método descrito por RHODES *et alii* (1975). A atividade pode ser medida pela reação sintetase dosando-se a formação de γ -glutamil hidroxamato a partir de glutamato e hidroxilamina (que substitui amônia), de acordo com a reação:



A reação transferase, que é o inverso da reação sintetase, é outro modo pelo qual pode ser avaliada a glutamina sintetase. Nesta reação, a enzima é incubada com glutamina e hidroxilamina, dosando-se a formação de γ -glutamil hidroxamato:



O tecido foi homogeneizado em meio de extração na proporção 1:10 (p/v), à temperatura de 0 a 4°C, em banho de gelo. O meio de extração consistiu de 0,05 M de tampão tris, pH 7,2, 0,5 mM de EDTA, 1,0 mM de ditioneitol e 0,1% de Triton X-100. O extrato foi centrifugado a 10.000 x g durante 15 minutos, a 0°C. O sobrenadante obtido foi dessalinizado, utilizando-se uma coluna de Sephadex G-25 (1,5 x 13,6 cm) equilibrada com o mesmo tampão utilizado para a extração da enzima, não contendo Triton X-100.

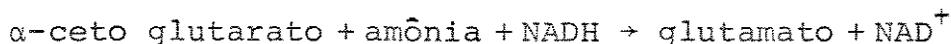
O meio de reação utilizado para avaliar a atividade da enzima pela reação sintetase foi 192 mM de glutamato, 6 mM de hidroxilamina, 45 mM de MgCl_2 , 18 mM de ATP e 50 mM de tampão tris pH 7,2. Para a reação transferase foi utilizado meio de reação contendo 65 mM de glutamina, 17 mM de hidroxilamina, 33 mM de arseniato de sódio, 2,5 mM de CaCl_2 ,

0,17 mM de ADP e 100 mM de tampão tris, pH 6,4.

Os tubos de reação foram colocados em banho-maria, a 32°C, e a reação foi iniciada com a adição da enzima, sendo o volume final de 2,0 ml. Para parar a reação foram utilizados 1,5 ml do reagente de FERGUSON e SIMS (1971), contendo 0,67 N de HCl, 0,20 M de ácido tricloroacético e 0,37 M de FeCl₃. Decorridos os 30 minutos para a estabilização da cor, as amostras foram centrifugadas a 2.500 x g para a remoção de proteínas. A quantidade de γ -glutamil hidroxamato foi determinada colorimetricamente a 535 nm, considerando que 1 μ Mol desse produto dá uma leitura de 0,34 de densidade ótica.

3.4. Determinação da atividade da glutamato desidrogenase

A atividade da glutamato desidrogenase foi determinada pelo método desenvolvido por MIFLIN (1974). Este método envolve a determinação do NADH oxidado pela enzima, dependente de amônia e α -ceto glutarato, de acordo com a reação:



O tecido foi homogeneizado em meio de extração na proporção 1:10 (p/v), à temperatura de 0 a 4°C, em banho de gelo. A enzima foi extraída em 0,05 mM de tampão tris pH 7,2, 0,5 mM de EDTA, 10 mM de ditiotreitol e 0,1% de Triton X-100. O extrato foi centrifugado a 10.000 x g durante 15 minutos, a 0°C. Uma alíquota de 2,0 ml do sobrenadante foi aplicada a uma coluna de Sephadex G-25 de (1,5 x 13,6) cm, equilibrada com o mesmo tampão utilizado para a extração da enzima, não contendo Triton X-100. A fração proteica (4,0 ml) foi coletada e uma alíquota foi colocada no meio de reação.

O meio de reação para medir a atividade enzimática consistiu de 1 mM de CaCl₂, 10 mM de (NH₄)₂SO₄, 10 mM de α -ceto glutarato, 0,1 mM de NADH, 50 mM de tampão tris pH 8,2, num volume final de 1,0 ml. A reação foi realizada em cubetas que permaneceram em banho-maria a 30°C. Em intervalos de

tempo, foram realizadas leituras em espectrocolorímetro a 340 nm. A atividade foi determinada pela taxa de oxidação de NADH e foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção $E_{mM}^{340} = 6,22$.

3.5. Determinação de α -amino nitrogênio e de proteína

Para determinar a quantidade de α -amino nitrogênio e proteína o material vegetal foi homogeneizado em liquidificador com metanol, clorofórmio e água na proporção (12:5:3 v/v/v) segundo as recomendações de BIELESKI e TURNER (1966), com exceção da semente, cujo meio extrator foi etanol a 80%.

Após a centrifugação a 2.500 x g, o sobrenadante foi separado em fase aquosa e clorofórmica. Uma alíquota da fase aquosa foi utilizada para avaliar a quantidade de α -amino nitrogênio, segundo o método de YEMM e COCKING (1955). A reta padrão de α -amino nitrogênio foi feita utilizando-se concentrações de 0,01 a 0,2 μ mol de leucina.

O precipitado foi utilizado para a dosagem de proteína pelo método do biureto (GORNALL et alii, 1949).

Como o precipitado do extrato de vagem apresentou lipídios, foi necessário lavá-lo em acetona. Em semente, após a extração em etanol 80%, foram realizadas lavagens sucessivas em álcool absoluto, hexano, álcool absoluto e, finalmente, a proteína foi extraída em NaOH 0,2%. A extração foi feita 3 vezes e ao volume final foi adicionada igual quantidade de ácido tricloroacético a 10%. Após 12 horas no gelo para precipitar a proteína, esse extrato foi centrifugado a 2.500 x g, por 15 minutos.

A extração de proteína para verificar a atividade específica da enzima foi feita utilizando-se 1 a 2 ml do extrato enzimático. A esse extrato foi adicionada igual quantidade de ácido tricloroacético a 10%. Após centrifugação, o precipitado foi levantado em NaOH 0,2%.

A quantidade de proteína existente nas extrações foi determinada utilizando-se uma reta padrão na faixa

de concentração de 1 a 10 mg de proteína. A leitura foi feita em espectrocolorímetro a 540 nm.

3.6. Determinação da clorofila

O material vegetal foi homogeneizado em acetona a 80% no almofariz. O extrato foi centrifugado a 1.500 xg e após a diluição necessária, a leitura foi realizada em espectrocolorímetro a 645 e 663 nm. Para os cálculos foi empregada a equação determinada por ARNON (1949):

$$\text{Clorofila total (mg/l)} = 20,2A_{645} + 8,02A_{663}$$

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Alterações na relação sítio de produção - sítio de consumo em plantas de soja.

Com o intuito de escolher o sistema folha-vagem-semente mais adequado para as determinações bioquímicas referentes à participação relativa desses órgãos no metabolismo do nitrogênio durante a fase reprodutiva da soja, foi realizado um experimento para verificar a contribuição de cada folha para o desenvolvimento das vagens e sementes inseridas no nó adjacente e nos nós localizados acima ou abaixo no caule. Isso foi feito através da remoção de diferentes folhas e/ou frutos da planta no início da floração.

Para facilitar o estudo, apenas os órgãos (folha, vagens e sementes) situados no 5º, 6º, 7º e 8º nós foram mantidos, os órgãos situados no 1º, 2º, 3º, 4º e 9º nós foram removidos da planta no início da floração.

As figuras 1 a 7 mostram os resultados obtidos de 28 diferentes combinações. Para facilitar a apresentação dos resultados, as combinações referentes a nutrição de determinados frutos foram agrupadas e sempre discutidas com referência a planta controle.

Para verificar a validade das respostas apresentadas pelas plantas tratadas, foi feito um estudo estatístico dos dados. Para isso foram utilizados 99,5% de limite de confiança e, com o teste-t foi verificado se as médias da planta tratada são significativamente diferentes das médias apresentadas pela planta controle.

1.1. Planta controle

1.1.1. O controle, planta 1 (página 22), que permaneceu com todas as folhas e vagens, apresentou 10,20, 13,70, 14,50 e 17,20 cm de soma do comprimento das vagens localizadas no 5º, 6º, 7º e 8º nós, respectivamente (figura 1A). A soma do peso seco das sementes maduras contidas nas

vagens desses nós foi 0,58, 0,60, 0,62 e 0,90 g, respectivamente (figura 1B).

- 1.2. Nutrição dos frutos do 7º e 8º nós: importância das folhas adjacentes (7º e 8º) e das folhas inferiores (5º e 6º) para a nutrição dos frutos do 7º e 8º nós.

As figuras 1A e 1B (página 22) mostram os resultados das alterações provocadas nas plantas 2, 3, 4 e 5.

1.2.1. A remoção das folhas e frutos do 5º e 6º nós não provocou uma alteração significativa no comprimento das vagens e no peso das sementes do 7º e 8º nós (planta 2).

1.2.2. A ausência da folha do 7º e do 8º nós e dos frutos do 5º e 6º nós (planta 3) acarretou uma diminuição no crescimento das vagens do 7º e 8º nós e no peso seco das sementes do 8º nó. A diferença em peso seco apresentada pelas sementes do 7º nó não foi significativa.

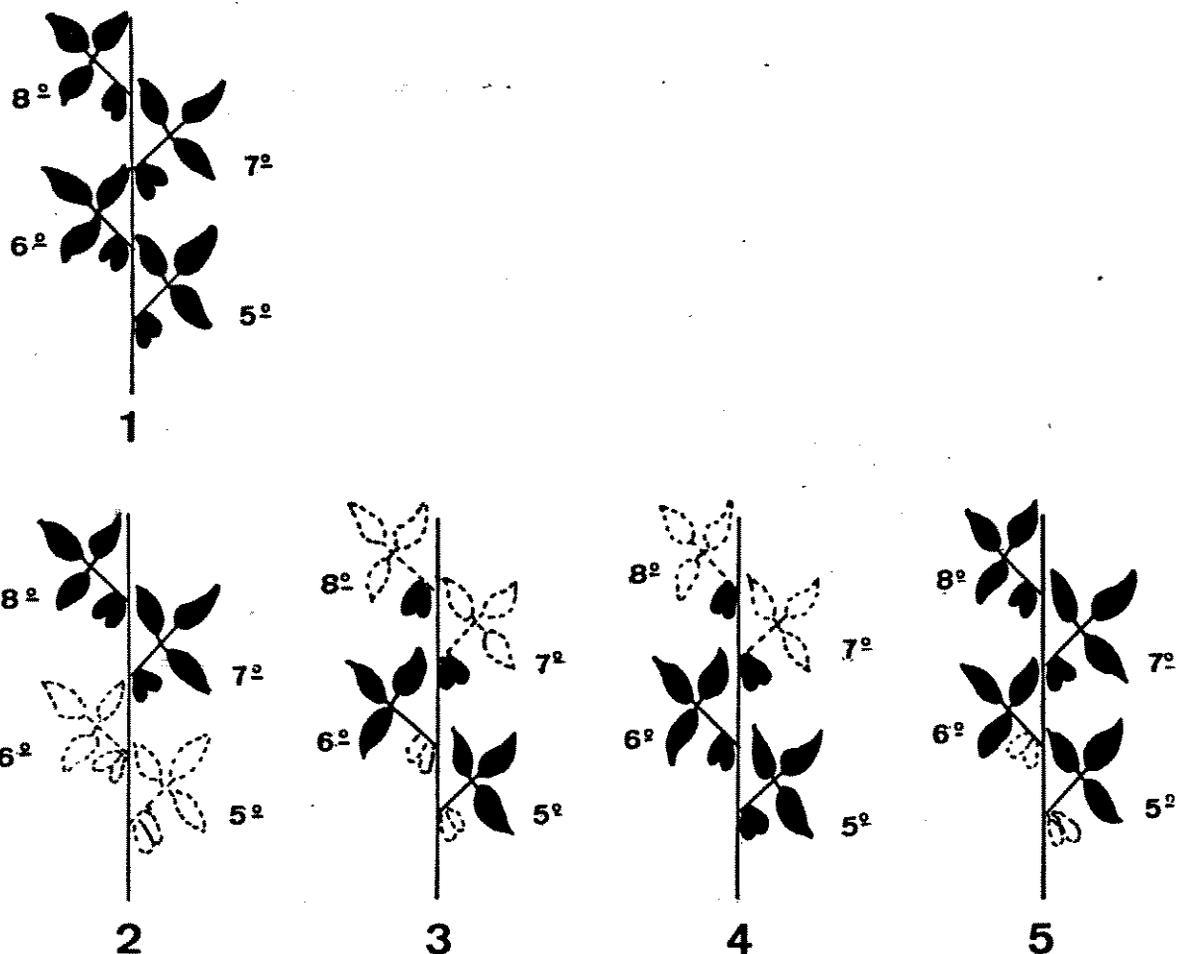
1.2.3. A planta 4, sem a folha do 7º e 8º nós (superiores), mostrou uma diminuição no crescimento das vagens do 5º, 6º, 7º e 8º nós e uma diminuição no peso seco das sementes do 5º, 7º e 8º nós. A diminuição apresentada pelo peso seco da semente do 6º nó não foi significativa.

1.2.4. A remoção dos frutos do 5º e 6º nós (inferiores) da planta 5 ocasionou apenas o aumento do crescimento das vagens do 7º nó. As alterações mostradas pelas vagens do 8º nó e pelas sementes do 7º e 8º nós não foram significativas.

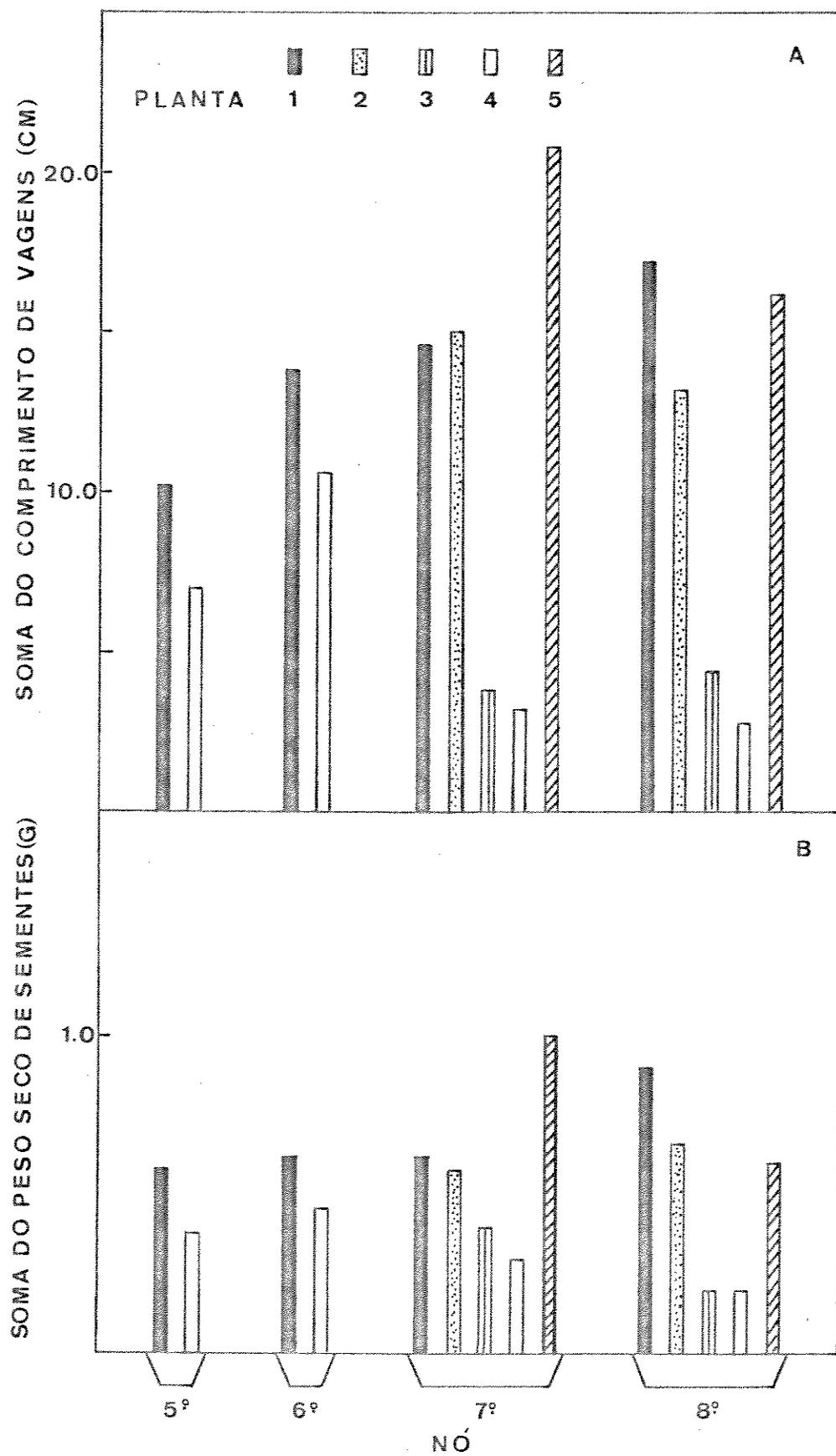
Estes dados sugerem que as folhas do 5º e 6º nós podem contribuir com metabolitos para o desenvolvimento das sementes do 7º nó, mas contribuem muito pouco para o desenvolvimento dos frutos do 8º nó.

FIGURA 1A - Soma do comprimento máximo atingido pelas vagens dos nós 5º, 6º, 7º e 8º das plantas 1, 2, 3, 4 e 5.

FIGURA 1B - Soma do peso seco das sementes maduras contidas nas vagens localizadas no 5º, 6º, 7º e 8º nós das plantas 1, 2, 3, 4 e 5.



Esquema das plantas 1, 2, 3, 4 e 5 - As folhas e vagens esquematzadas em linhas pontilhadas indicam que estes órgãos foram removidos da planta.



- 1.3. Nutrição dos frutos do 5º e 6º nós: importância das folhas adjacentes (5º e 6º) e das folhas superiores (7º e 8º) para a nutrição dos frutos do 5º e 6º nós.

As figuras 2A e 2B (página 24) mostram as alterações provocadas nas plantas 6, 7, 8 e 9.

1.3.1. A remoção da folha e frutos do 7º e 8º nós (planta 6) provocou uma diminuição no crescimento das vagens do 6º nó. As alterações sofridas pelas vagens do 5º nó e pelas sementes do 5º e 6º nós não foram significativas.

1.3.2. A ausência da folha do 5º e 6º nós ocasionou apenas alteração significativa na diminuição do peso seco da semente do 5º nó (planta 7).

1.3.3. A remoção dos frutos do 7º e 8º nós (planta 8) provocou um aumento no crescimento das vagens do 5º e 6º nós e no peso seco das sementes do 5º nó.

1.3.4. A planta 9, sem as folhas do 5º e 6º nós e os frutos do 7º e 8º nós, mostrou um aumento no crescimento das vagens do 5º nó e no peso seco das sementes do 5º e 6º nós.

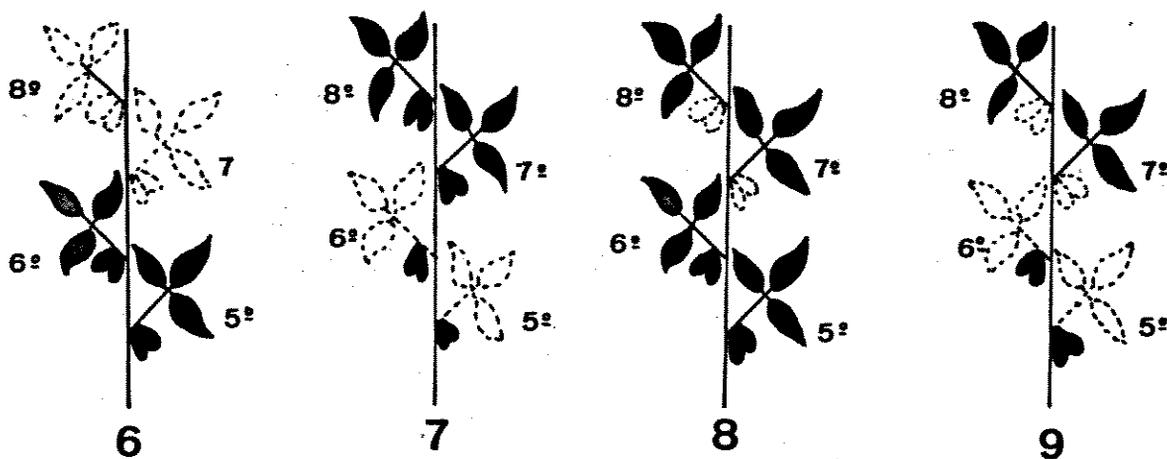
Estes resultados mostraram que as folhas do 7º e 8º nós podem fornecer metabolitos para o desenvolvimento das vagens e sementes do 5º e 6º nós. A comparação da planta 6 com a 9 evidencia que as folhas superiores são mais eficientes no fornecimento de metabolitos para os frutos do 5º e 6º nós do que as folhas adjacentes a estes frutos.

- 1.4. Nutrição dos frutos do 5º e 7º nós: importância das folhas localizadas no 6º e 8º nós e das folhas adjacentes (5º e 7º).

Para essa averiguação foram realizadas alterações nas plantas 10, 11, 12 e 13 (figuras 3A e 3B, página 26).

FIGURA 2A - Soma do comprimento máximo atingido pelas vagens presentes em cada nó das plantas 1, 6, 7, 8 e 9.

FIGURA 2B - Soma do peso seco das sementes maduras contidas nas vagens localizadas no 5º, 6º, 7º e 8º nós das plantas 1, 6, 7, 8 e 9.



Esquema das plantas 6, 7, 8 e 9 - As folhas e vagens esquematizadas em linha pontilhada indicam que estes órgãos foram retirados das plantas.

1.4.1. A ausência da folha e dos frutos do 6º e 8º nós (planta 10) não ocasionou alteração significativa no crescimento das vagens e no peso seco das sementes do 5º e 7º nós.

1.4.2. A remoção da folha do 5º e 7º nós e dos frutos do 6º e 8º nós, planta 11, resultou na diminuição do crescimento das vagens do 5º e 7º nós e no peso seco das sementes do 5º nó. A alteração do peso seco das sementes do 7º nó não foi significativa.

1.4.3. Quando foram removidos apenas os frutos do 6º e 8º nós (planta 12), ocorreu um aumento no crescimento das vagens e do peso seco das sementes do 5º e 7º nós.

1.4.4. A planta 13, sem a folha do 5º e 7º nós, mostrou uma diminuição no crescimento das vagens do 5º, 7º e 8º nós e no peso seco das sementes do 5º nó.

Estas combinações mostraram que as folhas do 6º e 8º nós contribuíram para a nutrição dos frutos do 5º e 7º nós com menor eficiência do que as folhas adjacentes a estes frutos (planta 10 e 11). Elas mostraram também que as folhas do 6º e 8º nós podem contribuir com nutrientes para os frutos do 5º e 7º nós quando seus frutos foram removidos.

1.5. Nutrição dos frutos do 6º e 8º nós: contribuição das folhas do 5º e 7º nós e das folhas adjacentes (6º e 8º).

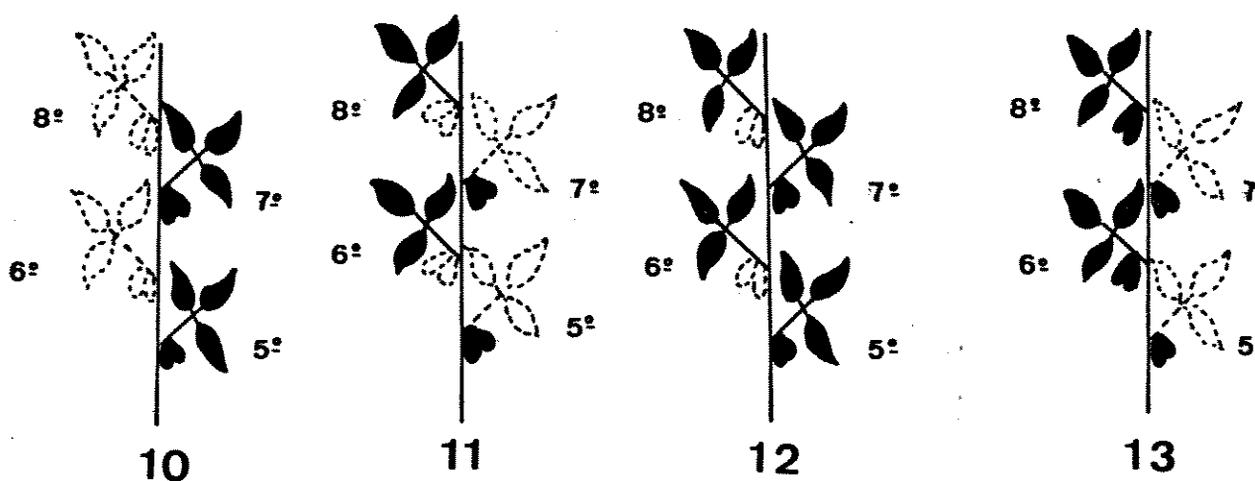
As figuras 4A e 4B (página 28) mostram o resultado das alterações provocadas nas plantas 14, 15, 16 e 17.

1.5.1. A planta 14, sem a folha e os frutos do 5º e 7º nós, não apresentou alteração significativa no crescimento das vagens e no peso seco das sementes do 6º e 8º nós.

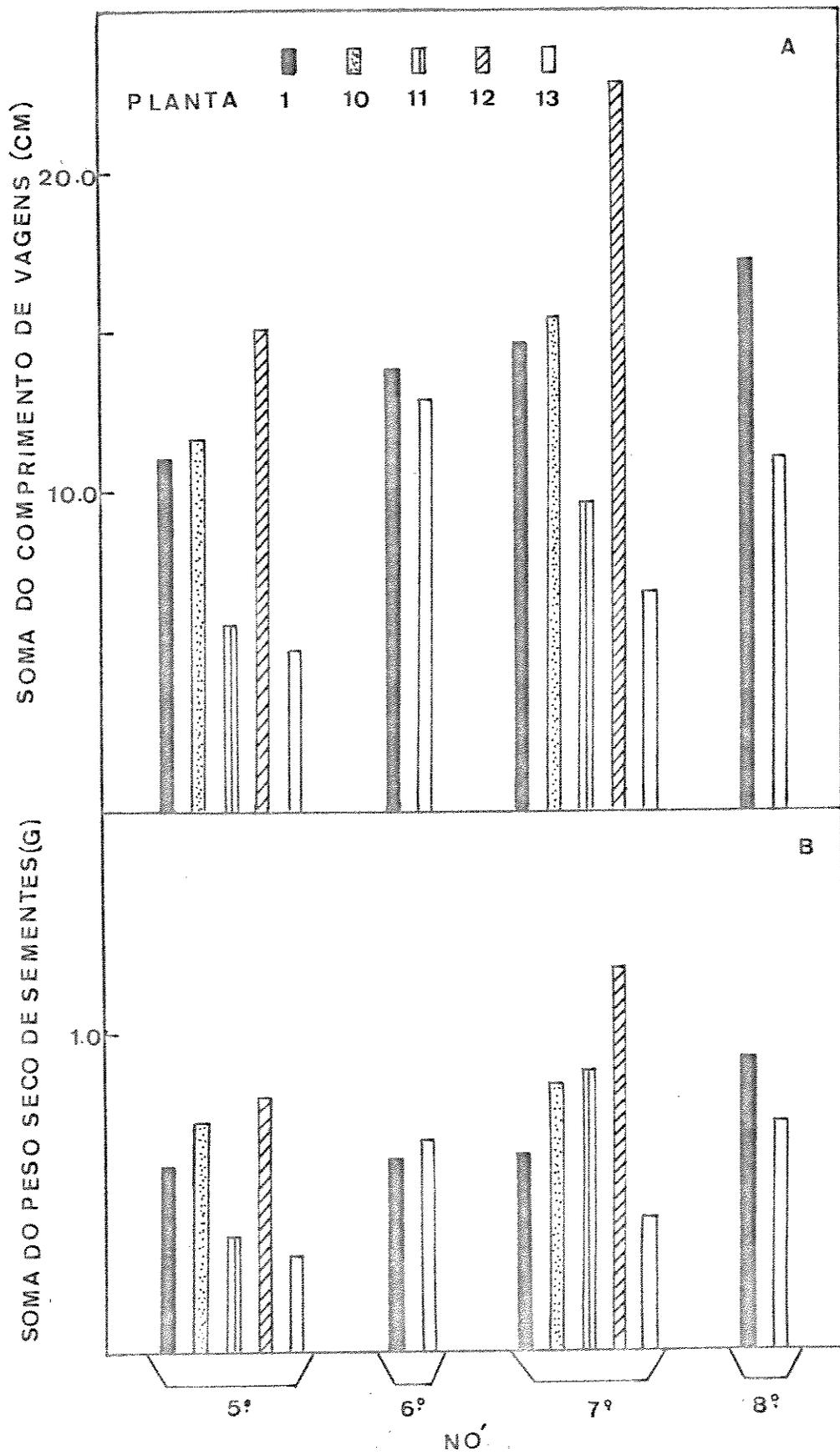
1.5.2. A remoção da folha do 6º e 8º nós e dos frutos do 5º e 7º nós ocasionou uma diminuição no cresci-

FIGURA 3A - Soma do comprimento máximo atingido pelas vagens presentes em cada nó das plantas 1, 10, 11, 12 e 13.

FIGURA 3B - Soma do peso seco das sementes maduras contidas nas vagens localizadas no 5º, 6º, 7º e 8º nós das plantas 1, 10, 11, 12 e 13.



Esquema das plantas 10, 11, 12 e 13 - As folhas e vagens esquematizadas em linha pontilhada indicam que estes órgãos foram retirados da planta.



mento das vagens e no peso seco das sementes do 8º nó e um aumento no peso seco das sementes do 6º nó (planta 15).

1.5.3. A ausência dos frutos do 5º e 7º nós (planta 16) acarretou o aumento do crescimento das vagens e do peso seco das sementes do 6º nó. As alterações sofridas pelos frutos do 8º nó não foram significativas.

1.5.4. A planta 17, sem as folhas do 6º e 8º nós mostrou uma diminuição no crescimento das vagens do 6º e 8º nós e no peso seco das sementes do 8º nó. As alterações do crescimento das vagens do 5º e 7º nós e no peso seco das sementes do 5º, 6º e 7º nós não foram significativas.

A conclusão é que as folhas do 5º e 7º nós contribuem com metabolitos para a nutrição dos frutos do 6º nó, mas contribuem muito pouco para o desenvolvimento dos frutos do 8º nó.

1.6. Nutrição dos frutos do 5º e 8º nós: contribuição das folhas do 6º e 7º nós e das folhas adjacentes (5º e 8º).

As figuras 5A e 5B (página 30) mostram as alterações sofridas pelas plantas 18, 19, 20 e 21.

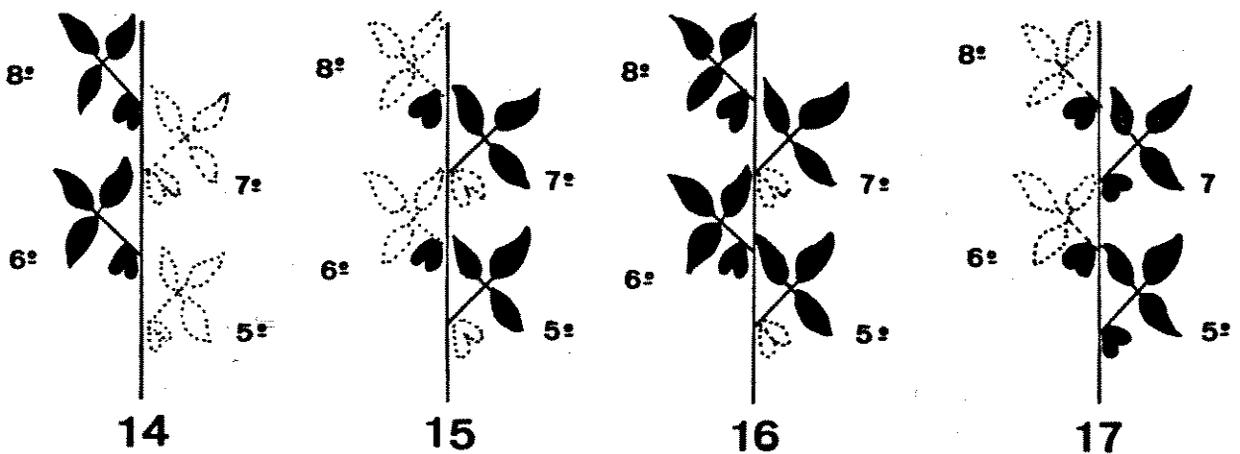
1.6.1. A ausência das folhas e frutos do 6º e 7º nós, planta 18, não ocasionou alteração significativa no crescimento das vagens e no peso seco das sementes do 5º e 8º nós.

1.6.2. A remoção das folhas do 5º e 8º nós e dos frutos do 6º e 7º nós (planta 19) ocasionou a diminuição do crescimento das vagens e do peso seco das sementes do 8º nó. O crescimento das vagens e o peso seco das sementes do 5º nó não sofreram alteração significativa.

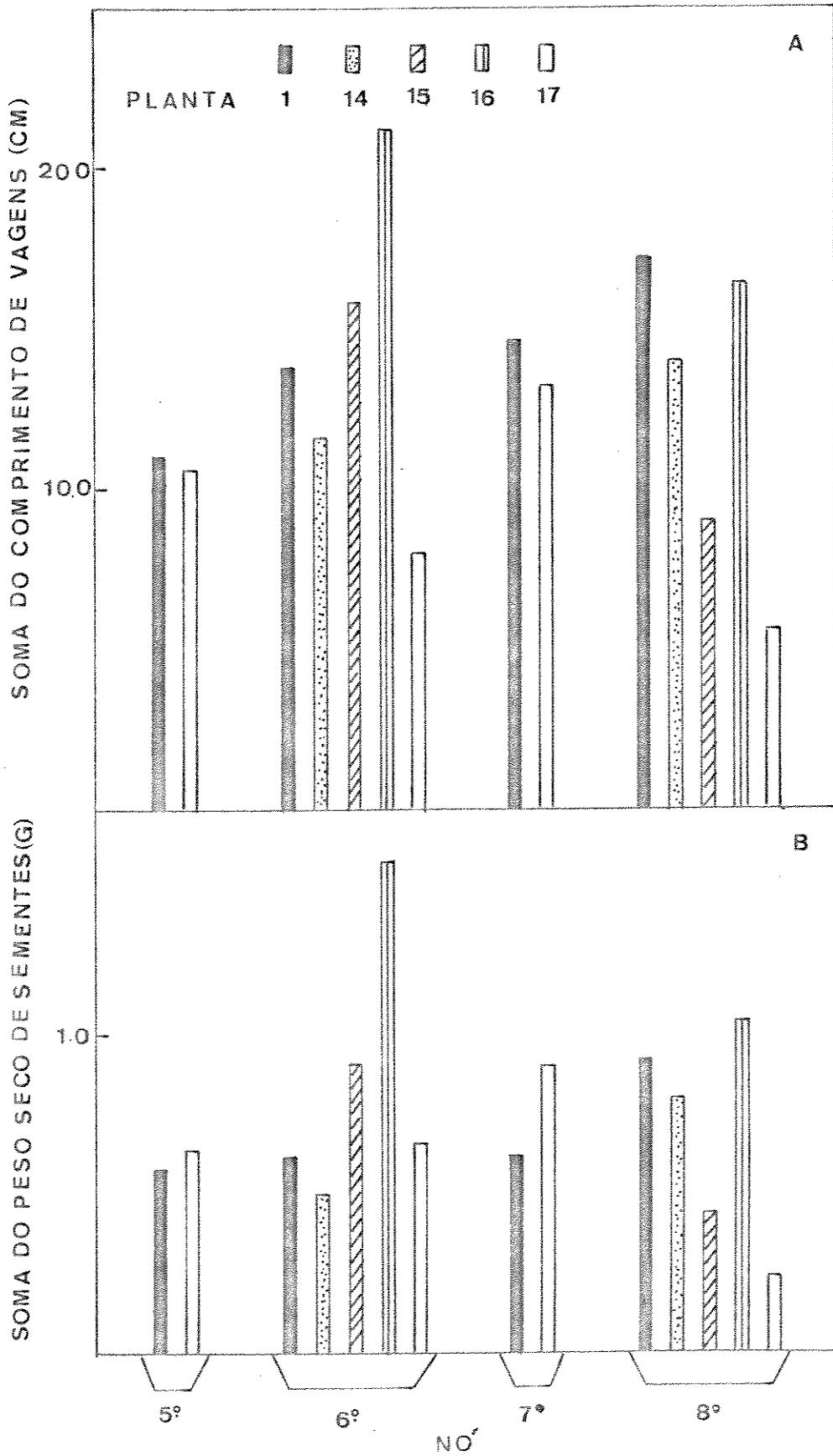
1.6.3. A planta 20, sem os frutos do 6º e 7º nós, apresentou aumento no crescimento das vagens e no peso

FIGURA 4A - Soma do comprimento máximo atingido pelas vagens presentes no 5º, 6º, 7º e 8º nós das plantas 1, 14, 15, 16 e 17.

FIGURA 4B - Soma do peso seco das sementes maduras contidas nas vagens localizadas no 5º, 6º, 7º e 8º nós das plantas 1, 14, 15, 16 e 17.



Esquema das plantas 14, 15, 16 e 17 - As folhas e vagens esquematizadas em linhas pontilhadas indicam que estes órgãos foram retirados das plantas.



seco das sementes do 5º nó, mas não apresentou alteração significativa no desenvolvimento dos frutos do 8º nó.

1.6.4. A remoção das folhas do 5º e 8º nós provocou uma diminuição no crescimento das vagens do 5º e 8º nós e um aumento no crescimento das vagens do 6º nó. O desenvolvimento das vagens do 7º nó e dos frutos do 5º, 6º, 7º e 8º nós não sofreram alteração significativa (planta 21).

As alterações provocadas nestas plantas mostraram que a folha do 6º e 7º nós fornecem metabolitos preferencialmente para os frutos do 5º nó, em relação aos frutos do 8º nó.

1.7. Nutrição dos frutos do 6º e 7º nós: importância da folha do 5º e 8º nós e das folhas adjacentes (6º e 7º).

As figuras 6A e 6B (página 31) mostram as alterações provocadas nas plantas 22, 23 e 24.

1.7.1. A planta 22, sem as folhas e frutos do 5º e 8º nós, não apresentou alteração significativa no desenvolvimento dos frutos do 6º e 7º nós.

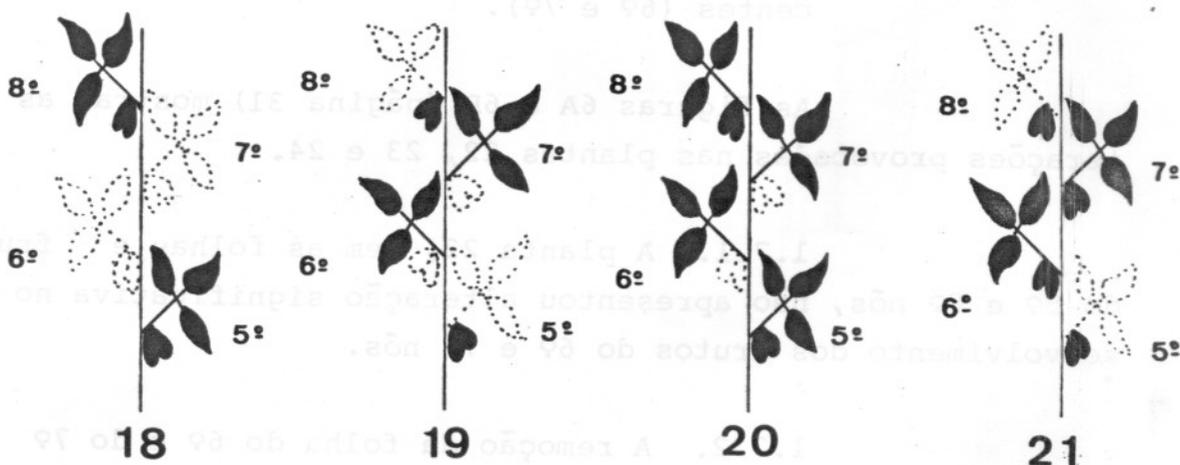
1.7.2. A remoção da folha do 6º e do 7º nós e dos frutos do 5º e 8º nós (planta 23) não ocasionou alteração significativa no desenvolvimento das vagens e sementes do 6º e 7º nós.

1.7.3. A ausência da folha do 6º e 7º nós (planta 24) ocasionou uma diminuição no crescimento das vagens do 5º, 6º e 7º nós e no peso seco das sementes do 5º e 6º nós. As alterações sofridas pelas vagens do 8º nó e pelas sementes do 7º e 8º nós não foram significativas.

Estes resultados mostraram que a folha do 8º nó contribui eficientemente com metabolitos para a nutrição dos frutos do 6º e 7º nós, uma vez que a conclusão 3.1.2 mostrou que a participação da folha do 5º nó deve ser mínima.

FIGURA 5A - Soma do comprimento máximo atingido pelas vagens presentes no 5º, 6º, 7º e 8º nós das plantas 1, 18, 19, 20 e 21.

FIGURA 5B - Soma do peso seco das sementes maduras contidas nas vagens localizadas no 5º, 6º, 7º e 8º nós das plantas 1, 18, 19, 20 e 21.



Esquema das plantas 18, 19, 20 e 21 - As folhas e vagens esquematizadas em linhas pontilhadas indicam que estes órgãos foram retirados das plantas.

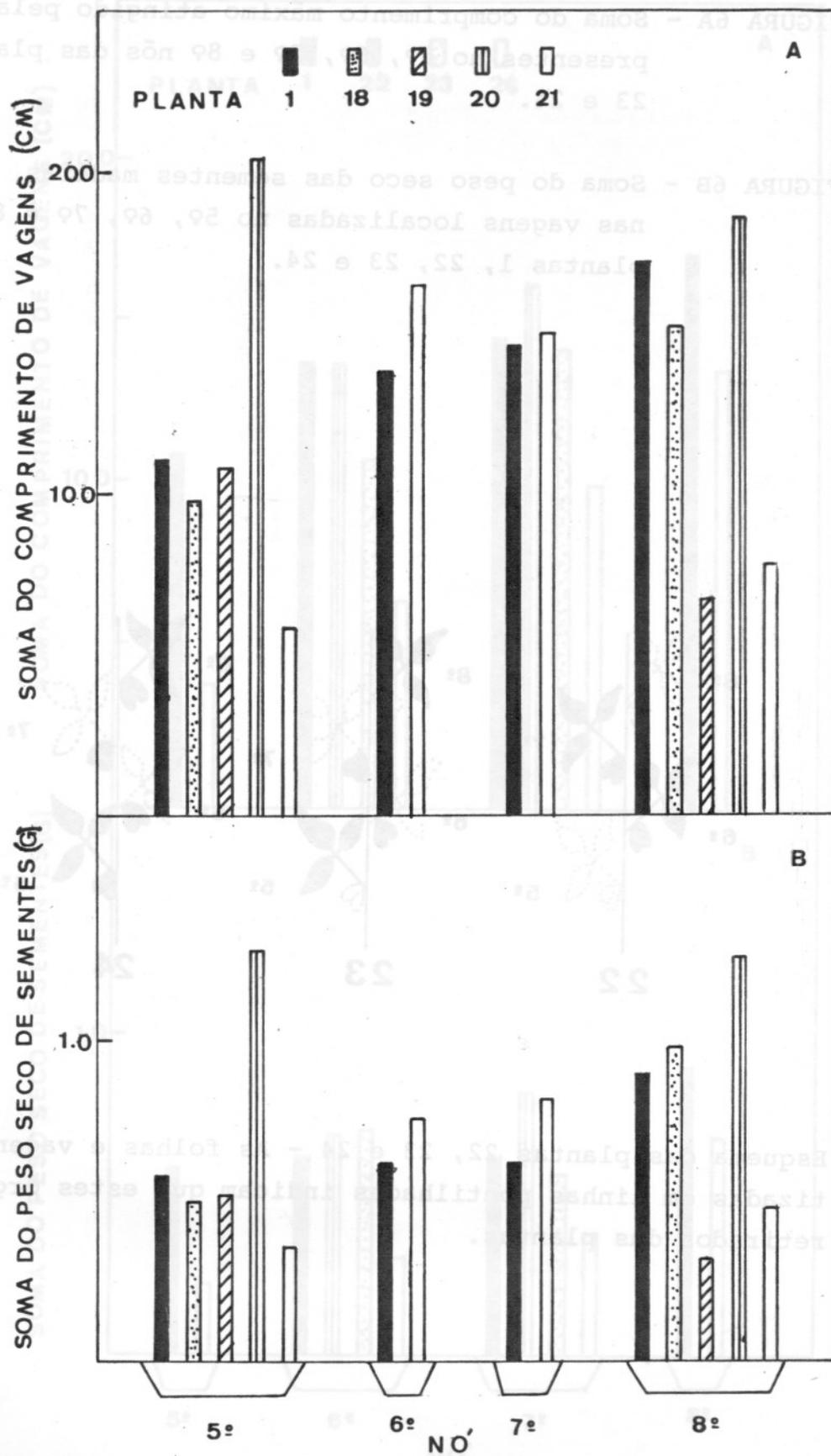
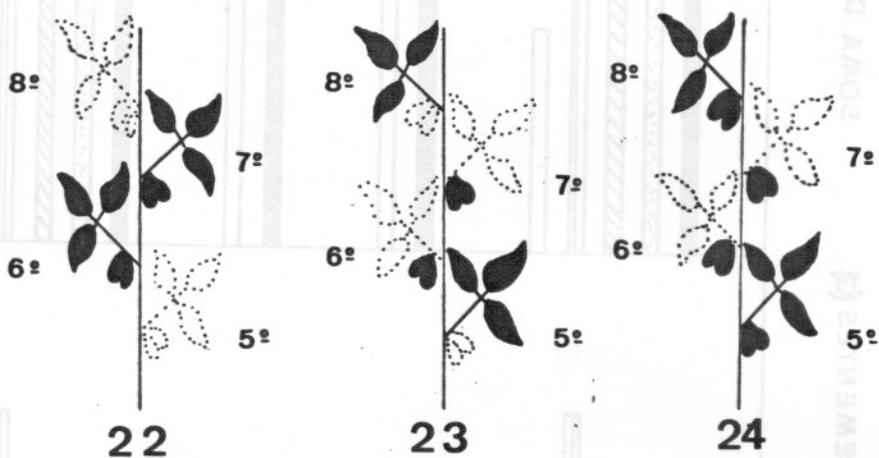
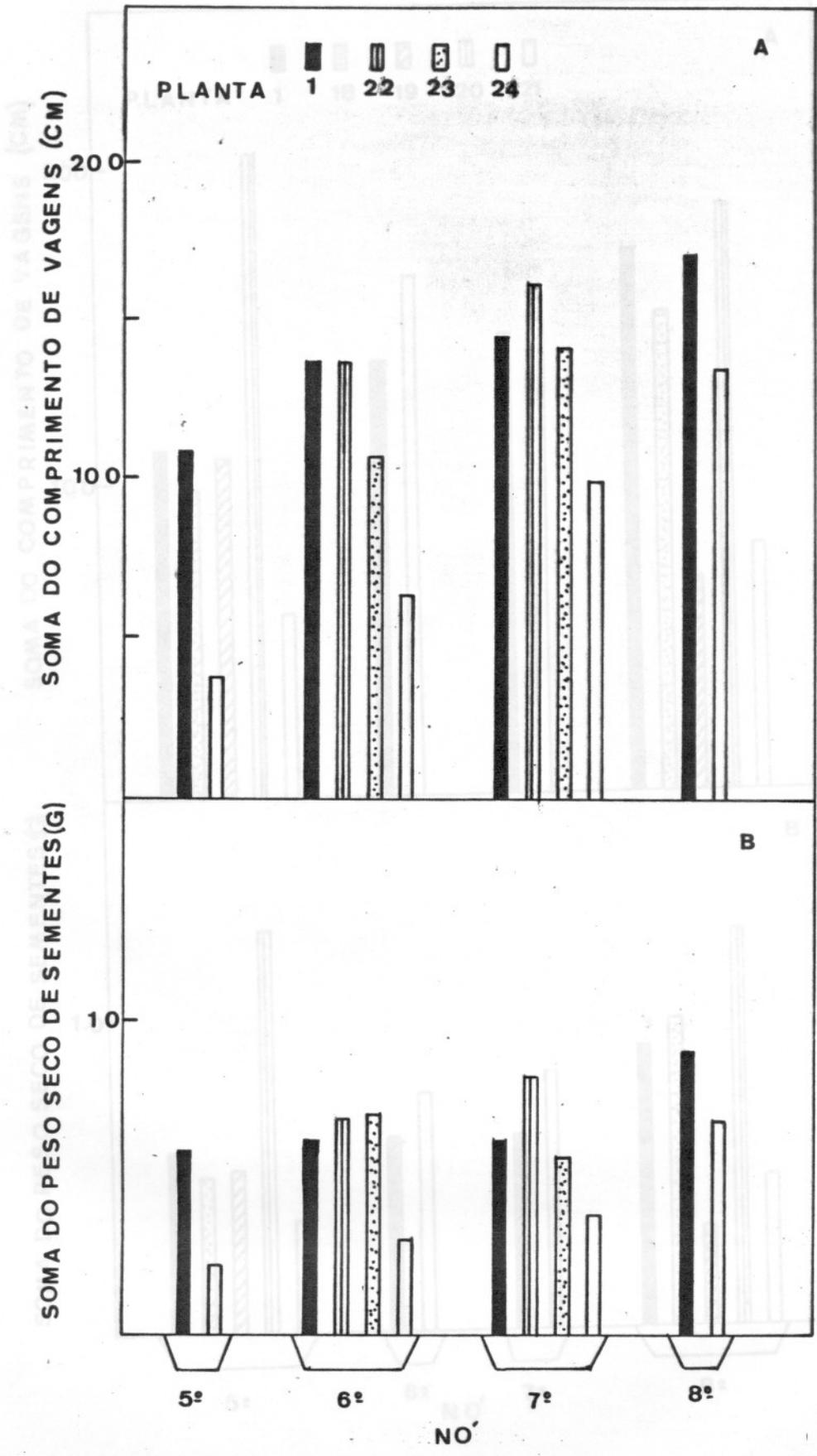


FIGURA 6A - Soma do comprimento máximo atingido pelas vagens presentes no 5º, 6º, 7º e 8º nós das plantas 22, 23 e 24.

FIGURA 6B - Soma do peso seco das sementes maduras contidas nas vagens localizadas no 5º, 6º, 7º e 8º nós das plantas 1, 22, 23 e 24.



Esquema das plantas 22, 23 e 24 - As folhas e vagens esquematizadas em linhas pontilhadas indicam que estes órgãos foram retirados das plantas.



1.8. Importância da folha adjacente para a nutrição do fruto.

Para essa averiguação foram realizadas alterações nas plantas 25, 26, 27 e 28 (figuras 7A e 7B, página 33).

1.8.1. A planta 25, que apresenta apenas a folha e os frutos do 5º nó, mostrou uma diminuição no crescimento das vagens e no peso seco das sementes desse nó.

1.8.2. A presença apenas da folha e frutos no 5º nó (planta 26) acarretou a diminuição do crescimento de suas vagens e do peso seco de suas sementes.

1.8.3. A planta 27, contendo apenas a folha e os frutos do 7º nó, mostrou uma diminuição no crescimento de suas vagens, mas nenhuma alteração no peso seco de suas sementes.

1.8.4. A presença apenas da folha e dos frutos do 8º nó (planta 28) não ocasionou alteração significativa no crescimento das vagens e no peso seco das sementes desse nó.

Os resultados destas alterações mostraram que a folha do 5º e 6º nós, ao contrário da folha do 7º e do 8º nós, não são suficientes para a nutrição de seus frutos, quando ela constitui a única fonte de produção na planta.

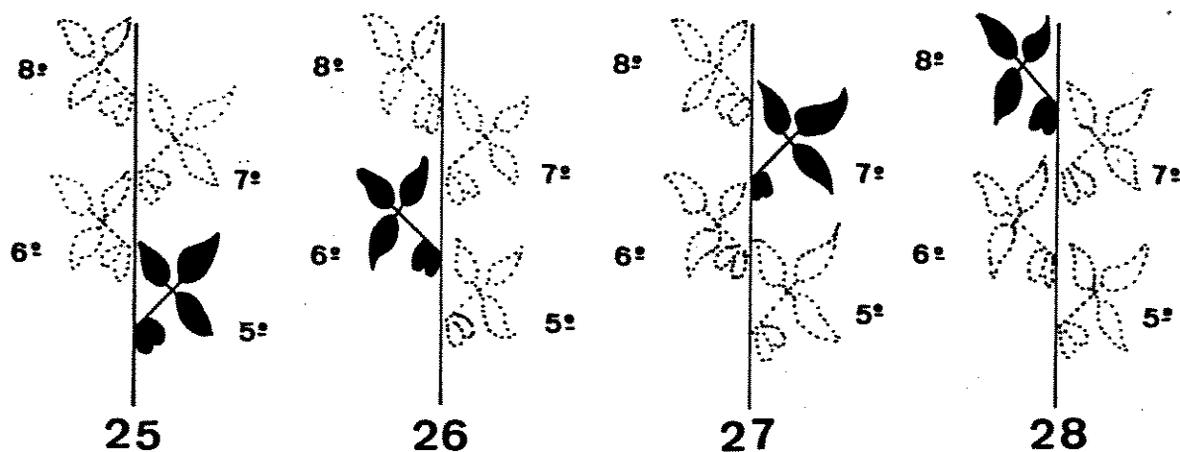
As alterações provocadas nestas plantas, através da remoção de diferentes folhas e/ou frutos, mostraram que a folha contribui preferencialmente com metabolitos para a nutrição do fruto adjacente. Isto foi mostrado pelas plantas 2, 6, 10, 14, 18 e 22 que apresentaram pouca variação em relação à planta controle.

A redução no desenvolvimento dos frutos, apresentada pelas plantas 25, 26 e 27, que possuem apenas uma folha e os frutos adjacentes, ocorreu provavelmente devido a produção dessa folha ser dividida entre os frutos e as raízes.

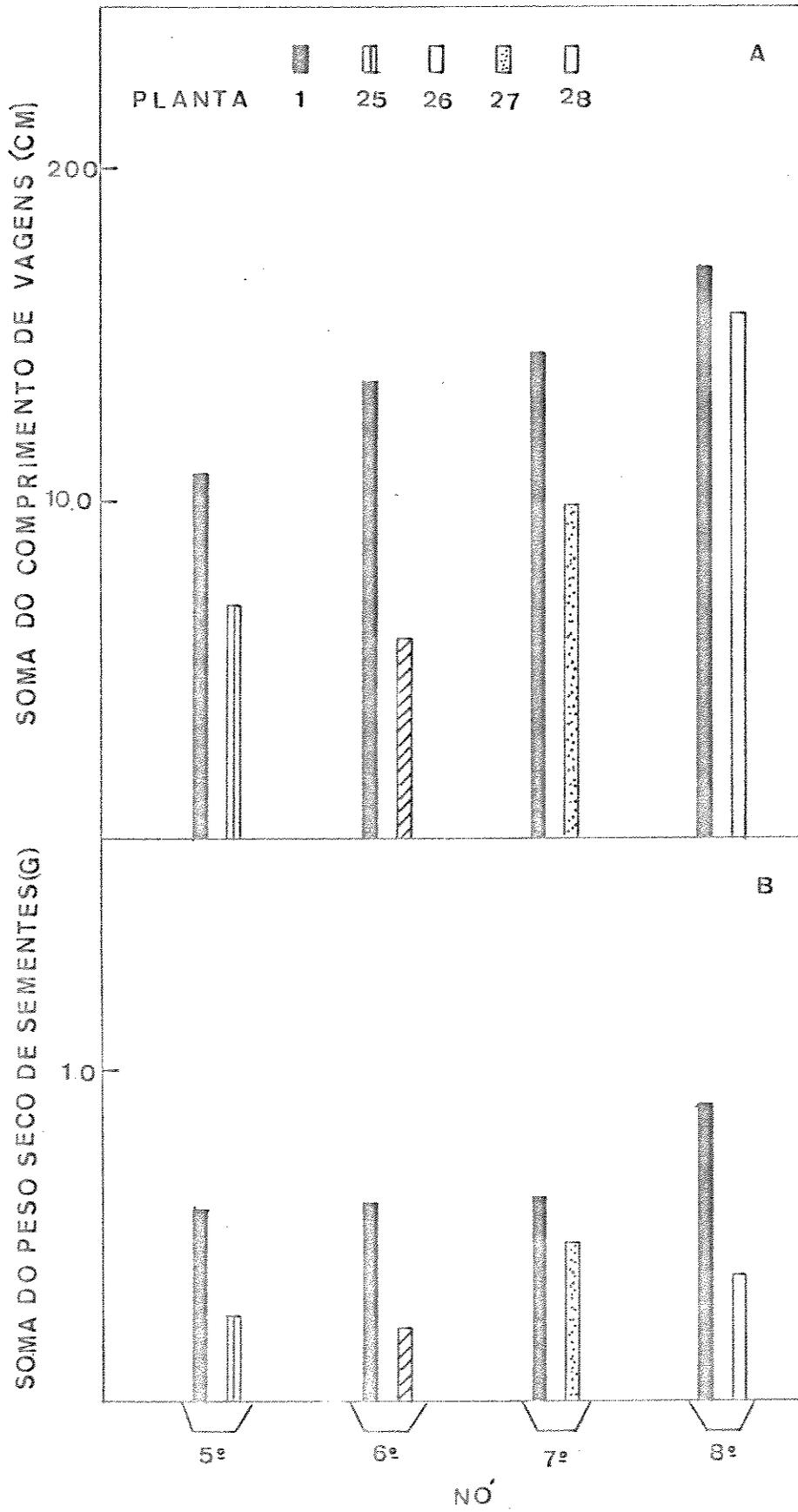
A baixa contribuição das folhas inferiores (5º e 6º nós) para a nutrição dos frutos localizados acima no caule

FIGURA 7A - Soma do comprimento máximo atingido pelas vagens presentes nos nós das plantas 1, 25, 26, 27 e 28.

FIGURA 7B - Soma do peso seco das sementes maduras contidas nas vagens localizadas nos nós das plantas 1, 25, 26, 27 e 28.



Esquema das plantas 25, 26, 27 e 28 - As folhas e vagens esquematizadas em linhas pontilhadas indicam que estes órgãos foram retirados das plantas.



(7ª e 8ª nós), mostrada pelas alterações provocadas nas plantas 3, 4 e 5, se deve provavelmente a competição apresentada pelas raízes.

Os resultados obtidos das plantas 7, 9, 12, 16 e 20 indicaram que as folhas superiores (7ª e 8ª nós) têm capacidade para suprir, quando exigido, as necessidades nutricionais dos frutos inferiores (5ª e 6ª nós).

Com este experimento foi verificado que a folha contribui preferencialmente com metabolitos para as vagens e as sementes inseridas no nó adjacente. Isto indica que as estruturas de um mesmo nó devem ser utilizadas para as determinações bioquímicas que serão realizadas para verificar a contribuição da folha e da vagem para a nutrição nitrogenada da semente.

Como as folhas localizadas no 7ª e 8ª nós (superiores) se mostraram mais eficientes no fornecimento de metabolitos, as estruturas desses nós são as mais convenientes para o estudo. Porém, como a 8ª folha não se encontra totalmente expandida no início da floração, a folha, vagem e semente localizadas no 7ª nó é que serão utilizadas nas determinações bioquímicas.

2. Otimização da metodologia para a determinação da atividade das enzimas redutase de nitrato, glutamina sintetase e glutamato desidrogenase em folha, vagem e semente de soja.

A verificação da metodologia foi feita devido à necessidade de se obter resultados quantitativos, para a comparação da atividade enzimática em tecidos diferentes (folha, vagem e semente). Além disso, é necessário saber se não existem fatores que interferem na determinação da atividade das enzimas.

2.1. Redutase de nitrato

A atividade da redutase de nitrato em folha,

vagem e semente foi determinada através dos métodos in vivo e in vitro.

Vários autores mostraram que existe dificuldade na determinação da atividade da redutase de nitrato em vagem e semente de algumas leguminosas pelo método in vitro (SCHLESIER e MUNTZ, 1974; SCHLESIER, 1977b).

Os dados da tabela 1 mostram que o método in vivo é mais sensível que o método in vitro para a determinação da redutase de nitrato em folha e em vagem. No cotilédone e na casca da semente, não foi possível detectar a atividade enzimática por quaisquer desses métodos.

ATIVIDADE DA REDUTASE DE NITRATO
($\mu\text{mol NO}_2/\text{g PF/h}$)

	<u>in vivo</u>	<u>in vitro</u>
Folha	5,61	2,04
Vagem	0,09	*
Cotilédone da semente	*	*
Casca da semente	*	*

(*) atividade não detectada

TABELA 1 - Atividade da redutase de nitrato em extratos enzimáticos de folha, vagem e semente avaliada pelos métodos in vivo e in vitro. Os dados são a média de 3 experimentos.

Devido a possibilidade da enzima estar ligada à membrana, foram adicionados detergentes no meio de extração para facilitar a solubilização da enzima (tabela 2 - página 36). A concentração de 0,1% (v/v) dos detergentes Triton X-100 e Tween 20 apresentou maior eficiência na obtenção da atividade, em comparação com o controle. Os extratos contendo 0,1, 0,5 e 1,0% (v/v) desses detergentes apresentaram cor esverdeada, o que interferiu na leitura colorimétrica. Para a extração da enzima foi utilizado, então, o meio de extração contendo 0,1% (v/v) de Triton X-100.

MEIO DE EXTRAÇÃO	CONCENTRAÇÃO % (v/v)	ATIVIDADE DA REDUTASE DE NITRATO ($\mu\text{mol NO}_2/\text{g PF/h}$)
Sem detergente		0,029
+ TRITON X-100	0,1	0,180
	0,5	-
	1,0	-
+ TWEEN 20	0,1	0,160
	0,5	-
	1,0	-

TABELA 2 - Atividade da redutase de nitrato em vagem, avaliada pelo método in vitro, extraída com meio extrator contendo detergentes.

Com o objetivo de verificar se a baixa atividade enzimática determinada imediatamente após a extração dos tecidos de vagem não era devido a enzima se encontrar numa forma desestruturada, o extrato foi conservado por 24 horas a 0°C. Após esse tempo, o extrato foi descongelado e utilizado para a determinação da atividade enzimática. Mesmo utilizando este procedimento, não foi possível detectar a atividade da redutase de nitrato em vagem.

A possível interferência ocasionada pela presença de inibidores nos extratos enzimáticos da redutase de nitrato, determinada pelo método in vitro, foi investigada em misturas de extratos (em quantidades iguais) dos vários tecidos em estudo.

Os resultados apresentados na tabela 3 (página 37) indicam que não existem inibidores da atividade enzimática nas preparações obtidas de vagem e de cotilédone e casca de semente, pois a presença do extrato de quaisquer desses tecidos misturado na preparação enzimática obtida da folha não alterou significativamente a atividade da enzima.

2.2. Padronização do método para a determinação da atividade enzimática

É conhecido que os fatores luz (BEEVERS et

EXTRATO ENZIMÁTICO	ATIVIDADE DA REDUTASE DE NITRATO ($\mu\text{mol NO}_2/\text{g PF/h}$)	
Folha	0,57	(0,54)
	0,51	
Vagem	0,10	(0,11)
	0,12	
Cotilédone da semente	*	*
Casca da semente	*	*
Folha + vagem	0,56	(0,59)
	0,62	
Folha + cotilédone	0,55	(0,545)
	0,54	
Folha + casca	0,55	(0,525)
	0,50	
(*) Atividade não de tectada		

TABELA 3 - Atividade da redutase de nitrato determinada pelo método in vitro em extratos enzimáticos de folha, vagem e semente e em misturas de extratos desses tecidos.

alii, 1964, SCHRÄDER et alii, 1968), concentração de nitrato (HAGEMAN e FLESHER, 1960) e energia metabólica (BEEVERS e HAGEMAN, 1969) são necessários para assegurar a máxima atividade da redutase de nitrato em folhas. Esses requisitos foram verificados também em vagem e em cotilédone e casca da semente.

Os diferentes tratamentos que foram utilizados in vivo incluíram: aumento da concentração de nitrato para 0,2 M de KNO_3 no meio de infiltração, adição de 200 mM de glicose no meio de infiltração e iluminação dos tecidos removidos da planta e colocados no meio de infiltração por 5 horas com 15.000 lux.

Os tratamentos aplicados aos tecidos em estudo foram: a) nitrato, b) nitrato + glicose, c) 5 horas de luz, d) 5 horas de luz + nitrato e e) 5 horas de luz + nitrato + glicose.

Nenhum destes procedimentos proporcionou aumento da atividade da redutase de nitrato em vagem, que foi 0,27 $\mu\text{mol NO}_2/\text{g PF/h}$ em todos os tratamentos. No cotilédone e na casca da semente não foi possível detectar atividade da redutase de nitrato em nenhum dos tratamentos, o que indica que a ausência da atividade da enzima não foi devido a falta de substrato, de energia ou de luz para a sua indução.

Estes experimentos indicaram que a atividade da redutase de nitrato não é detectável na semente e é baixa na vagem comparada com aquela observada em tecidos de folha. Foi demonstrado, também, que a baixa atividade ou a sua ausência não é devido à presença de inibidores no extrato enzimático e nem à falta de condições necessárias para a indução da enzima.

A atividade da redutase de nitrato, durante a fase de desenvolvimento reprodutivo da planta, foi determinada pelos métodos in vivo e in vitro em folha e pelo método in vivo em vagem.

2.3. Glutamina sintetase

2.3.1. Determinação da atividade da glutamina sintetase através da reação sintetase

As atividades obtidas para glutamina sintetase nas preparações de folha (figura 8, página 40), determinadas através da reação sintetase, não foram lineares com referência às quantidades de extrato enzimático utilizadas e ao tempo de reação. As preparações enzimáticas de vagem e de semente não apresentaram atividade para glutamina sintetase utilizando-se esta reação.

A dificuldade em obter a atividade satisfatória para glutamina sintetase nestes extratos enzimáticos se deve, provavelmente, ao rápido consumo de ATP pela ação da ATPase.

2.3.2. Medida da atividade da glutamina sintetase pela reação transferase

A atividade da glutamina sintetase foi medida pela reação transferase em extratos enzimáticos preparados com meio específico para esta enzima e com meio extrator da redutase de nitrato. A preparação enzimática da glutamina sintetase, utilizando-se meio extrator da redutase de nitrato, foi feita com o objetivo de facilitar a determinação das duas enzimas em sequência.

Nas preparações enzimáticas de folha, as curvas que associam absorbância e tempo mostram baixa atividade nos primeiros 15 minutos de reação e uma faixa linear muito pequena entre 15 e 20 minutos, nas várias alíquotas testadas (figura 9A, página 42). A mesma reação mostra uma atividade enzimática maior para 0,1 ml de extrato quando a enzima é extraída com o meio extrator da redutase de nitrato. Esse volume proporciona uma linearidade entre 10 e 20 minutos. A reação parou após 15 minutos quando foram utilizados

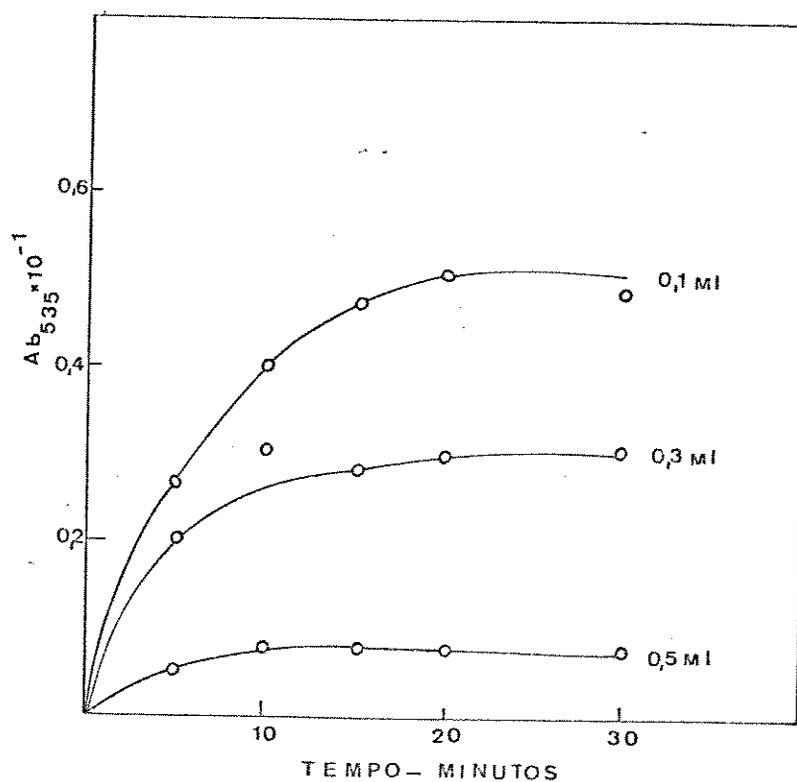


FIGURA 8 - Atividade da glutamina sintetase na folha, avaliada pela reação sintetase, em diferentes quantidades de extrato enzimático extraído com meio específico.

0,3 e 0,5 ml de extrato (figura 9B, página 42).

A atividade estimada pela reação transferase em vagem é maior quando a enzima é extraída com o meio de extração específico (figura 10A, página 43) comparando com a extraída, utilizando-se o meio de extração da redutase de nitrato (figura 10B, página 43). As curvas mostram linearidade de entre 10 e 20 minutos.

Em sementes, a reação transferase também apresenta maior atividade quando a enzima é extraída com meio específico (figura 11A, página 44), comparada com a extração feita com o meio extrator da redutase de nitrato (figura 11B, página 44). As curvas que associam absorvância e tempo mostram uma faixa linear entre 10 e 30 minutos, nas várias alíquotas testadas.

2.3.3. Verificação da presença de inibidor(es) endógeno(s) nas preparações enzimáticas.

FRIEDENWALD e MAENGWYN-DAVIES (1954) mostraram que a relação entre quantidades de extrato enzimático e velocidade de reação pode ser indicativo da presença de inibidor(es) endógeno(s) nos tecidos.

Esse inibidor, que pode estar separado espacialmente da enzima na planta intacta, poderia ser liberado no momento da extração enzimática. A presença de inibidor no extrato enzimático pode ser mostrada através de curvas que associam E/V e E , onde E é a quantidade de enzima adicionada ao meio de reação e V é a velocidade de reação em cada volume de extrato utilizado. Quando um inibidor está presente, os pontos caem numa reta com ângulo de inclinação mensurável.

SCHIMMER *et alii*, (1961) mostraram uma derivação da equação de inibição endógena aplicada a sistemas enzimáticos com inibição não competitiva. A racionalização do método empregado foi desenvolvida matematicamente, relacionando-se as equações de Lineweaver-Burk na presença (I) e na ausência (II) do inibidor.

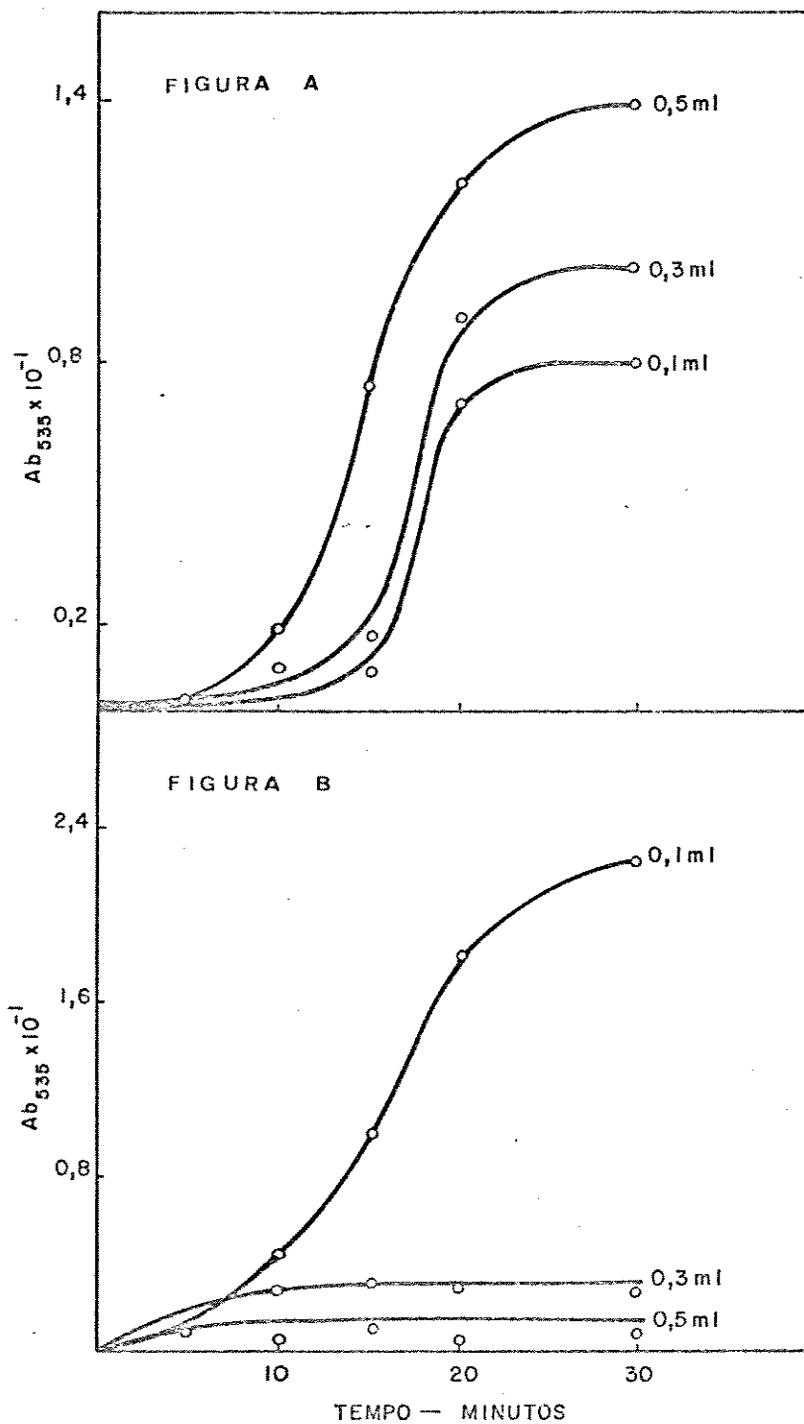


FIGURA 9 - Atividade da glutamina sintetase em folha, avaliada pela reação transferase, em diferentes quantidades de extrato enzimático extraído com meio específico (figura 9A) e com meio da redutase de nitrato (figura 9B).

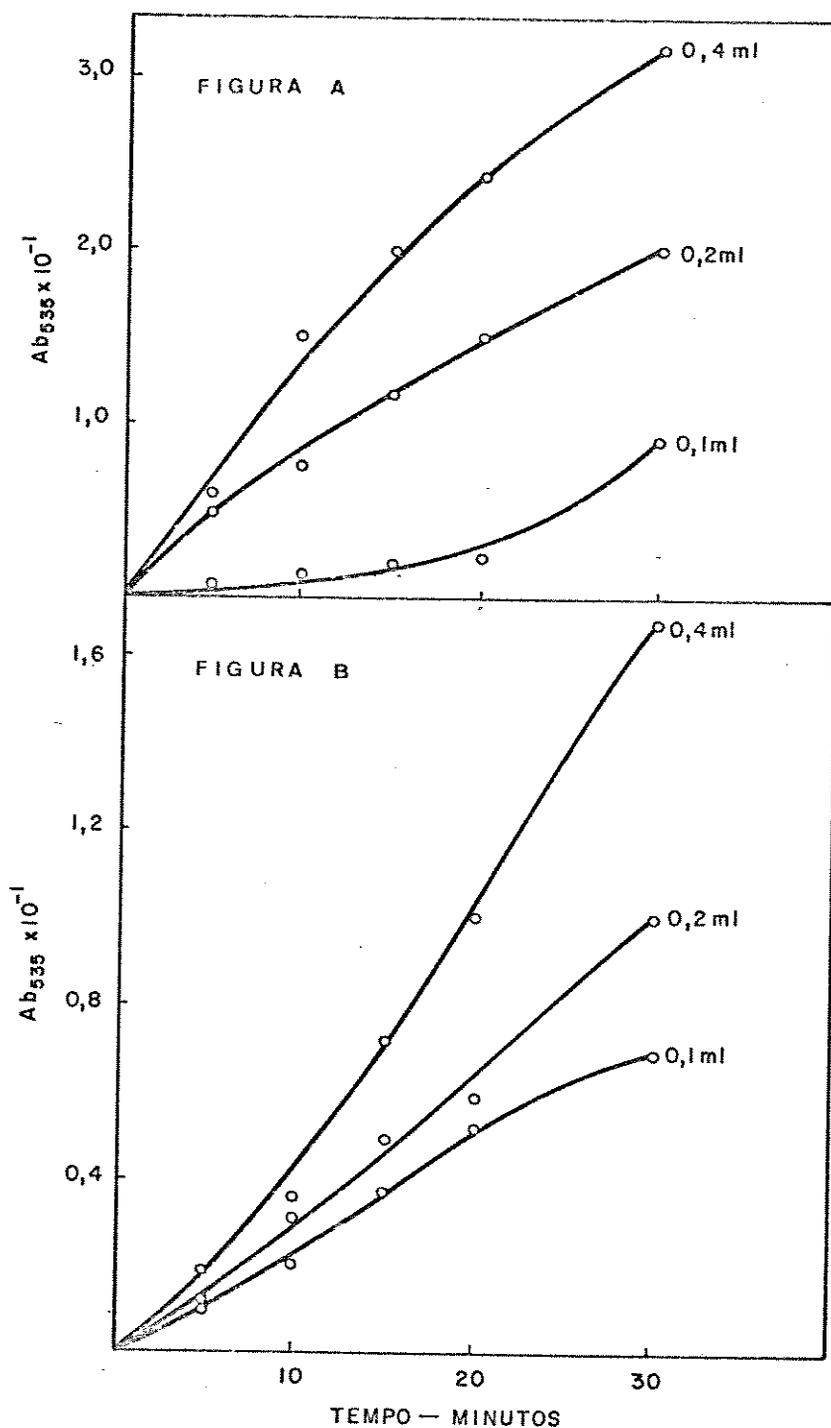


FIGURA 10 - Atividade da glutamina sintetase em vagem, avaliada pela reação transferase, em diferentes quantidades de extratos enzimáticos extraídas com meio específico (figura 10A) e com o meio extrator da redutase de nitrato (figura 10B).

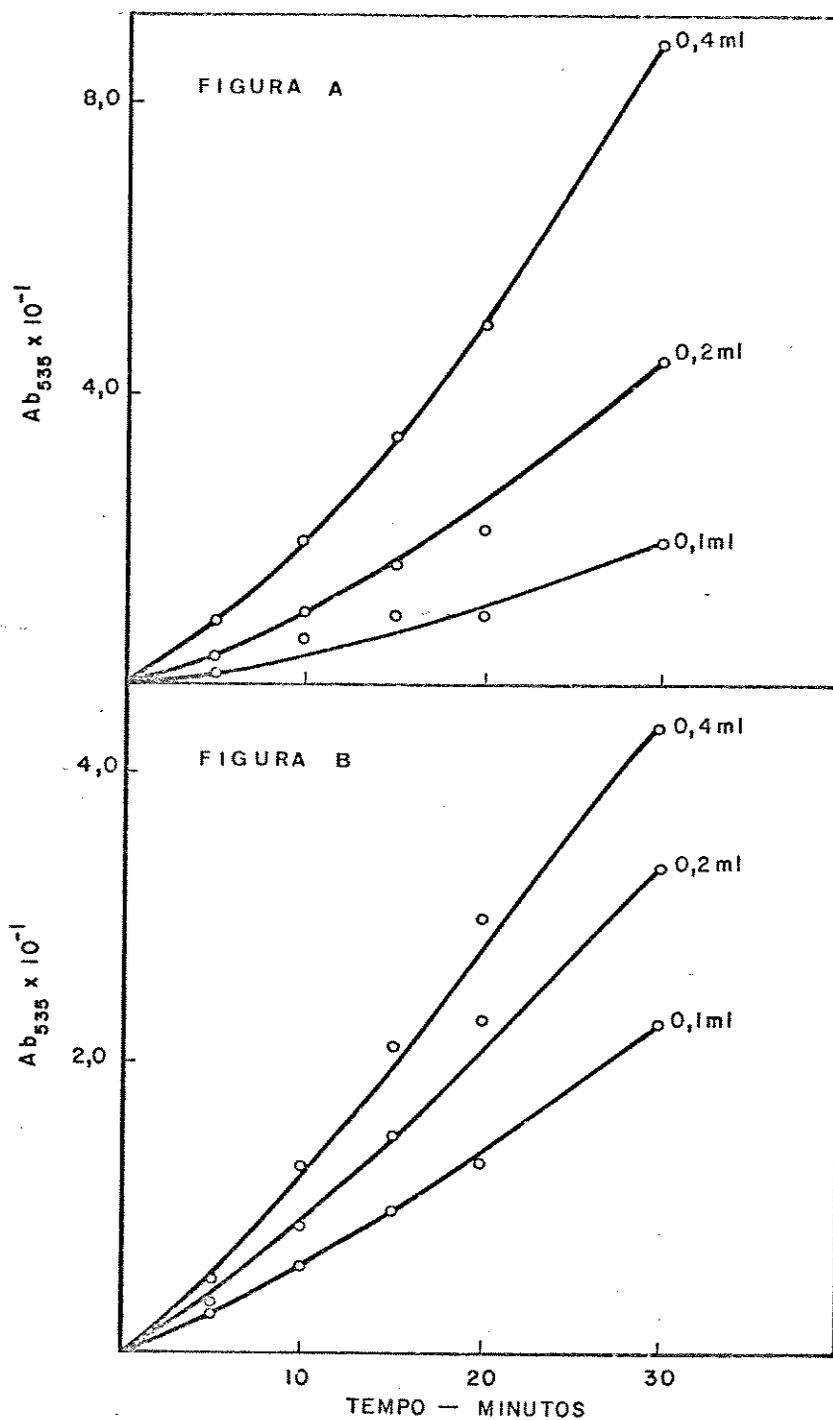


FIGURA 11 - Atividade da glutamina sintetase em semente, avaliada pela reação transferase, em diferentes quantidades de extrato enzimático extraídas com meio específico (figura 11A) e com o meio extrator da redutase de nitrato (figura 11B).

$$\frac{1}{V_I} = \frac{KM}{V_{max.} S} \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + \frac{1}{V} \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) \quad (I)$$

$$\frac{1}{V_O} = \frac{Km}{V_{max.} S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (II)$$

Dividindo a equação I pela II, temos:

$$\frac{V_O}{V_I} = 1 + \frac{I}{K_I} \quad (III)$$

onde: V_O = velocidade da reação enzimática na ausência de inibidor.

V_I = velocidade da reação enzimática na presença de inibidor na concentração I

K_I = constante de equilíbrio do complexo inibidor-enzima

$$V_O = K_I E$$

Substituindo na equação (III), temos:

$$\frac{E}{V_I} = \frac{1}{K_1} + \frac{I}{K_1 K_I} \cdot \frac{E}{E} \quad (IV)$$

onde: V_I = atividade da enzima na concentração E

K_1 e K_I são constantes

No gráfico de $\frac{E}{V_I} \cdot E$, temos:

$$\text{inclinação} = \frac{I}{K_1 K_I E}$$

$$\frac{\text{inclinação}}{\text{intersecção}} = \frac{I}{K_I E}$$

Assim, verificamos que a inclinação da reta é uma função da concentração do inibidor, e se $I = 0$, a inclinação também é igual a 0.

Utilizando a relação acima descrita, pode ser calculada a atividade sem a remoção do inibidor endógeno e também a quantidade de inibidor em unidades arbitrárias presentes numa determinada quantidade de preparação enzimática.

Esta metodologia foi utilizada para verificar a possibilidade da existência de um inibidor não competitivo nos meios de extração utilizados para avaliar a atividade da glutamina sintetase. Isto foi feito porque as curvas de absorbância e tempo mostram uma diminuição da atividade com o aumento da quantidade de extrato adicionado ao meio de reação.

A figura 12A (página 47) sugere a presença de inibidor não competitivo nos extratos de folha. A preparação feita com o meio de extração da redutase de nitrato contém mais inibidor quando comparado com a extração com o meio específico.

A figura 12B (página 47) mostra que uma maior quantidade de inibidor(es) não competitivo foi extraída quando a preparação enzimática de vagem foi feita com o meio de extração específico.

Em sementes (figura 13, página 48), o meio de extração específico da glutamina sintetase não apresenta inibidores em comparação com o meio de extração da redutase de nitrato.

A tabela 4 mostra a proporção de inibidores não competitivos presentes nas preparações enzimáticas de vagem e semente. Para o caso de tecidos foliares, observa-se que a inclinação das retas é maior do que a dos outros tecidos. A intersecção das retas com a ordenada tem valores numéricos muito pequenos para se poder avaliar com segurança a concentração do inibidor (página 49).

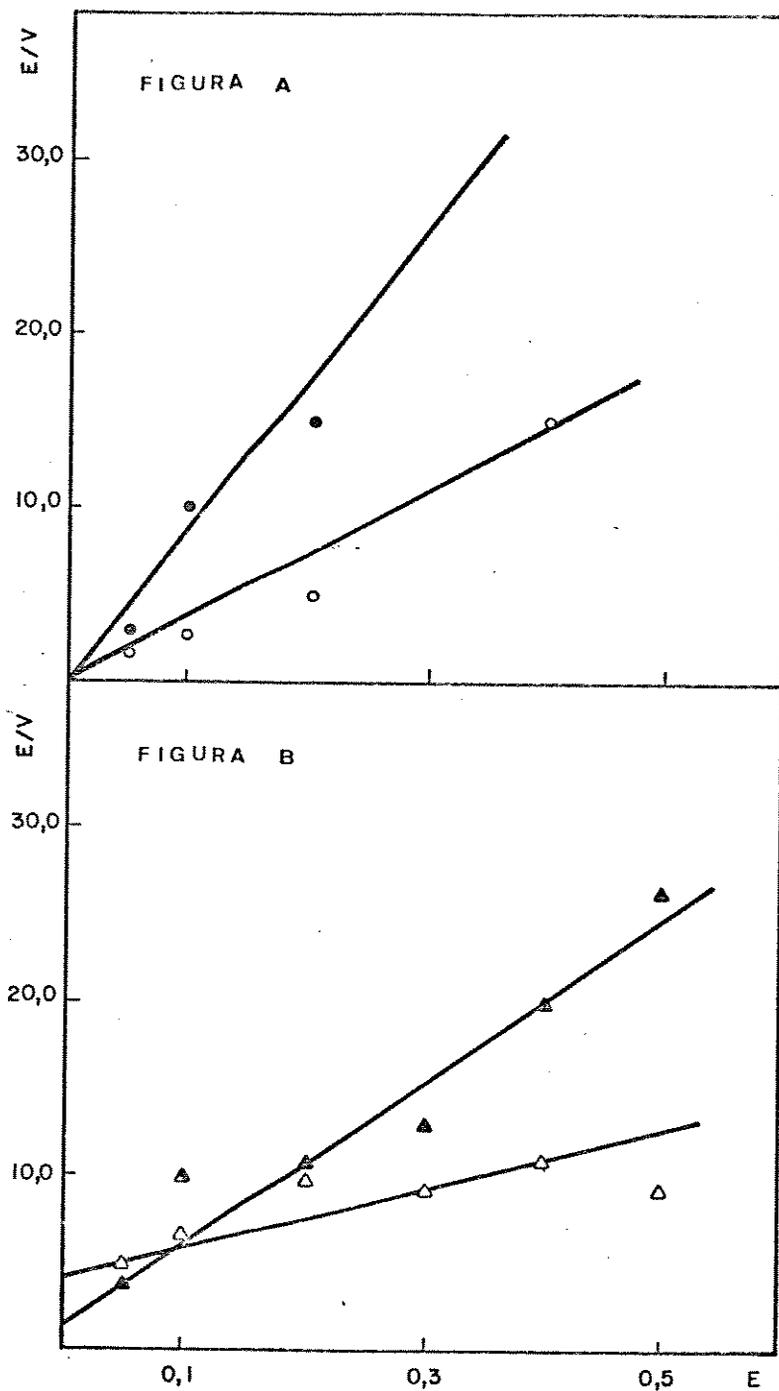


FIGURA 12 - Avaliação da presença de inibidor em diferentes quantidades de extrato enzimático de folha, extraídas com meio específico (—●—) e com meio da redutase de nitrato (—○—) (Figura 12A) e em diferentes quantidades de extrato enzimático, extraídas com meio específico (—△—) e com o meio da redutase de nitrato (—▲—) (Figura 12B).

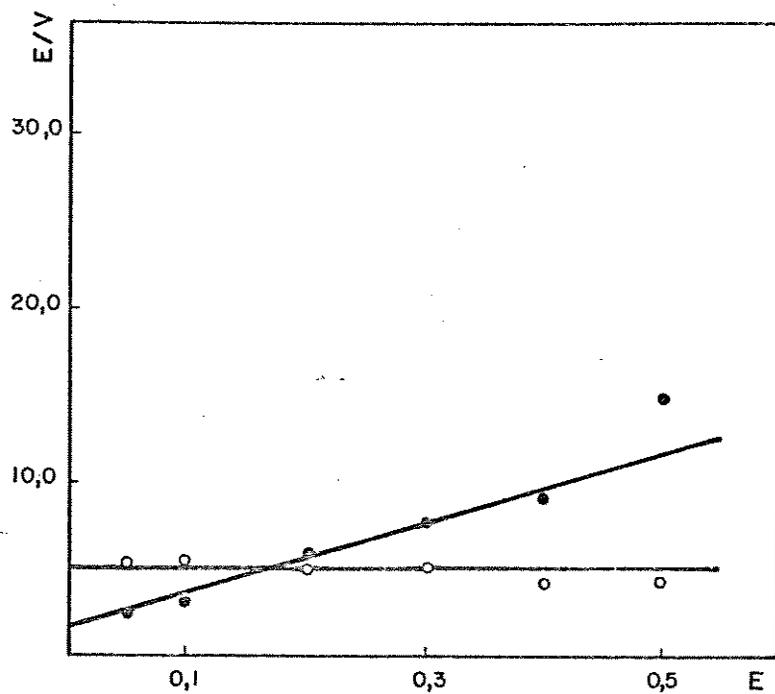


FIGURA 13 - Avaliação da presença de inibidor nas diferentes quantidades de extrato enzimático de semente extraídas com meio específico (—○—) e com o meio extrator da redutase de nitrato (—●—).

QUANTIDADE DE INIBIDOR	MEIO DE EXTRAÇÃO	
	Específico	Redutase de Nitrato
Vagem	0,08	0,36
Semente	0,00	0,20

TABELA 4 - Quantidade de inibidor não competitivo da glutamina sintetase extraída com meio específico e com meio da redutase de nitrato de vagem e semente.

2.3.4. Purificação da glutamina sintetase com sulfato de amônia

Com o objetivo de remover o(s) inibidor(es) endógeno(s) das preparações enzimáticas para a determinação da atividade da glutamina sintetase com meio específico de folha e vagem, foi realizada uma purificação parcial dos extratos com sulfato de amônia.

A preparação enzimática de folha foi dividida em várias amostras e a cada amostra foi adicionada uma concentração diferente de sulfato de amônia. As concentrações empregadas variaram de 10 a 80% de saturação. Após a adição de sulfato de amônia, o extrato foi centrifugado e uma alíquota foi utilizada para a determinação da atividade da enzima.

Os dados da tabela 5 mostram que 50% de saturação de sulfato de amônia no extrato enzimático é a concentração que possibilita a melhor recuperação da enzima.

A atividade da glutamina sintetase resultante das preparações de folha (figura 14A, página 52) e de vagem (figura 14B, página 52), extraídas com meio específico e purificadas com sulfato de amônia, cresce com o aumento da quantidade de extrato enzimático utilizado. As curvas mostram uma faixa linear entre 0 e 30 minutos, nas alíquotas testadas.

Foi feita a avaliação da presença de inibidores endógenos nos extratos de folha e vagem purificados com sulfato de amônia. As curvas que associam E/V e E mostram que o extrato enzimático de folha (figura 15A, página 53) e de vagem (figura 15B, página 53) não apresenta inibidores não competitivos.

3.2.5. Determinação da atividade da glutamina sintetase em extratos dessalinizados

Devido à possível interferência dos íons amônia na atividade da glutamina sintetase, quando da

SULFATO DE AMÔNIA % de saturação	PROTEÍNA mg/l	ATIVIDADE unidades/ml	AT.ESPECÍFICA unidades/mg prot/h
extrato cru	9,10	220,20	24,20
0 - 10	0,76	0,35	0,47
0 - 30	1,33	9,04	6,80
0 - 50	5,02	230,00	46,00
0 - 60	8,60	0,00	0,00
0 - 70	9,30	0,00	0,00
0 - 80	9,00	0,00	0,00

TABELA 5 - Atividade da glutamina sintetase em extratos enzimáticos de folha, purificados com sulfato de amônia.

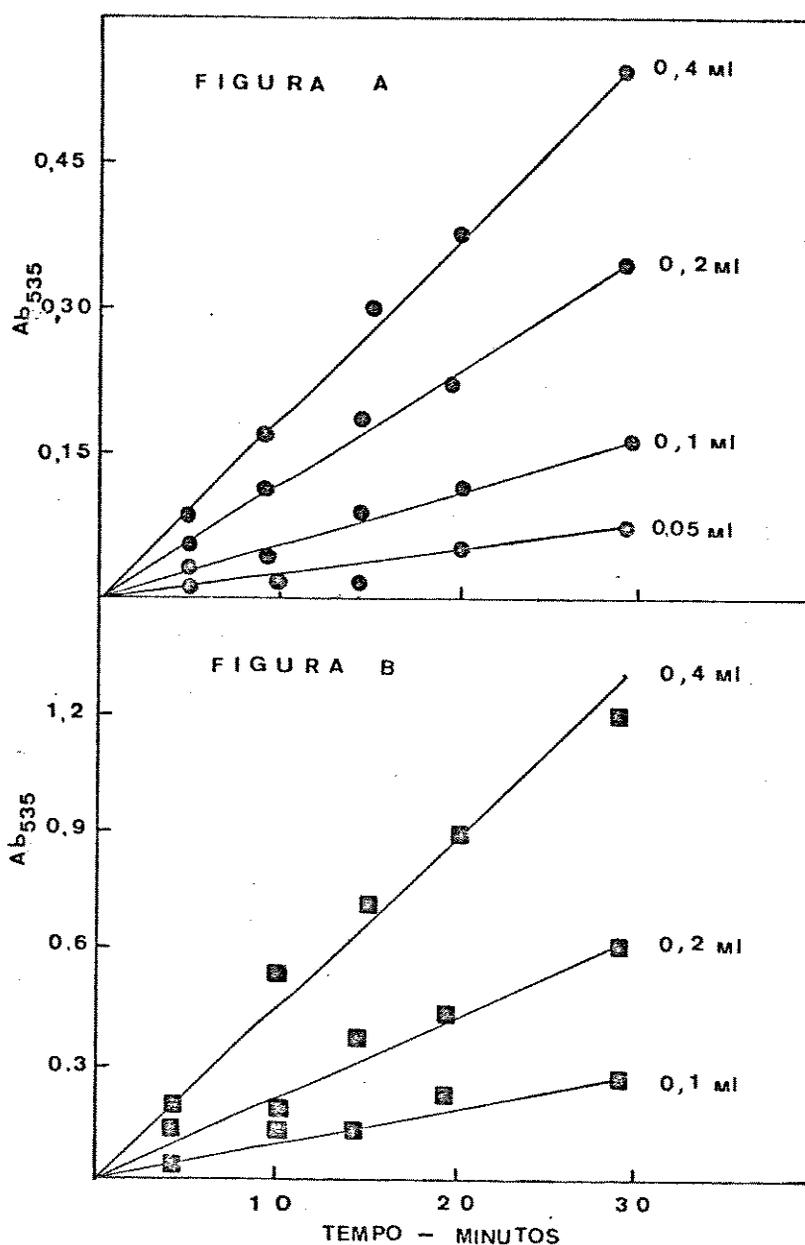


FIGURA 14 - Atividade da glutamina sintetase em folha (figura 14A) e em vagem (figura 14B), avaliada pela reação transferase, em diferentes quantidades de extrato enzimático extraídas com meio específico e purificadas com sulfato de amônia.

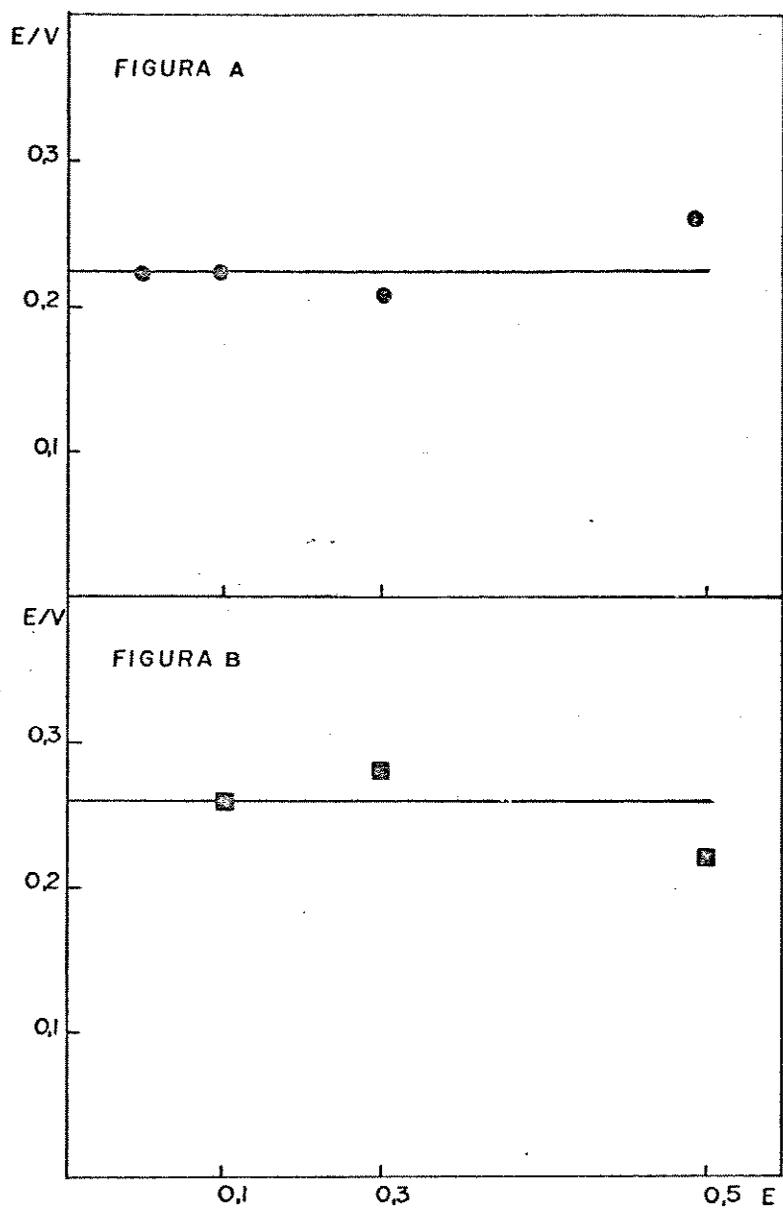


FIGURA 15 - Avaliação da presença de inibidor nas diferentes quantidades de extrato enzimático de folha (figura 15A) e de vagem (figura 15B) extraídas com meio específico e purificado com sulfato de amônia.

sua purificação com sulfato de amônia, os extratos enzimáticos preparados com meio específico, foram dessalinizados passando-os por uma coluna de Sephadex G-25.

Não foi possível detectar a atividade da glutamina sintetase em extratos dessalinizados de folha, vagem e semente, pela reação sintetase. Como foi descrito anteriormente, isto pode ser devido a ação da ATPase que utiliza o ATP necessário para a reação sintetase.

A atividade da glutamina sintetase foi determinada pela reação transferase em extratos enzimáticos dessalinizados. As curvas que associam absorvância e tempo mostram uma faixa linear entre zero e 30 minutos de reação, nas várias alíquotas testadas para folha (figura 16A, página 55), vagem (figura 16B, página 55) e semente (figura 17A, página 56). A atividade enzimática foi proporcional às quantidades de extrato utilizadas e ao tempo de reação (figura 17B, página 56).

Este procedimento foi considerado adequado para medir a atividade da glutamina sintetase nestes tecidos durante o desenvolvimento reprodutivo da planta. Ela será medida pela reação transferase, utilizando-se uma alíquota de 0,2 ml do extrato enzimático dessalinizado e tempo de reação de 20 minutos.

2.4. Glutamato desidrogenase

2.4.1. Determinação da atividade da glutamato desidrogenase em extratos dessalinizados

Para medir a atividade da glutamato desidrogenase, foi feito um estudo da atividade enzimática de extratos de folha (figura 18A, página 57), vagem (figura 18B, página 57) e semente (figura 19A, página 59) em função do tempo de incubação. As curvas indicam que a atividade da enzima pode ser obtida dentro da faixa de absorvância de zero a 0,2, em relação ao controle (tempo zero). A absorvância no tempo

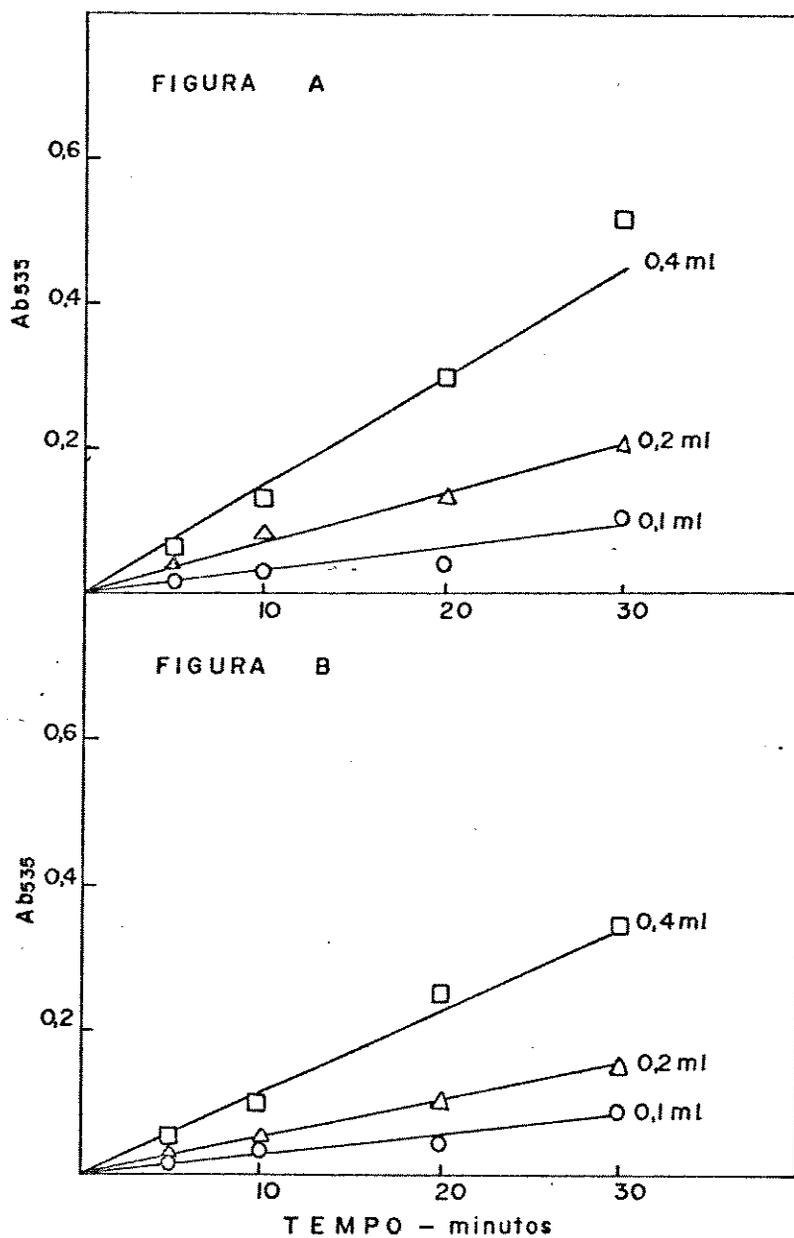


FIGURA 16 - Atividade da glutamina sintetase em folha (figura 16A) e em vagem (figura 16B) avaliada pela reação transferase, em diferentes quantidades de extrato enzimático extraídas com meio específico e dessalinizadas em colunas de Sephadex G-25.

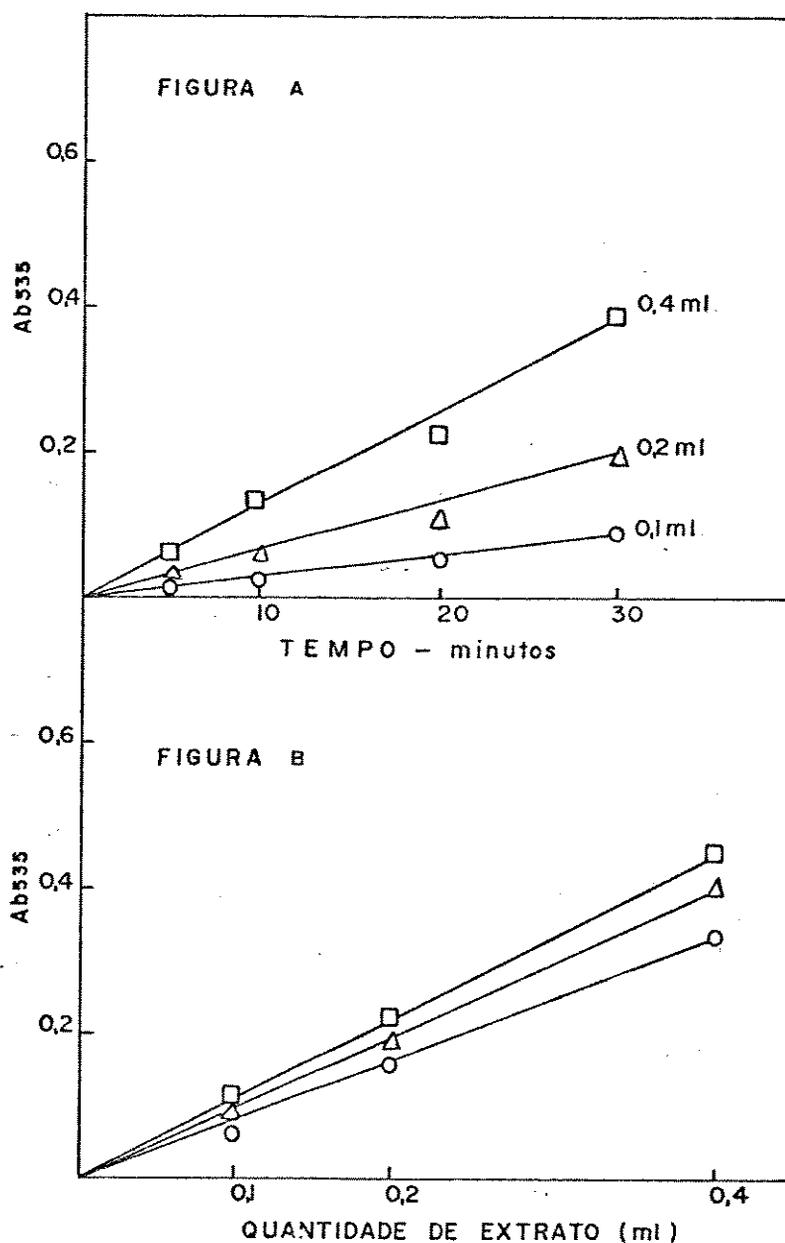


FIGURA 17A - Atividade da glutamina sintetase em semente avaliada pela reação transferase, em diferentes quantidades de extrato enzimático extraídas com meio específico e dessalinizadas em colunas de Sephadex G-25.

FIGURA 17B - Atividade da glutamina sintetase em diferentes quantidades de extrato enzimático de folha (-□-), vagem (-○-) e semente (-△-) após 30 minutos de reação.

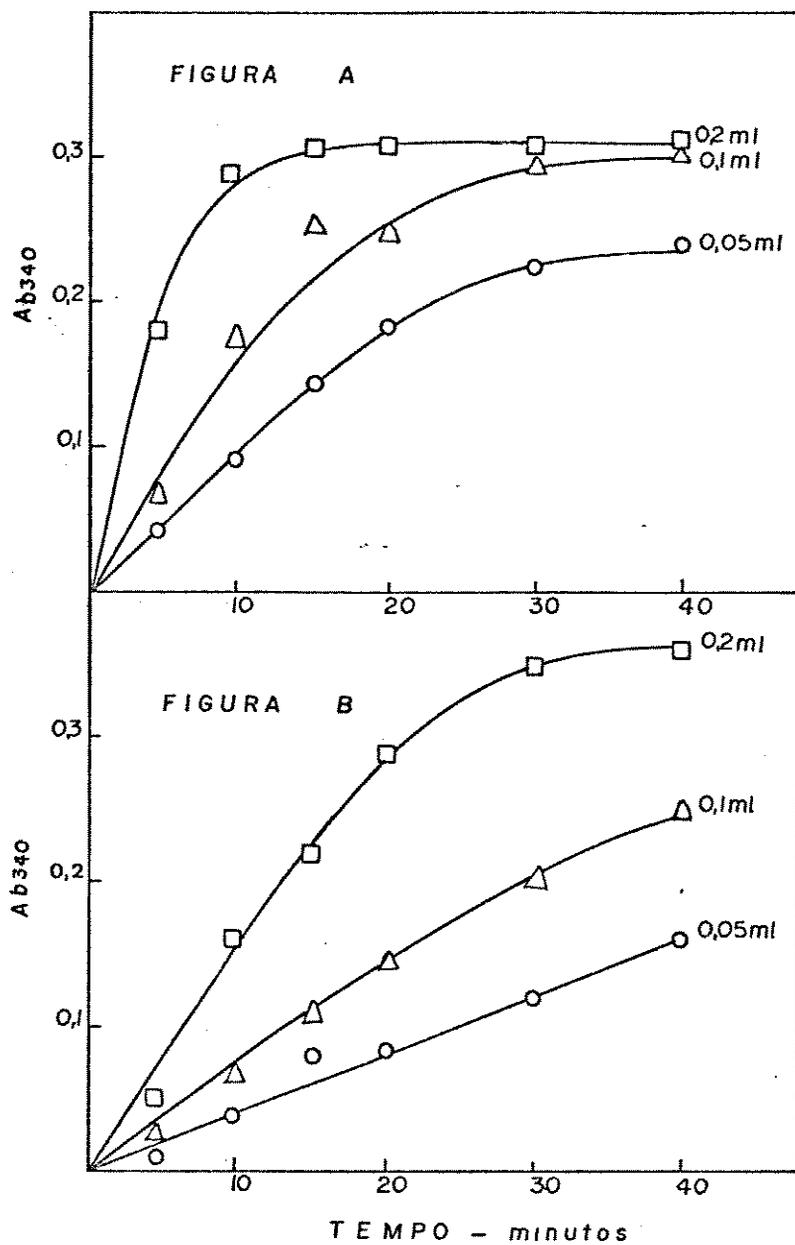


FIGURA 18 - Atividade da glutamato desidrogenase em folha (figura 18A) e em vagem (figura 18B) em diferentes quantidades de extrato enzimático.

zero foi aproximadamente 0,6. O intervalo de tempo no qual a oxidação do NADH foi linear dependeu da quantidade de extrato enzimático utilizado.

A figura 19B (página 59) mostra que a atividade na folha e na semente foi proporcional à quantidade de extrato, até 5 minutos de incubação, e até 10 minutos para a vagem. Os resultados indicam que esses extratos dessalinizados para a determinação da atividade da glutamina sintetase também podem ser utilizados para medir a atividade da glutamato desidrogenase.

3. Medida do peso fresco e do conteúdo de clorofila, nitrogênio α -amino e da proteína em folha, vagem e semente, durante o desenvolvimento reprodutivo da planta.

3.1. Peso fresco

As determinações de peso fresco da folha, vagem e semente estão representadas na figura 20 (página 60). A vagem atinge o comprimento máximo (aproximadamente 4,5 cm) aos 28 dias após a floração e o máximo peso fresco aos 36 dias. Estes dados mostram que a vagem já se encontra totalmente desenvolvida antes da fase de crescimento rápido da semente (39 a 60 dias após a floração). A diminuição em peso fresco da folha e da vagem inicia-se no período de crescimento intensivo da semente.

3.2. Clorofila

O conteúdo de clorofila nos tecidos de folha e de vagem (figura 21, página 61) começa a declinar aos 33 e 42 dias após a floração, respectivamente, indicando que nesses estágios os órgãos entram em senescência. Aos 72 dias, a folha se destaca da planta e aos 78 dias, as vagens apresentam-se secas e contêm sementes maduras.

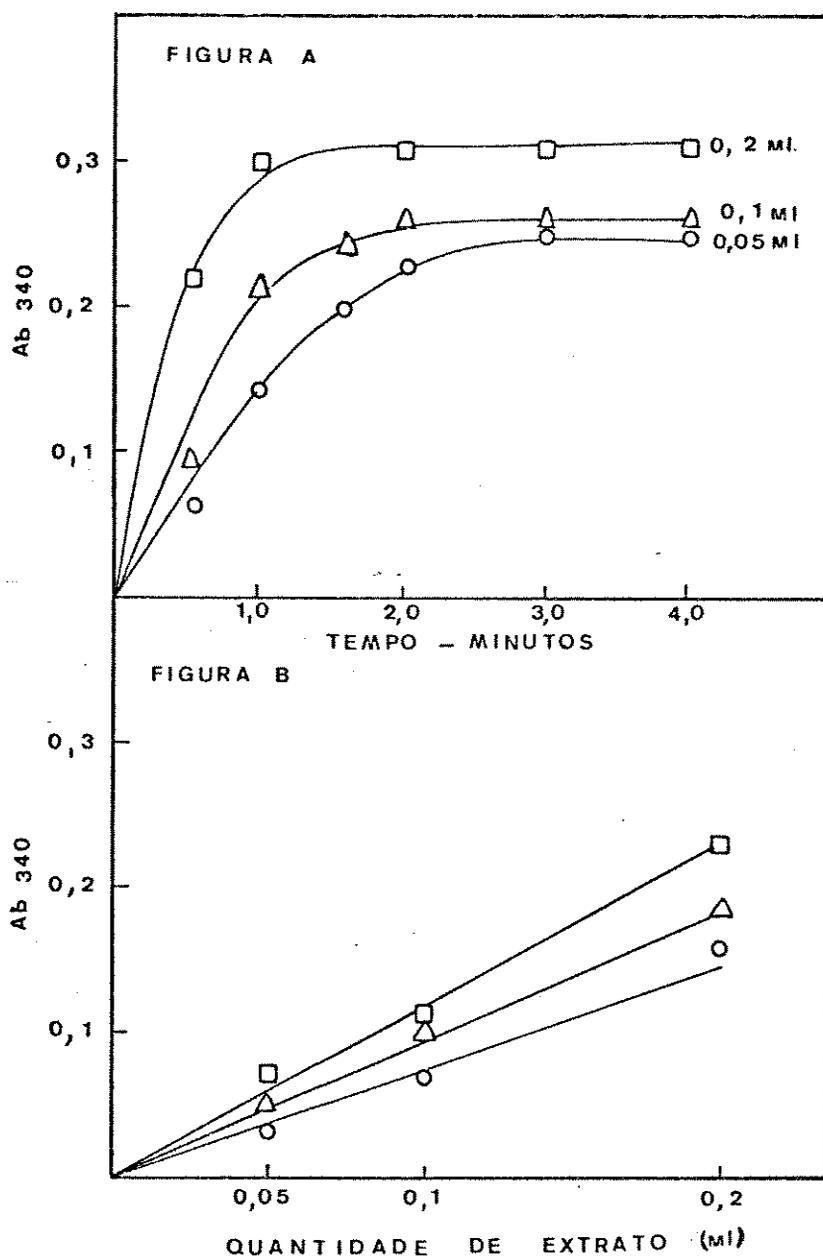


FIGURA 19A - Atividade da glutamato desidrogenase em diferentes quantidades de extrato enzimático de semente.

FIGURA 19B - Atividade da glutamato desidrogenase em diferentes quantidades de extrato enzimático de folha (—△—) e de semente (—□—) após 5 minutos de reação e de vagem (—○—) após 10 minutos de reação.

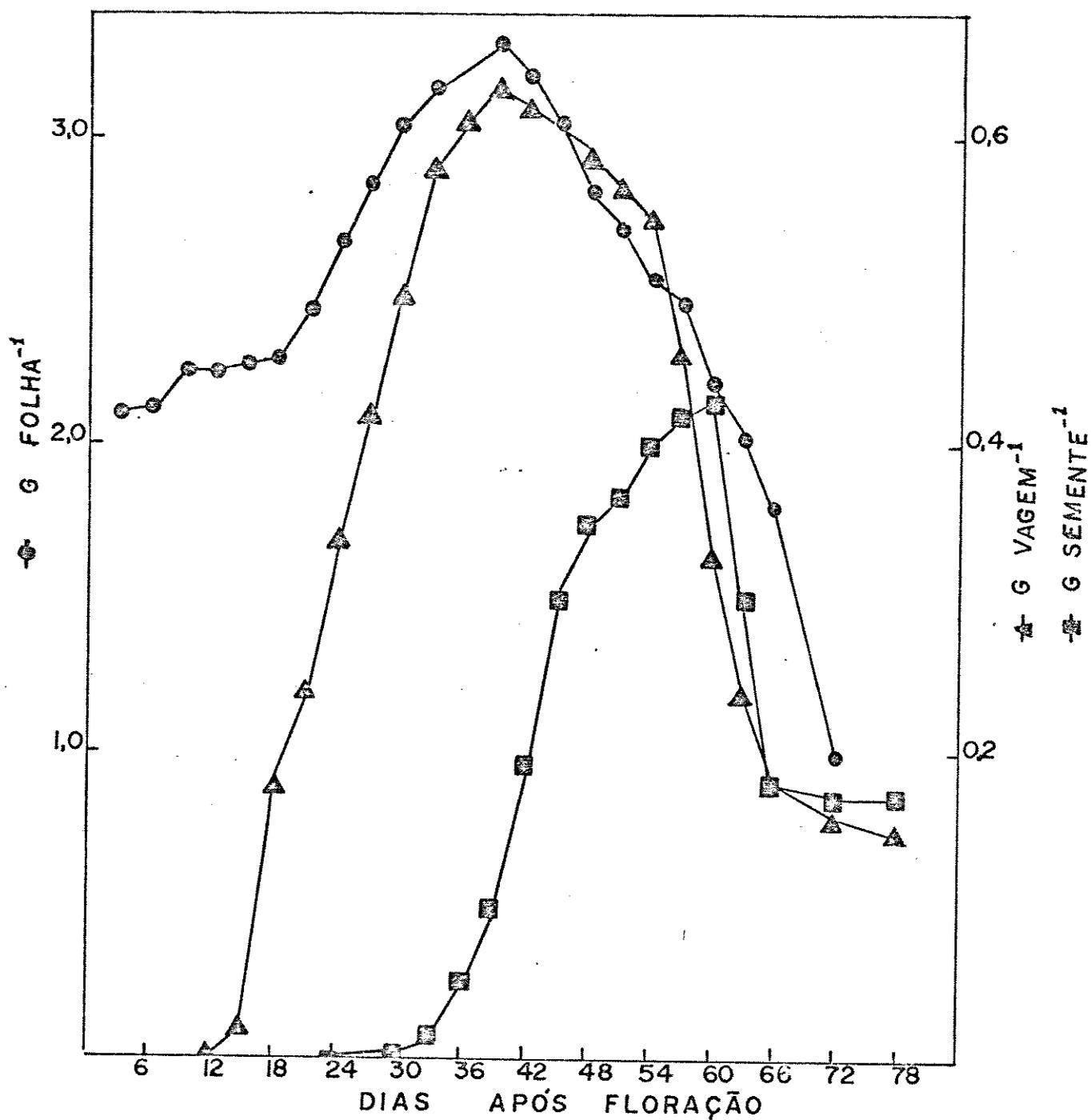


FIGURA 20 - Alterações no peso fresco da folha, vagem e semente após a floração.

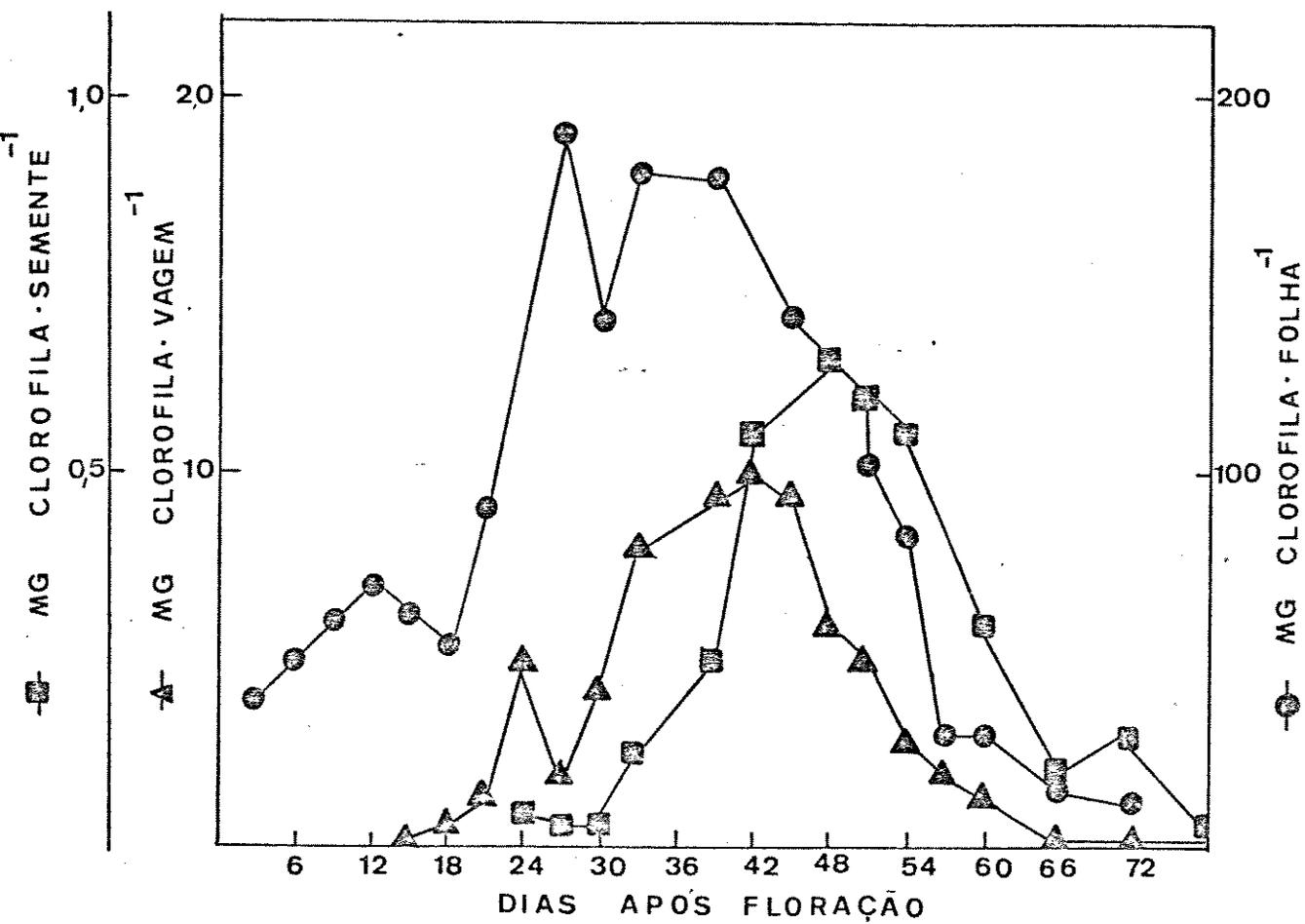


FIGURA 21 - Alterações no conteúdo de clorofila da folha, vagem e semente após a floração.

3.3. Proteína

A figura 22 (página 63) mostra as alterações no conteúdo de proteína da folha, vagem e semente. O acúmulo de proteína na folha ocorre até 27 dias após a floração (180 mg de proteína/folha) declinando a seguir. Na vagem, o acúmulo se dá entre 21 e 33 dias após a floração, atingindo um máximo de 25 mg de proteína. Na semente, o acúmulo ocorre entre 24 e 42 dias após a floração, permanecendo constante até a maturação (70 mg de proteína/semte). O acúmulo de proteína na semente ocorre durante o período de declínio de proteína na folha e vagens, sugerindo que esses órgãos podem fornecer compostos nitrogenados para a semente em desenvolvimento.

3.4. Nitrogênio α -amino

O conteúdo de nitrogênio α -amino (figura 23, página 64) aumenta até 33 dias após a floração na folha (3,5 mg), e até os 39 dias na vagem (0,75 mg). Com a diminuição do conteúdo de proteína na folha e vagem (figura 22) não ocorre aumento da quantidade de nitrogênio α -amino nesses órgãos, mostrando que esses aminoácidos são exportados para outros locais da planta. O aumento de nitrogênio α -amino na semente ocorreu ao tempo em que sua concentração diminuiu na folha e vagem.

Comparando as curvas de nitrogênio α -amino com as de proteína da semente, verificamos que o acúmulo de aminoácidos ocorre quando cessa o acúmulo de proteína. Isto indica que, na semente, os aminoácidos são, inicialmente, utilizados na síntese de proteínas.

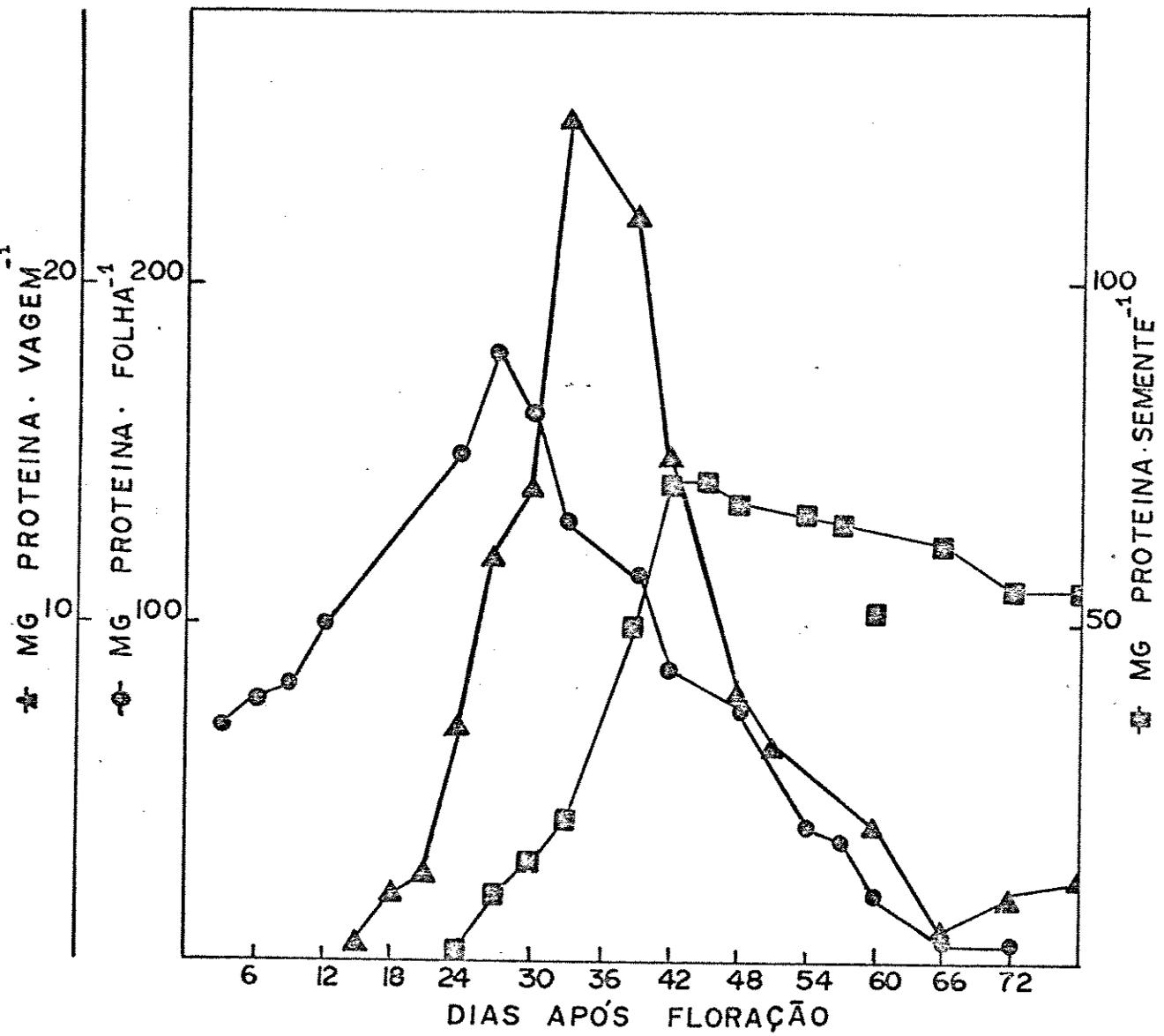


FIGURA 22 - Alterações no conteúdo de proteína na folha, vagem e na semente após a floração.

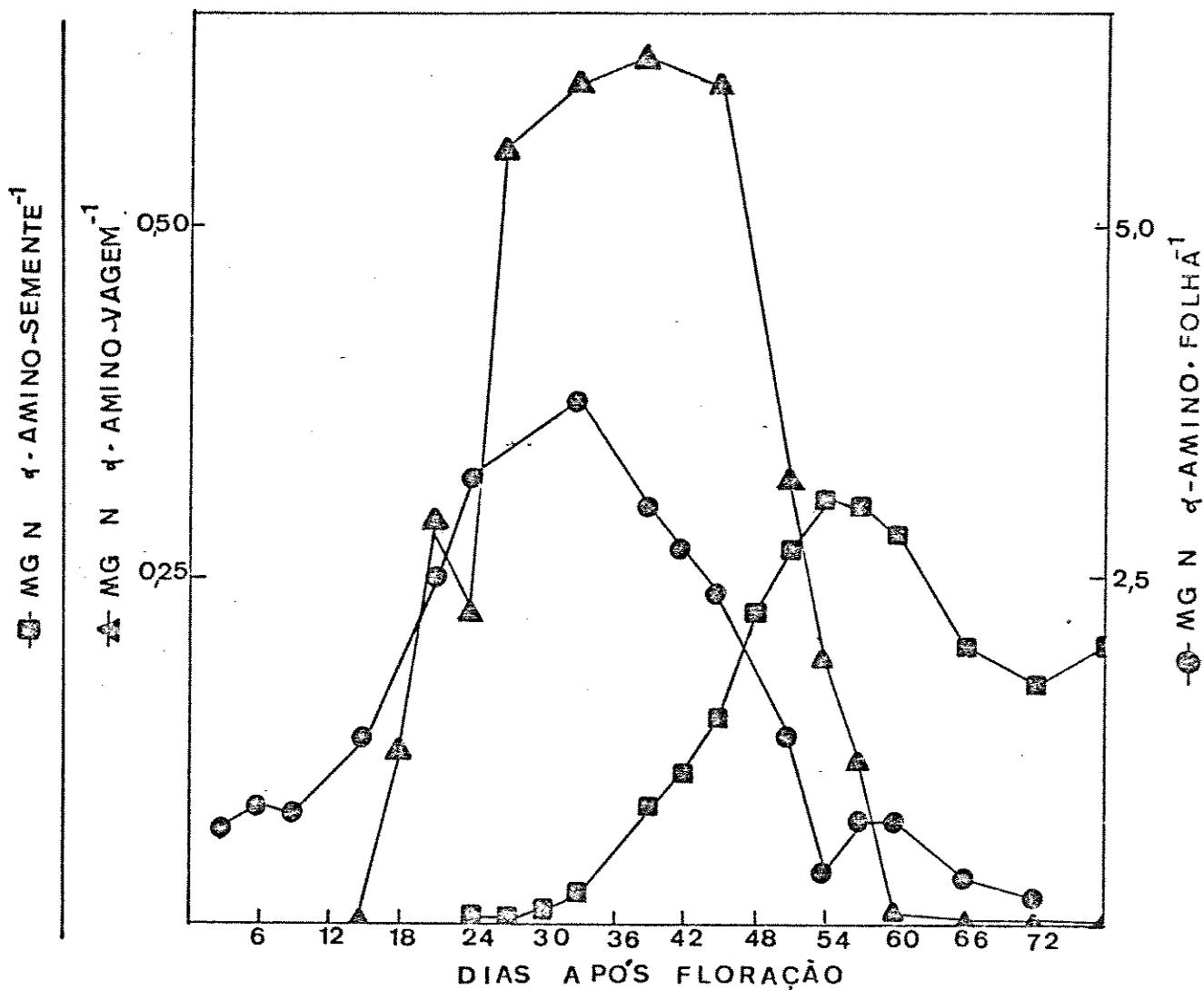


FIGURA 23 - Alterações no conteúdo de nitrogênio α -amino na folha, vagem e semente após a floração.

4. Medida das atividades da redutase de nitrato, glutamina sintetase e da glutamato desidrogenase em folha, vagem e em semente, durante o desenvolvimento reprodutivo da planta.

4.1. Redutase de nitrato

A redutase de nitrato na folha, medida pelo método in vitro e in vivo durante o desenvolvimento reprodutivo (figura 24, página 66), mostra um padrão semelhante de atividade permanecendo mais ou menos constante até 45 dias após a floração, declinando a seguir.

A figura 25 (página 67) mostra que a atividade da redutase de nitrato começa a diminuir na mesma época em que cessa o acúmulo de proteína na semente. Isto indica que a folha pode fornecer o nitrogênio reduzido que a semente necessita durante a fase de síntese de proteína.

A vagem mostra uma baixa atividade para a redutase de nitrato (figura 24) que permanece constante até 60 dias após a floração. Desse modo, a sua contribuição em nitrogênio reduzido para a semente é muito pequena em comparação à folha.

SCHLESIER (1977a) mediu a atividade da redutase de nitrato em vagens de algumas leguminosas. A atividade da redutase de nitrato em vagens com 10 a 20 dias de idade foi de 92,6 $\text{nmol NO}_2^-/\text{gPF/h}$ para Phaseolus vulgaris cultivar Saxa, 65 $\text{nmol NO}_2^-/\text{gPF/h}$ para Vigna sinensis ssp sinensis, e de 41 $\text{nmol NO}_2^-/\text{gPF/h}$ para Vicia faba cultivar Wagners perfecta.

A semente é incapaz de reduzir o nitrato porque não possui atividade da redutase de nitrato, dependendo assim de outras fontes de nitrogênio para a síntese de proteína.

SCHLESIER (1977a) não encontrou atividade para a redutase de nitrato em sementes de Phaseolus vulgaris e de Vigna sinensis. Em Vicia faba, a atividade encontrada na testa mais cotilédone foi de 67 $\text{nmol NO}_2^-/\text{gPF/h}$.

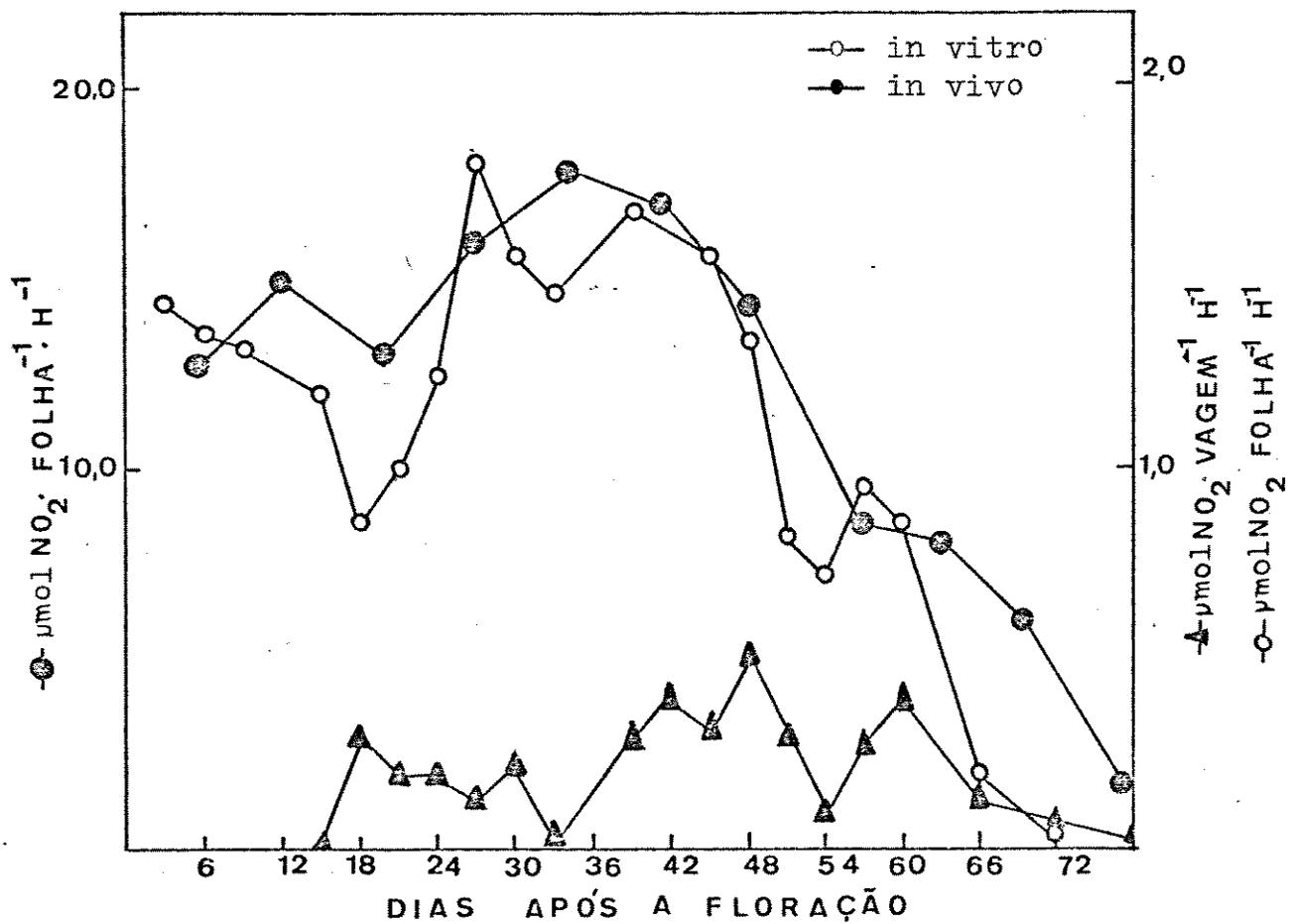


FIGURA 24 - Atividade da redutase de nitrato avaliada pelo método in vivo e in vitro na folha e pelo método in vivo na vagem, após a floração.

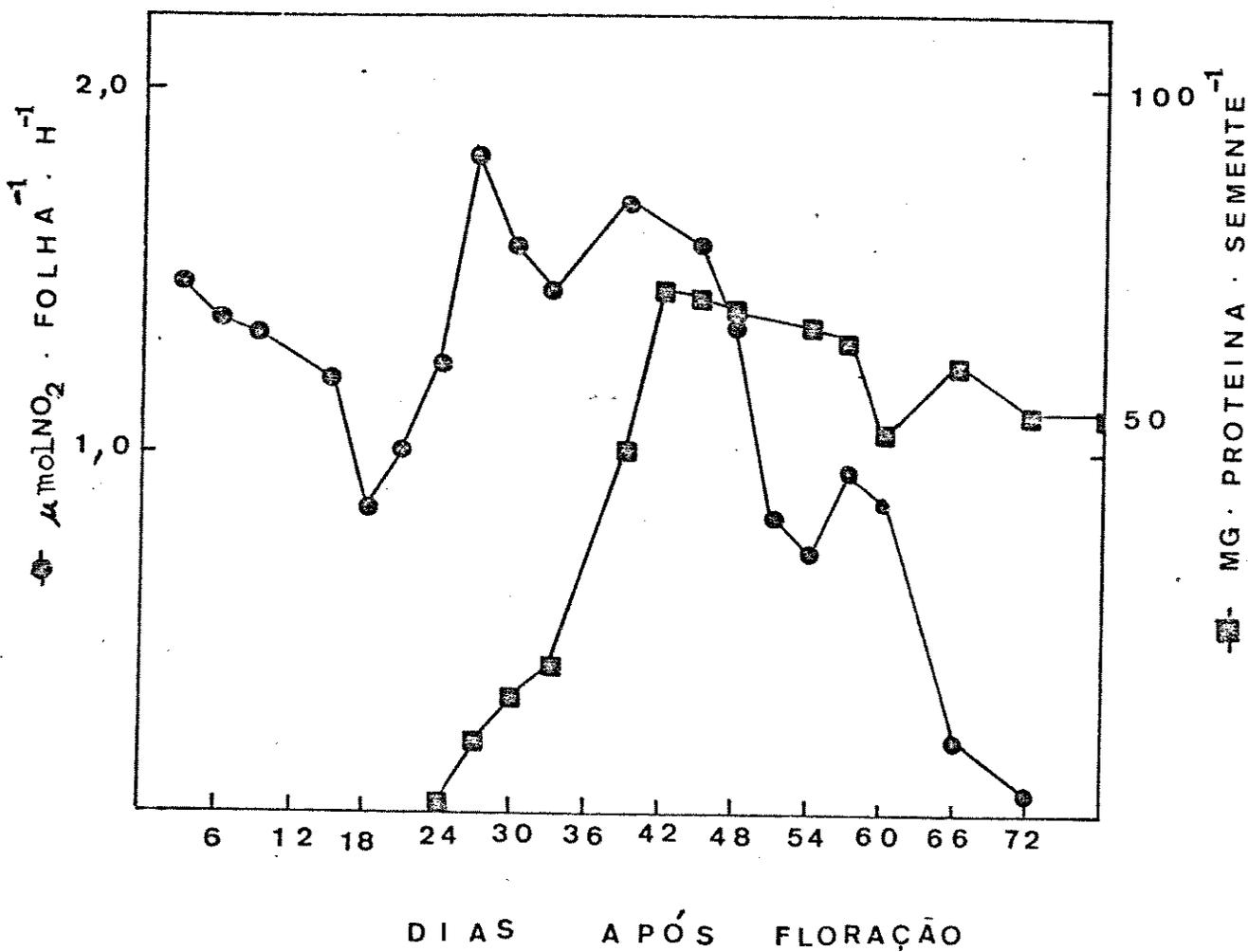


FIGURA 25 - Atividade da redutase de nitrato na folha e conteúdo de proteína na semente durante os 78 dias que sucederam a floração.

4.2. Glutamina sintetase

A atividade da glutamina sintetase na folha (figura 26, página 69), aumenta com o aparecimento das vagens e das sementes, atingindo um máximo de 600 μ moles de γ -glutamil hidroxamato/folha/hora, 45 dias após a floração. Na vagem, a atividade aumenta até 30 dias após a floração, permanecendo constante até 54 dias (25 μ moles de γ -glutamil hidroxamato/vagem/hora). A semente apresenta maior atividade para a glutamina sintetase que a vagem, atingindo 70 μ moles de γ -glutamil hidroxamato/semente/hora. Após essa data, a atividade começa a cair, chegando a 20 μ moles de γ -glutamil hidroxamato/semente/hora, até a maturação da semente.

As atividades da glutamina sintetase não seguem o mesmo padrão da redutase de nitrato, embora a enzima deva estar envolvida na assimilação do nitrogênio inicialmente reduzido pela reação catalizada pela redutase de nitrato. É possível que a atividade da glutamina sintetase tenha outra função, além de atuar em conjunto com a redutase de nitrato. No caso da folha, a glutamina sintetase apresenta um pico elevado de atividade que corresponde à fase de mobilização de proteína, e portanto, poderá exercer a função de transformar o nitrogênio dos aminoácidos deaminados e liberados durante a proteólise, em glutamina que poderá ser translocada para outros locais da planta. Na semente, onde não há redução de nitrogênio, a glutamina sintetase deve funcionar exclusivamente na assimilação da amônia gerada a partir de asparagina, que é a principal forma de nitrogênio transportado em leguminosas.

Além dessas funções, a glutamina sintetase pode ser importante na utilização da amônia derivada de outros compostos nitrogenados (ex. ureídeos) formados na fixação de nitrogênio. Em soja, os ureídeos foram as principais formas de nitrogênio coletado no caule após a floração (STREETER, 1979).

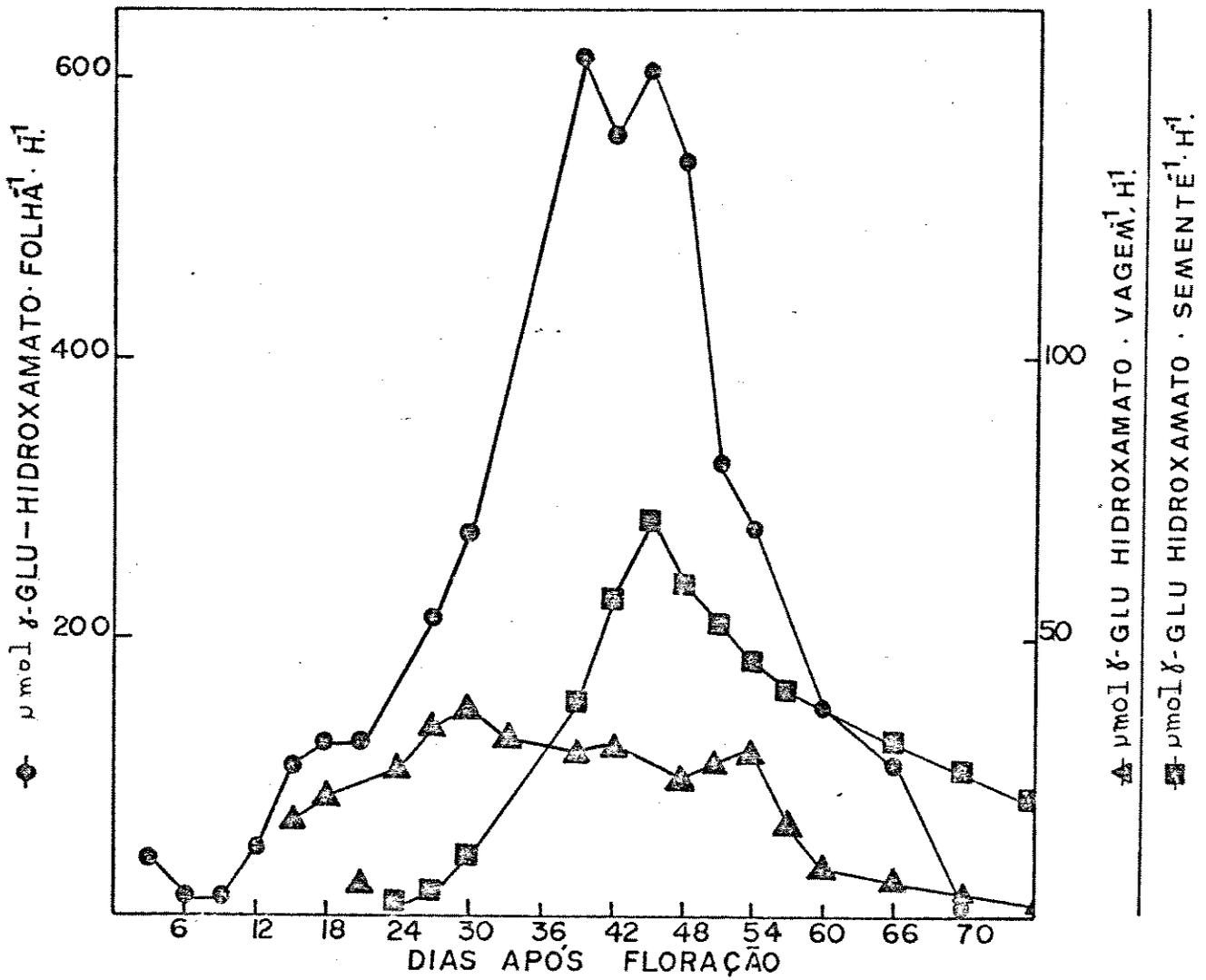


FIGURA 26 - Alterações na atividade da glutamina sintetase na folha, vagem e semente após a floração.

4.3. Glutamato desidrogenase

A atividade da glutamato desidrogenase (figura 27, página 71) atinge na folha um pico aos 33 dias após a floração (19 μ moles de NADH oxidado/folha/hora) e aos 45 dias na vagem (1,8 μ moles de NADH oxidado/vagem/hora). Na semente, o pico foi atingido aos 33 dias após a floração (3,9 μ moles de NADH oxidado/sememente/hora) caindo, em seguida, ao nível de 0,75 μ moles de NADH na semente madura.

5. Estimativa da quantidade de nitrogênio reduzido pelas reações catalizadas pelas enzimas redutase de nitrato, glutamina sintetase e glutamato desidrogenase.

Para melhor avaliar a contribuição relativa das reações enzimáticas envolvidas no fornecimento de nitrogênio reduzido para os diferentes órgãos presentes nas plantas durante a fase de desenvolvimento reprodutivo, foi calculada a quantidade de nitrogênio produzida durante 14 horas (período de exposição das plantas à luz). A quantidade de nitrogênio (tabela 7) foi estimada a partir dos dados de atividade média apresentada pela redutase de nitrato, glutamina sintetase e glutamato desidrogenase, durante a fase de aumento de proteína na semente.

A atividade da redutase de nitrato na folha e na vagem, determinada pelo método in vitro, mostra que a contribuição da vagem no fornecimento de nitrogênio reduzido é muito menor que a da folha (tabela 6). A atividade da redutase de nitrato in vivo na vagem é responsável pela redução de apenas 10% do nitrogênio processado pela folha.

A capacidade da folha em reduzir o nitrato deve ser importante para o acúmulo de nitrogênio na semente, pois ela processa 2,3 mg de nitrogênio/dia, o que equivale a 1/3 do nitrogênio acumulado na semente (6,6 mg N/dia), tabela 7.

Além do nitrogênio processado pela atividade da redutase de nitrato, a folha e a vagem podem contribuir também com o nitrogênio que é degradado e liberado durante o acúmulo

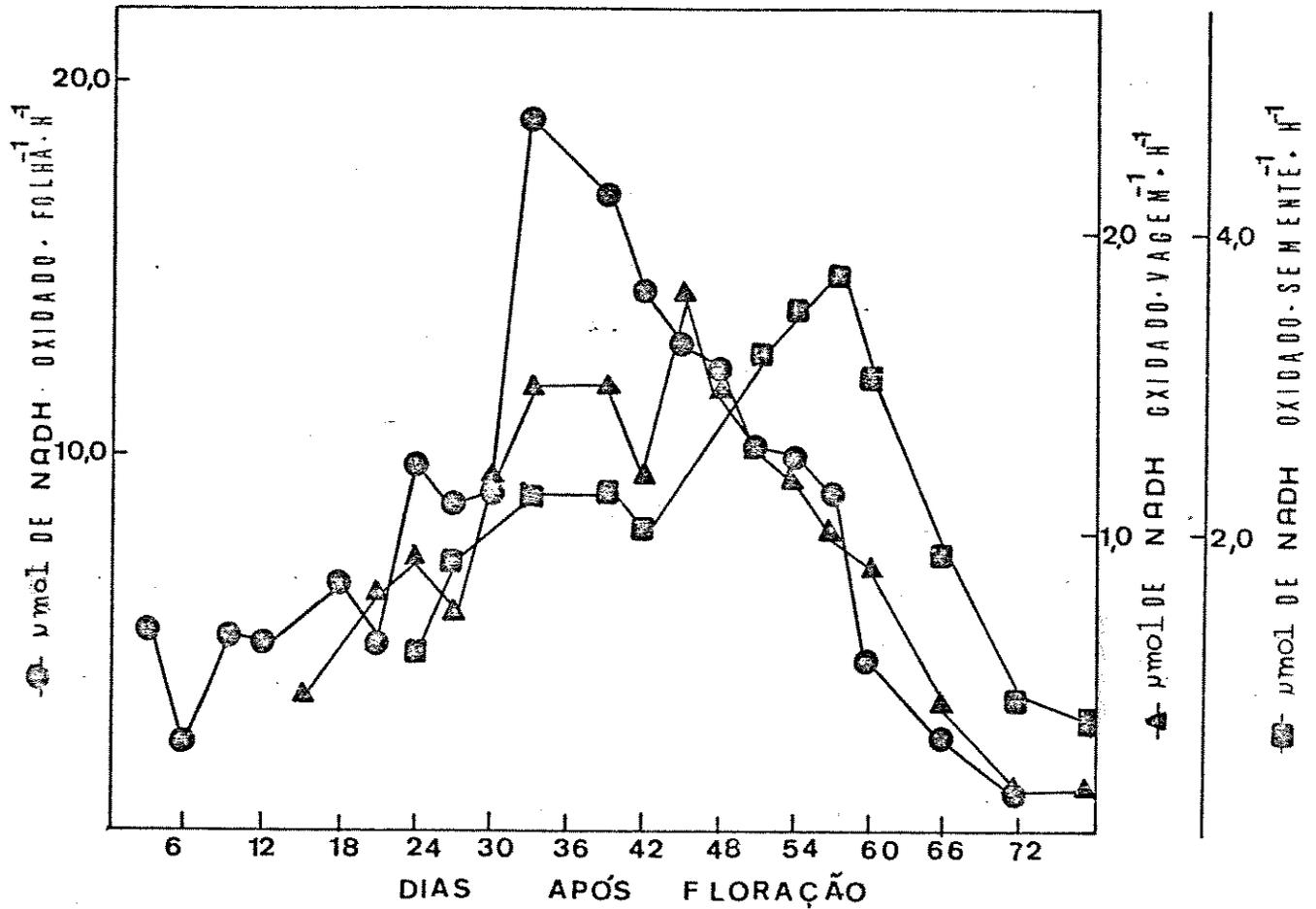


FIGURA 27 - Atividade da glutamato desidrogenase na folha, vagem e semente após a floração.

	NR		GS	GHD
	<u>in vivo</u>	<u>in vitro</u>		
	mg N/14 h	mg N/14 h	mg N/14 h	mg N/14 h
FOLHA	2,3	0,2	6,86	2,35
VAGEM	0,2	0,006	2,12	1,00
SEMENTE	-	-	5,60	3,92

(-) não possui atividade para a redutase de nitrato

TABELA 6 - Quantidade de nitrogênio (mg) processado pelas enzimas redutase de nitrato (NR), glutamina sintetase (GS) e glutamato desidrogenase (GDH) por 14 horas, na folha e nas 4 vagens e 8 sementes localizadas no 7º nó da planta.

	PROTEÍNA	NITROGÊNIO α :AMINO
	mg N/dia	mg N/dia
FOLHA	1,2	0,21
VAGEM	0,64	0,116
SEMENTE	6,6	0,076

TABELA 7 - Quantidade de proteína e α -amino nitrogênio acumulado por dia durante a fase de acúmulo de nitrogênio na folha, e nas 4 vagens e 8 sementes do 7º nó, após a floração.

de proteína na semente. A quantidade de nitrogênio degradada durante a fase de síntese de proteína na semente foi de 0,83 mg N/dia, na folha e de 0,18 mg N/dia, na vagem.

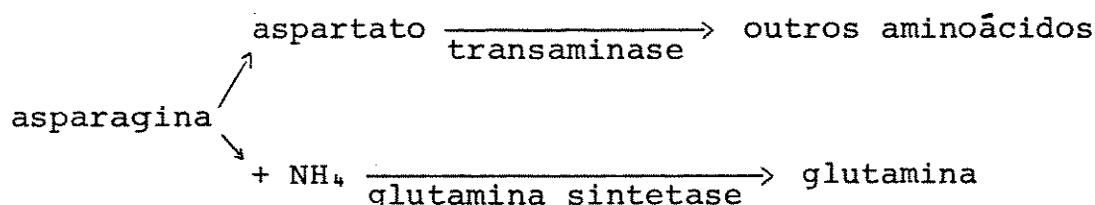
STOREY e BEEVERS (1977) mediram a atividade proteolítica na folha e na vagem durante o desenvolvimento da semente de Pisum sativum e demonstraram a importância destas enzimas como fornecedoras de precursores para a síntese de proteína na semente.

A quantidade de nitrogênio processado na folha e na vagem, pela reação catalizada pela redutase de nitrato e pela degradação de proteína combinadas, contribui com a metade (3,3 mg N/dia) do nitrogênio requerido pela semente.

A folha apresenta atividade para glutamina sintetase superior àquela da vagem e semente (tabela 6). A atividade da glutamina sintetase nesses tecidos excede àquela necessária para assimilar todo o nitrogênio processado pela redutase de nitrato, o que indica que a enzima pode utilizar o nitrogênio proveniente de outras fontes, como discutido acima.

A quantidade de nitrogênio produzido na reação catalizada pela glutamina sintetase na semente foi calculada para o período de 14 horas de luz (5,6 mg N/14 h), mas sabe-se que este tecido pode apresentar atividade de glutamina sintetase durante o período de luz e escuro (9,6 mg N/24 h). A atividade é suficientemente alta para processar todo o nitrogênio acumulado na semente, mesmo considerando que todo esse nitrogênio tenha sido transportado até a semente na forma de asparagina.

A asparagina na semente é provavelmente utilizada de acordo com o seguinte esquema:



A utilização de uma molécula de asparagina libera, portanto, uma molécula de amônia, que deve ser utilizada para

a formação de glutamina através da ação da glutamina sintetase. Desse modo, a glutamina sintetase teria que processar a metade do nitrogênio acumulado na semente por dia (3,3 mg N).

Embora a principal via de assimilação de amônia ocorra via glutamina sintetase em plantas superiores (LEA e MIFLIN, 1974; LEWIS e PROBYN, 1978), a atividade da glutamato desidrogenase foi determinada em folha, vagem e semente. Isto foi feito para explicar a assimilação de amônia, caso a glutamina sintetase não apresentasse atividade satisfatória em algum destes tecidos.

A atividade da glutamina sintetase nesses tecidos foi suficientemente alta para processar todo o nitrogênio reduzido pela redutase de nitrato e ainda utilizar o nitrogênio de outras fontes.

IV. CONCLUSÕES

1. A semente não tem capacidade para reduzir o nitrato e portanto depende totalmente de outras fontes de nitrogênio reduzido.

2. A vagem tem capacidade para reduzir o nitrato, porém ela é muito baixa em relação à folha.

3. A folha é uma fonte importante de nitrogênio reduzido para a semente através da redução do nitrato e do nitrogênio armazenado na folha, antes do crescimento das sementes. A vagem também faz uma contribuição neste sentido, entretanto, a maior parte do nitrogênio nela armazenado veio da folha. Além da folha do nó floral, devem existir outras fontes de nitrogênio que poderão ser utilizadas pela semente.

4. A glutamina sintetase da folha e da vagem, em virtude de sua alta atividade, deve funcionar para processar o nitrogênio reduzido proveniente de outras fontes, além daquele gerado in situ pela redutase de nitrato.

5. A atividade da glutamina sintetase na semente é suficientemente alta para processar todo o nitrogênio recebido por este órgão.

V. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi obter informações quanto a contribuição da folha e da vagem no fornecimento de nitrogênio reduzido para a síntese de aminoácidos e proteínas na semente da planta de soja.

Para esse estudo foi determinada a atividade das enzimas redutase de nitrato, glutamina sintetase e glutamato desidrogenase na folha, vagem e semente. Essas enzimas estão envolvidas na redução e assimilação de nitrogênio nesses órgãos. Foi determinado também o conteúdo de nitrogênio α -amino e de proteína.

Inicialmente foi realizado um experimento para verificar qual sistema folha-vagem-semente seria o mais adequado para as determinações bioquímicas. Isso foi feito através da remoção de diferentes folhas e/ou frutos da planta no início da floração para verificar a contribuição de cada folha para o desenvolvimento das vagens e sementes inseridas no nó adjacente e nos nós localizados acima ou abaixo no caule. Apenas os órgãos situados no 5º, 6º, 7º e 8º nós foram estudados, os órgãos situados no 1º, 2º, 3º, 4º e 9º nós foram removidos da planta no início da floração. Os resultados mostraram que a folha do 7º e 8º nós além da nutrição dos seus frutos são capazes de nutrir quando necessário, os frutos do 5º e 6º nós. Os órgãos (folha, vagem e semente) do 7º nó foram escolhidos para as determinações bioquímicas.

A atividade da redutase de nitrato pode ser determinada pelos métodos in vivo e in vitro. A atividade da redutase de nitrato in vivo ($5,61 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g PF}^{-1}$) na folha foi maior que a atividade medida pelo método in vitro ($2,04 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g PF}^{-1}$). Na vagem a atividade da redutase de nitrato não foi detectada pelo método in vitro. Pelo método in vivo a atividade foi de $0,09 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g PF}^{-1}$. No cotilédone e casca da semente não foi possível detectar a atividade enzimática por quaisquer desses métodos.

A ausência de atividade da redutase de nitrato em extratos de vagens e sementes não foi devido a presença de inibidores, uma vez que misturas de extratos desses tecidos com o

extrato enzimático da folha não alterou a atividade deste último. Foi demonstrado também que os fatores luz, NO_3 e energia, normalmente necessários para a máxima atividade da redutase de nitrato, não estavam limitando a expressão da atividade dessa enzima.

A atividade da glutamina sintetase e da glutamato desidrogenase em folha, vagem e semente foi determinada utilizando-se preparações enzimáticas que foram dessalinizadas em colunas de Sephadex G-25 para a remoção de inibidores endógenos. Todos esses órgãos apresentaram atividade para essas duas enzimas.

O peso fresco da folha, vagem e semente foi determinado durante a fase reprodutiva da planta. Os resultados mostraram que a vagem já se encontra totalmente desenvolvida antes da fase de crescimento rápido da semente (39 a 60 dias após a floração). A diminuição em peso fresco da folha e da vagem iniciou no período de crescimento intensivo da semente.

O acúmulo de proteína na folha ocorreu até 27 dias após a floração (180 mg de proteína/folha). Na vagem o acúmulo se deu entre 21 a 33 dias após a floração atingindo 25 mg de proteína. Na semente o acúmulo ocorreu entre 24 e 42 dias após a floração permanecendo constante até a maturação (70 mg de proteína/sememente). A síntese de proteína na semente ocorreu durante o período de declínio de proteína na folha e vagem indicando que esses órgãos podem fornecer compostos nitrogenados para a semente em desenvolvimento.

O conteúdo de nitrogênio α -amino aumentou até 33 dias após a floração na folha (3,5 mg) e até 39 dias na vagem (0,75 mg de nitrogênio α -amino/vagem). Com a diminuição do conteúdo de proteínas na folha e na vagem não ocorreu aumento da quantidade de nitrogênio α -amino nesses órgãos, mostrando que esses aminoácidos foram exportados para outros locais da planta. O acúmulo de aminoácidos na semente ocorreu quando cessou o acúmulo de proteína pois inicialmente os aminoácidos foram utilizados na síntese de proteína.

A atividade da redutase de nitrato na folha (ca 18 $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{h} \cdot \text{g PF}^{-1}$) permaneceu constante até 45 dias após a floração e depois declinou. A atividade da redutase de nitrato começa a diminuir no mesmo período em que cessa o acúmulo de

proteína na semente indicando que a redução do nitrato na folha pode ser importante no fornecimento de nitrogênio reduzido para a semente.

A vagem mostrou uma baixa atividade para a redutase de nitrato (ca $0,2 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g PF}^{-1}$) que permaneceu constante até 60 dias após a floração.

A atividade da glutamina sintetase na folha com o aparecimento das vagens e sementes atingindo 600 $\mu\text{moles de } \gamma\text{-glutamil hidroxamato/h/folha}$, 45 dias após a floração. Na vagem a atividade aumenta até 30 dias após a floração permanecendo constante até 54 dias (25 $\mu\text{moles de } \gamma\text{-glutamil hidroxamato/h/vagem}$). Na semente a atividade alcançou 70 $\mu\text{moles de } \gamma\text{-glutamil hidroxamato/h/semente}$ aos 45 dias após a floração e depois declinou até 20 μmoles que permaneceu na semente madura.

A atividade da glutamato desidrogenase atinge o pico aos 33 dias após a floração na folha (19 $\mu\text{moles de NADH oxidado/h/folha}$) e aos 45 dias na vagem (1,8 $\mu\text{moles NADH oxidado/h/vagem}$). Na semente o pico é atingido aos 33 dias após a floração (3,9 $\mu\text{moles de NADH oxidado/h/semente}$) e depois cai ao nível de 0,75 $\mu\text{moles de NADH}$ na semente madura.

A atividade da redutase de nitrato na folha e vagem determinada pelo método in vivo mostra que a vagem reduz apenas 10% do nitrogênio processado pela folha. A capacidade da folha em reduzir o nitrato deve ser importante em relação ao acúmulo de nitrogênio na semente, pois ela processa 2,3 mg de nitrogênio por dia o que equivale a 1/3 do nitrogênio acumulado na semente (6,6 mg N/dia).

Além do nitrogênio processado pela redutase de nitrato a folha e a vagem podem contribuir também com o nitrogênio que é degradado e liberado durante o acúmulo de proteína na semente. A quantidade de nitrogênio degradada nesses órgãos durante a fase de síntese de proteína na semente foi de 0,83 mg N/dia na folha e de 0,18 mg N/dia na vagem.

A quantidade de nitrogênio processada na folha e na vagem pela redutase de nitrato e pela degradação de proteína contribuíram com a metade (3,3 mg N/dia) do nitrogênio exigido pela semente.

A atividade da glutamina sintetase na folha e na vagem excedeu a necessária para assimilar todo o nitrogênio processa-

do pela redutase de nitrato o que indica que a enzima pode utilizar o nitrogênio proveniente de outras fontes.

A quantidade de nitrogênio processado pela glutamina sintetase na semente foi 5,6 mg N/14 horas. Essa atividade é suficientemente alta para processar todo o nitrogênio acumulado na semente.

A conclusão principal foi que a semente é totalmente dependente de outras fontes de nitrogênio reduzido, sendo que a contribuição da folha no fornecimento desse nitrogênio é muito maior que a da vagem.

VI. SUMMARY

The objective of the present investigation was to obtain information on the relative contribution of the leaf and pod of the soybean plant in the supply of reduced nitrogen for the synthesis of amino acids and protein in the seed.

For this study, the activities of nitrate reductase, glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase were determined in the leaf, pod and seed during the fruit development stage. These enzymes are involved in the reduction and assimilation of nitrogen in the plant. The amino acid and protein contents were also determined.

An experiment was carried out to determine which system of leaf-pod-seed would be most adequate for this investigation. The contribution of each leaf to the development of the pods and seed of the same node and of those on nodes immediately above or below was investigated by removal of different leaves and/or fruits on flower initiation. Only those organs situated on the 5th, 6th, 7th and 8th nodes were used, while those of the 1st, 2nd, 3rd and 4th nodes were removed on flowering. The results showed that the leaves of the 7th and 8th nodes can, as well as supplying their own fruits, supply the fruits of the 5th and 6th nodes. The system leaf-pod-seed of the 7th node were chosen for the biochemical determinations.

The activity of nitrate reductase can be determined either in vivo or in vitro. The in vivo activity of the leaf ($5.61 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g fwt}^{-1}$) was greater than in vitro ($2.04 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g fwt}^{-1}$). In the pod, no activity of nitrate reductase could be detected by the in vitro method, but by the in vivo method $0.09 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g fwt}^{-1}$ was recorded. It was not possible to detect activity of the enzyme in the cotyledons and seed coat by either of these methods.

The absence of nitrate reductase activity in extracts of pods and seeds was not due to the presence of inhibitors, since mixtures of extracts with the leaf extract did not change the activity recorded for the latter. It was also shown that light, nitrate, and energy, normally necessary for full nitrate reductase activity, were not limiting in this case.

The activities of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase of the leaf, pod and seed were determined with extracts desalted on Sephadex G-25 columns, to remove endogenous inhibitors. All organs presented activity of these two enzymes.

The fresh weight of the leaves, pods and seeds were determined during fruit development and the data showed that the pod is fully formed before the rapid phase of seed development (39 to 60 days after flowering). The increase in seed weight coincided with a decrease in fresh weight of the pod and leaf.

The accumulation of protein in the leaf occurred up to 27 days after flowering (180 mg protein per leaf), whereas in the pod protein was accumulated between 21 and 33 days, reaching 25 mg per pod. In the seed, protein accumulation was observed between 24 and 42 days after flowering, remaining constant up to maturity (70 mg per seed). Protein accumulation in the seed coincided with its breakdown in the leaf and pod, indicating that these structures could supply nitrogen to the developing seeds.

The α -amino nitrogen content increased up to 33 days after flowering in the leaf (3,5 mg) and up to 39 days in the pod (0,75 mg). During protein breakdown in the leaf and pod there was no increase in α -amino acids showing that they were transported out of these organs to other parts of the plant. The increase in amino acids the seed was only observed after the accumulation of protein had ceased since initially they were being used in protein synthesis.

The activity of nitrate reductase in the leaf (ca $18 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g fwt}^{-1}$) remained constant up to 45 days after flowering and then declined. The activity of nitrate reductase starts to fall at the same time as protein accumulation stops in the seeds, suggesting that nitrate reduction in the leaf could be important in supplying reduced nitrogen to the seed.

The pod presented a low activity (ca $0,2 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g f.wt}^{-1}$) for nitrate reductase which remained constant up to 60 days after flowering.

Leaf glutamine synthetase increased with the appearance

of the pods and seeds, reaching 600 μmol γ -glutamyl hydroxamate per hour per leaf, 45 days after flowering. In the pod, activity increased up to 30 days and then remained constant up to 54 days (25 μmol γ -glutamyl hydroxamate per hour per pod). In the seed activity reached 70 μmol γ -glutamyl hydroxamate per hour per seed at 45 days after flowering and then declined to 20 μmol in the mature seed.

Glutamate dehydrogenase activity reached a peak at 33 days after flowering in the leaf (19 μmol NADH per hour per leaf) and at 45 days in the pod (1,8 μmol NADH per hour per pod). In the seed a peak is reached at 33 days after flowering (3,9 μmol NADH per hour per seed) falling to 0,75 μmol NADH at maturity.

The in vivo activities of nitrate reductase in the leaf and pod show that the pods reduce only 10% of the nitrogen processed by the leaf. The capacity of the leaf for nitrate reduction must be important in the supply of nitrogen to the seed, since the leaf processes 2,3 mg nitrogen per day which is equivalent to 1/3 of the nitrogen accumulated in the seeds (6,6 mg N per day).

Besides the nitrogen processed by nitrate reductase in the leaf, the pod and the leaf can contribute also the nitrogen broken down and mobilized during protein accumulation in the seed. The quantity of nitrogen degraded during the stage of protein synthesis in the seed was 0,83 mg N per day in the leaf and 0,18 mg N per days in the pods.

The total nitrogen processed by nitrate reductase and liberated by degradation in the leaf and pod, together supply about half of the nitrogen (3,3 mg N per day) required by the seed.

The activity of glutamine synthetase in both the leaf and pod exceeds that necessary to assimilate all the nitrogen processed by nitrate reductase, showing that this enzyme could utilize nitrogen from other sources.

The amount of nitrogen processed by glutamine synthetase in the seed was 5,6 mg N per 14 hours, which is more than sufficient to process all the nitrogen accumulated in the seed.

The main conclusion was that the seed is totally dependent on other sources for reduced nitrogen, and that the leaf

contributes much more than the pod in the supply of this nitrogen.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ARNON, D.I. 1949. Copper enzymes in chloroplasts Polyphenol oxidases in Beta vulgaris. Plant Physiol, 24: 807-512.
- ARRUDA, P. e SILVA, W.J. 1979. Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncle. Phytochemistry, 18: 409-410.
- ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; SHARKEY, P.S. 1975. Asparagine metabolism - key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. Plant Physiol., 56: 807-812.
- BASHA, S.M.M. e BEEVERS, L. 1976. Glicoprotein metabolism in the cotyledon of Pisum sativum L. during development and germination. Plant Physiol., 57: 93-98.
- BAUER, A.; JOY, K.W. e URQUHART, A.A. 1977. Amino acid metabolism of pea leaves - labeling studies on utilization amides. Plant Physiol., 59: 920-924.
- BEEVERS, L. e HAGEMAN, R.H. 1969. Nitrate reduction in higher plants. Ann. Rev. of Plant Physiol., 20: 495-522.
- BEEVERS, L. e POULSON, R. 1972. Protein synthesis in cotyledons of Pisum sativum. I - Changes in cell free amino acid incorporation capacity during seed development and maturation. Plant Physiol. 49: 476-481.
- BEEVERS, L.; FLESHER, D. e HAGEMAN, R.H. 1974. Studies on the pyridine nucleotide specificity of nitrate reductase in higher plants and its relationship to sulphydryl level. Biochem. Biophys. Acta, 89: 453-464.
- BIELESKI, R.L. e TURNER, N.A. 1966. Separation and estimation of amino acid in crude plant extrats by thin layer eletrophoreses and cromatography. Analytic Bio-

chemistry, 17: 278-282.

BRAY, D.J. 1962. The optimum combination of corn and soybean protein for chick growth and egg production determined at various levels of dietary protein. Poul. Sci. 41: 1630 (Abstract).

CLAWSON, A.J.; BARRICK, E.R. e SMART, W.W.G. 1963. Response of pigs to graded levels of soybean meal and added lysine in ten percent protein rations. J. Animal Sci. 22: 1027.

DALLING, M.J.; TOLBERT, N.E. e HAGEMAN, R.H. 1972. Intracellular location of nitrate reductase. I - Spinach e tobacco leaves. Biochem. Biophys. Acta, 283: 502-512.

DALLING, M.J.; BOLAND, G. e WILSON, J.H. 1977. Relation between acid proteinase activity and redistribution of nitrogen during grain development in wheat. Aust. J. Plant Physiol, 3: 721-730.

DEL CAMPO, F.F.; RAMIREZ, J.M.; PANEQUE, A. e LOSADA, M. 1966. Ferredoxin and the dark and light reduction of dinitrophenol. Biochem. Biophys. Res. Commun. 22: 547-553.

FELLER, U.K.; SOONG, T. e HAGEMAN, R.H. 1977. Leaf proteolytic activities and senescence during grain development of field-grown corn (Zea mays L.). Plant Physiol., 59: 290-294.

FERGUSON, A.R. e SIMS, A.P. 1971. Inactivation in vivo of glutamine synthetase and NAD-specific glutamate dehydrogenase; its role in regulation of glutamine synthesis in yeasts. J. Gen. Microbiol., 69: 423-427.

FLINN, A.M. e PATE, J.S. 1968. Biochemical and physiological changes during maturation of fruit of field pea (Pisum arvense L.) Ann. Bot., 32: 479-495.

- FLINN, A.M. e PATE, J.S. 1970. A quantitative study of carbon transfer from pod and subtending leaf to the ripening seeds of the field pea (Pisum arvense L.). J. Exp. Bot., 21: 71.
- FRANCO, A.A.; PEREIRA, J.C. e NEYRA, C.A. 1979. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in Phaseolus vulgaris L. Plant Physiol., 63: 421-424.
- FRIENDENWALD, J.S. e MAENGWIN-DAVIES, G.D. 1954. Elementary Kinetic theory of enzymatic activity. Em: W.DMc Elroy e B. Glass, A symposium on the mechanism of enzyme action : 154-159.
- GIVAN, C.F. 1975. Light dependent synthesis of glutamine in pea chloroplast preparations. Planta, 122: 281-291.
- GIVAN, C.F.; GIVAN, A. e LEECH, R.M. 1970. Photoreduction of alpha-ketoglutarate to glutamate by Vicia faba chloroplast preparations. Planta, 122: 281-291.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.S. e DAVID, M.M. 1949. Determination of protein by the Biuret method. Journal Biol. Chem., 177: 751.
- HAGEMAN, R.H. e FLESHER, D. 1960. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. Plant Physiol., 35: 700-708.
- HAGEMAN, R.H. e HUCKLESBY, D.P. 1971. Nitrate reductase from higher plants. Methods Enzymol., 23: 491-503.
- HALL, S.M. e BAKER, D.A. 1972. The chemical composition of Ricinus floem exudate. Planta (Berl.) 106, 131-141.
- HARPER, J.E. e HAGEMAN, R.H. 1972. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (Glycine max (L. Merr). Plant Physiol. 49: 146-154.

- HAYSTEAD, A. 1973. Glutamine synthetase in the chloroplasts of Vicia faba. *Planta* 111: 271-274.
- HERRIDGE, D.F. e PATE, J.S. 1977. Utilization of net photosynthate for nitrogen fixation and protein production in an annual legume. *Plant Physiol.* 60: 759-764.
- HERRIDGE, D.F.; ATKINS, C.A.; PATE, J.D. e RAINBIRD, R.M. 1978. Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of the cowpea (Vigna unguiculata L. Walp). *Plant Physiol.*, 53: 747-751.
- HILL, J.E. e BREIDENBACH, R.W. 1974. Protein of soybean seeds. II- Accumulation of the major protein components during seed development and maturation. *Plant Physiol.*, 53: 747-751.
- KAUL, A.K. 1973. Mutation breeding and crop protein improvement. Em: Improving plant protein by nuclear technic. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp 1-106.
- KIPPS, A.E. e BOULTER, D. 1974. Origins of the amino acids in pods and seeds of Vicia faba L. *New Phytol.* 73: 675-684.
- KRETOVICH, W.L.; EVSTIGNEEVA, Z.G. e TOMOVA, N.G. 1970. Effect of nitrogen source on glutamate dehydrogenase and alanine dehydrogenase of *Chlorella*. *Can. J. Bot.* 48: 1179-1183.
- LEA, P.J. e FOWDEN, L. 1975a. Asparagine metabolism in higher plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 168: 3-14.
- LEA, P.J. e FOWDEN, L. 1975b. The purification and properties of a glutamine-dependent asparagine synthetase isolated from Lupinus albus. *Proc. R. Soc. B.* 192: 13-26.
- LEA, P.J. e MIFLIN, B.J. 1974. Alternative route for

- nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, 251: 614-616.
- LEA, P.J. e THURMAN, D.A. 1972. Intracellular location and properties of plant L-glutamate dehydrogenases. *J. exp. Biol.*, 23: 440-449.
- LEA, P.J., FOWDEN L. e MIFLIN B.J. 1978. The purification and properties of asparaginase from *Lupinus* species. *Phytochemistry*, 17: 217-222.
- LEECH, R.M. e KIRK, P.R. 1968. An NADP-dependent L-glutamate dehydrogenase from chloroplasts of *Vicia faba* L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32: 685-690.
- LEWIS, O.A.M. 1975. An ^{15}N - ^{14}C study of the role of the leaf in the nitrogen nutrition of the seed of *Datura stramonium* L.. *J. exp. Bot.*, 26: 361-366.
- LEWIS, O.A.M. e BERRY, M.J. 1975. Glutamine as the major acceptor of reduced nitrogen in leaves. *Planta* 125: 77-80.
- LEWIS, O.A.M. e PATE, J.S. 1973. The significance of transpirationally derived nitrogen in protein synthesis in fruiting plants of pea. *J. Exp. Bot.*, 24: 596-606.
- LEWIS, O.A.M. e PROBYN, T.A. 1978. ^{15}N incorporation and glutamine synthetase inhibition studies of nitrogen assimilation in leaves of the nitrophile, *Datura stramonium* L. *New Phytol.* 81: 519.
- LEWIS, O.A.M.; NEIMAN, E.J. e MUNZ, A. 1971. Contribution of the pericarp to the amino acids of the seeds of *Datura stramonium*. *Ann. Bot.*, 35: 623.
- LINCK, A.J. e SUDIA, T.W. 1962. Translocation of labelled photosynthate from the bloom node leaf to the fruit of *Pisum sativum*. *Experientia*, 18: 69.

- LUSE, R.A. e OKWURAIWE, P.E. 1975. Proc. IITA, Collaborators' meeting on grain legumes improvement, R.A. Luse e K.O. Rachie (eds.); IITA, Ibadan, Nigeria, p.68.
- MAGALHÃES, A.C. 1973. Nitrogen metabolism in soybean plants under conditions of temperature stress. Tese de Ph.D. University of Illinois, Urbana-Champaign.
- MAGALHÃES, A.C. 1975. Nitrate assimilation in higher plants. What's new in Plant Physiol. vol. 7, nº 1.
- MAGALHÃES, A.C.; PETERS, D.B. e HAGEMAN, R.H. 1976. Influence of temperature on nitrate metabolism and leaf expansion in soybean (Glycine max L. Merrill) seedlings. Plant Physiol. 58: 12.
- MAC PARLAND, R.H.; GUEVARA, J.G.; BECKER, R.R. e EVANS, H.J. 1976. The purification and properties of the glutamine synthetase from the cytosol of soya-bean root nodules. Biochem. J. 153: 597.
- MATSUMOTO, T.; YATAZAWA, Y. e 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.
- MIFLIN, B.J. 1974. The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of root and leaves. Plant Physiol. 54: 550.
- MIFLIN, B.J. e LEA, P.J. 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. Phytochemistry 15: 873-875.
- MIFLIN, B.J. e LEA, P.J. 1977. Amino acid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 299-329.
- MILLERD, A.; SIMON, M. e STERN, H. 1971. Legumin synthesis in developing cotyledons of Vicia faba L. Plant Physiol., 48: 419-425.

- MILLERD, A.; SPENCER, D.; DONNAN, D. e STILLER, M. 1975. Growth of immature cotyledons in culture. Aust.J. Plant Physiol. 2: 51-59.
- NICHOLAS, J.C.; HARPER, J.E. e HAGEMAN, R.H. 1976a. Nitrate reductase activity in soybeans (Glycine max. L. Meer.). I- Effects of light and temperature. Plant Physiol. 58: 731-735.
- NICHOLAS, J.C.; HARPER, J.E. e HAGEMAN, R.H. 1976b. Nitrate reductase activity in soybeans (Glycine max. L. Meer.). II- Energy limitations. Plant Physiol., 58: 736-739.
- O'NEAL, D. e JOY, K.W. 1973a. Localization of glutamine synthetase in chloroplasts. Nature New Biol., 246: 61-62.
- O'NEAL, D. e JOY, K.W. 1973b. Glutamine synthetase of pea leaves. I- Purification, stabilization, and pH optima. Arch. Biochem. Biophys., 159: 113-122.
- O'NEAL, D. e JOY, K.W. 1974. Glutamine synthetase of pea leaves. Divalent cation effects, substrate specificity and other properties. Plant Physiol., 54: 773-779.
- PALICH, E. e JOY, K.W. 1973. Glutamato Dehydrogenase from pea roots: purification and properties of enzyme. Can. J. Biochem., 49: 127-138.
- PATE, J.S. 1971. Movement of nitrogenous solutes in plants. Em: Nitrogen-15 in soil-plant studies. I.A.E.A., Vienna. I.A.E.A.-pl- 341/13, pp 165-187.
- PATE, J.S. e FLINN, A.M. 1973. Carbon and nitrogen transfer from vegetative organs to ripening seeds of field pea (Pisum arvense L.). J. Exp. Bot. 24: 1090-1099.
- PATE, J.S. e WALLACE, W. 1964. Movement of assimilated nitrogen from the root system of the field pea (Pisum

- arvense L.) Ann. Bot., 28: 83-99.
- PATE, J.S.; SHARKEY, P.M. e LEWIS, O.A.M. 1974. Phloem
blee bleeding from legume fruits-a technique for study
of fruit nutrition. *Planta* (Berl.) 120: 229-243.
- PATE, J.S.; SHARKEY, P.J. e LEWIS, O.A.M. 1975. Xylem to
phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legumes
studied by a phloem bleeding technique. *Planta*, 122:
11-26.
- PETERSON, L.W. e HUFFAKER, R.C. 1975. Loss of ribulose-1,5-
diphosphate carboxilase and increase in proteolytic
activity during senescence of detached primary barley
leaves. *Plant Physiol.* 55: 1009-1015.
- RHODES, D.; RENDON, G.A. e STEWART, G.R. 1975. The control
of glutamine synthetase level in Lemna minor L. *Planta*,
125: 201-211.
- RITENOUR, G.L.; JOY, K.W.; BUNNING, J. e HAGEMAN, R.H. 1967.
Intracellular localization of nitrate reductase and
glutamic dehydrogenase in green leaf tissue. *Plant Physiol.*
42: 233-237.
- ROGNES, S.E. 1975. Glutamine-dependent asparagine
synthetase from Lupinus luteus. *Phytochemistry*, 14:1975-
-1982.
- SANTARIUS, K.A. e STOCKING, G.R. 1969. Intracellular
localization of enzymes in leaves and chloroplast membrane
permeability to compounds involved in amino acid syn-
thesis. *Z. Naturforsch.* 246: 1170-1179.
- SCHLESIER, G. 1977a. Occurrence and function of nitrate
reductase in pods of legumes. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*
171: 511-523.
- SCHLESIER, G. 1977b. Nitrate reductase activity in leaves

- and fruits of various legumes. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 171: 511-523.
- SCHLESIER, G. e MUNTZ, K. 1974. The function of the pod at protein storage in the seeds of Vicia faba L. III- Nitrate reductase in developing pods and seeds of leguminosae. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 196: 87-93.
- SCHRADER, L.E.; RITENOUR, G.L.; EILRICH, G.L. e HAGEMAN, R.H. 1968. Some characteristics of nitrate reductase from higher plants. *Plant Physiol.*, 43: 930-940.
- SCHWIMMER, S.; MAKOWER, R.U. e ROEM, E.S. 1961. Invertase and invertase inhibitor in potato. *Plant Physiol.*, 36: 313-317.
- SODEK, L. e SILVA, W.J. 1977. Glutamate synthase. A possible role in nitrogen metabolism of the developing maize endosperm. *Plant Physiol.*, 50: 602-605.
- SODEK, L.; LEA, P.J. e 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. e BEEVERS, L. 1976. Glutamate synthase in developing cotyledon of Pisum sativum. *Plant Physiol.*, 57: 862.
- STOREY, R. e BEEVERS, L. 1977. Proteolytic activity in relationship to senescence and cotyledonary development in Pisum sativum L. *Planta*, 124: 77-87.
- STREETER, J.G. 1972. Nitrogen nutrition of field-grown soybean plants. I- Seasonal variations in soil nitrogen and nitrogen composition of stem exudate. *Agron. J.*, 64: 331-314.
- STREETER, J.G. 1974. Asparaginase and asparaginase transamina

- se from soybean leaves. *Plant Physiol.*, 53: S-66.
- STREETER, J.G. 1979. Allantoin and Allantoic acid in tissues and stem exudate from field-grown soybean plants. *Plant Physiol.*, 63: 478-480.
- TSUKAMOTO, A. 1970. Reductive carboxylation and amination of keto acids by spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 11: 221-230.
- THIBODEAUX, P.S. e JAWORSKY, L. 1975. Patterns of nitrogen utilization in the soybean. *Planta*, 127: 133-147.
- THOMPSON, J. F.; MADISON, J.T. e MUENSTER, A.E. 1977. In vitro culture of immature cotyledons of Soya bean (Glycine max L. Merr). *Ann. Bot.*, 41: 29-39.
- VAN DIE, J. e TAMMES, P.M.L. 1975. Phloem exudation from monocotyledons axes. Em: *Encyclopedia of Plant Physiology*, N.S., Vol. I- transport in plants. Pt. I, pp 196-222. Zimmerman, M.H., Milburn, J.A. eds. Berlin-Heidelberg-New York: Springer.
- WRIGHT, D.J. e BOULTER, D. 1972. The characterization of vicilin during seed development in Vicia faba (L.). *Planta* 105: 60-65.
- WALLACE, W. e PATE, J.S. 1967. Nitrate assimilation in higher plants with special reference to the cocklebur (Xanthium pensilvanicum Wallr). *Ann. Bot.* 31: 213-228.
- WALLSGROVE, R.M.; HAREL, E.; LEA, P.J. e MIFLIN, B.J. 1977. Studies on glutamate synthase from the leaves of higher plants. *J. exp. Bot.*, 28: 588-596.
- WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J. e MIFLIN, B.J. 1979. The reduction of inorganic nitrogen and its accumulation into glutamate and glutamine in pea chloroplasts. Em: E.J. Hewitt. C. Cutting eds. *Nitrogen assimilation in*

plants 6^o Long Aston Symposium. Academic Press London
pp 413-433.

YEMM, E. W. e COCKING, E.C. 1954. The determination of
amino acids with ninhydrin. Analyst, 80: 209-213.