

KUNIKO IWAMOTO HAGA

NUTRIÇÃO NITROGENADA DO COTILÉDONE IMATURO DE SOJA.

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da UNICAMP para
obtenção do título de Mestre
em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. LADASLAV SODEK

1982

H12n
4647/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Agradeço a

Kotaro e

Hiroko, meus pais,
pela oportunidade.

Ao Mario,
meu esposo,
Ao Shin,
meu filho,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek, pela orientação apoio e incentivo na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio C.N. Magalhães, pelo apoio e sugestões.

Ao Prof. Dr. Rolf Dieter Illg, pelo empréstimo valioso do aparelho de liofilização.

Aos Profs. Dr, Ivany F.M. Valio e Dr. William J. da Silva, pelas sugestões.

Às colegas Nair E. Meguro e Terezinha E.S. Mori, pelo estímulo.

Aos colegas, Profs. Adyles Arato Jr e José M. Lopes, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos colegas e funcionários do laboratório do Depto de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, pelo apoio amigo e colaboração.

Ao Eiji Kamimura, pelos desenhos que ilustram o trabalho e Angela Maria Ferreira, pela datilografia final da tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Est. de São Paulo - FAPESP e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelas bolsas de estudo concedidas.

À Universidade Estadual Paulista-UNESP, pela colaboração na fase de confecção da tese.

A autora agradece ainda, a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

ÍNDICE

| | Pág. |
|--|------|
| I. INTRODUÇÃO | 01 |
| II. MATERIAIS E MÉTODOS | 15 |
| 1. Material Vegetal | 15 |
| 2. Métodos | 17 |
| 2.1. Meio de cultura e incubação dos cotilédones | 17 |
| 2.1.1. Meio de cultura | 17 |
| 2.1.2. Inoculação e incubação dos cotilédones | 18 |
| 2.2. Extração de proteína | 19 |
| 2.2.1. Extração com eliminação de lipídeos | 19 |
| 2.2.2. Extração sem eliminar lipídeos . | 20 |
| 2.3. Dosagem de proteína | 20 |
| 2.3.1. Método biureto (GORNALL <i>et alii</i> , 1949) | 20 |
| 2.3.2. Método descrito por LOWRY <i>et alii</i> (1951) | 21 |
| 2.3.3. Método descrito por BRADFORD(1975) | 21 |
| III. RESULTADOS | 22 |
| 1. Extração e dosagem de proteína total do cotilédone | 22 |
| 2. Sistema de cultura de cotilédones imaturos de soja | 25 |
| 2.1. O desenvolvimento dos frutos na planta . | 25 |

| | |
|--|----|
| 2.2. Determinação do tamanho ideal de cotilédones de soja, para utilização em cultura | 32 |
| 2.3. Determinação do período de incubação | 33 |
| 2.4. Crescimento dos cotilédones pertencentes ao mesmo embrião e cotilédones ao acaso, em meio de cultura definido | 40 |
| 3. Aproveitamento de vários compostos como fonte de nitrogênio | 40 |
| 3.1. Compostos nitrogenados orgânicos | 43 |
| 3.2. Compostos nitrogenados inorgânicos | 45 |
| 4. Estudo com inibidor específico | 45 |
| IV. DISCUSSÃO | 49 |
| V. CONCLUSÕES | 54 |
| VI. RESUMO | 55 |
| VII. SUMMARY | 57 |
| VIII. BIBLIOGRAFIA | 59 |

I. INTRODUÇÃO

Existem atualmente muitos estudos na área de genética, agronomia e bioquímica, com objetivo de melhorar a proteína de vegetais, no que diz respeito à sua qualidade e quantidade. O interesse nesta área deve-se ao fato de que 70% da proteína consumida pelo homem no mundo, vem das plantas (KAUL, 1973). Destas proteínas vegetais, os cereais contribuem com 70% e as leguminosas com 18% (EVANS e GRIDLEY, 1979) embora as leguminosas normalmente sejam ricas em proteína. Das leguminosas mais importantes economicamente, a soja apresenta maior conteúdo de proteínas, entre 37 e 50% (HARTWIG, 1969). Outros exemplos são *Phaseolus vulgaris*, com valores em torno de 27% (WOOLFE, 1974), *Pisum*, 25% (KAUL, 1971), *Vigna unguiculata*, 28% (HAWTIN *et alii*, 1977) e *Vicia faba*, 27% (BOND, 1970). Por outro lado, o conteúdo em proteína dos cereais fica em torno de apenas 10% (KAUL, 1973).

O valor nutritivo das proteínas de origem vegetal é baixo, devido a carência de um ou outro aminoácido essencial, como a lisina, no caso dos cereais, e metionina e cisteína nas leguminosas (KAUL, 1973). Por outro lado, as leguminosas são ricas em lisina e, portanto, em combinação com cereais, aumentam o valor nutritivo da proteína; por isto tem sido sugerido que qualquer melhoria na qualidade da proteína de leguminosas deveria visar o aumento em lisina, além de metionina e cisteína (EVANS e GRIDLEY, 1979). A solução destes problemas através da genética por exemplo, necessita da existência de um profundo conhecimento dos processos bioquímicos envolvidos no transporte e armazenamento de nitrogênio na semente. Tal necessidade tem estimulado os tra

balhos sobre estes processos, principalmente na última década.

A proteína de sementes é o ponto final de uma série de processos, desde a entrada do nitrogênio inorgânico na planta, até a síntese e armazenamento de proteína nas sementes. A produção de proteína de reserva nas sementes envolve várias etapas e partes da planta, de uma forma integrada, formando-se um sistema altamente complexo.

Em sementes de milho, ervilha, feijão e soja, o acúmulo de proteína ocorre normalmente em um período de cerca de 20 dias, em milho (MURPHY e DALBY, 1971), ervilha (BEEVERS e POULSON, 1972; MILLERD e SPENCER, 1974; STOREY e BEEVERS, 1977), feijão (SUN *et alii*, 1978), e soja (HILL e BRIEDENBACH, 1974 a e b; MORI, 1981), atingindo taxas de 1 a 4 mg de proteína por dia, por semente. Neste período de acúmulo rápido de proteína, a semente requer grande quantidade de nitrogênio. O nitrogênio fornecido para as sementes deve ser na forma reduzida, devido a incapacidade destas em reduzir NO_3^- verificada em *Phaseolus vulgaris* e *Vigna sinensis* (SCHLESIER, 1977) e *Glycine max* (MORI, 1981). A maior parte do nitrogênio reduzido necessário para a semente vem da folha (LEWIS e PATE, 1973), principal local da redução do NO_3^- (BEEVERS e HAGEMAN, 1969).

O NO_3^- é retirado do solo pelas raízes e transportado via xilema até a folha, onde é reduzido e assimilado. Em algumas espécies, este processo pode ser realizado na própria raiz, principalmente naquelas que possuem atividades mais altas de redutase de nitrato neste tecido. PATE (1980) acha que a importância da raiz e da folha para este processo, depende do nível da enzima redutase de nitrato na raiz e a disponibilidade de nitrato no solo. O nitrato absorvido seria reduzido na raiz de acordo com a capacidade desta

em reduzi-lo, e o excesso (frequentemente a maior parte) transportado para a folha (ATKINS *et alii*, 1979).

Outro tecido com capacidade para a redução de NO_3^- , embora limitada, é a vagem (MORI, 1981), a qual pode constituir uma importante fonte para as sementes de leguminosas.

Nas leguminosas, a associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio também constitui fonte importante de nitrogênio reduzido (SCOTT, 1978). Neste caso, a redução de nitrogênio atmosférico ocorre no nódulo, local da associação simbiótica das bactérias com as raízes da planta.

A semente, pode ainda, receber aminoácidos originados da degradação de proteína em órgãos senescentes. O aumento da concentração de aminoácidos do floema, verificados por HALL e BAKER (1972), PATE *et alii* (1974) e VAN DIE *et alii* (1975), durante a senescência da folha comprova este fato. Foi verificado também que, quando a proteína é degradada em órgãos senescentes, não há acúmulo de aminoácidos livres nesses órgãos. Isso sugere que os aminoácidos são prontamente metabolizados no local ou transferidos para outros órgãos da planta, especialmente para as sementes em desenvolvimento (STOREY e BEEVERS, 1977).

O transporte de substâncias dentro da planta envolve o sistema vascular da planta, ou seja o xilema e floema. Nas raízes, os produtos da absorção e assimilação de nitrogênio (NO_3^- e aminoácidos) são translocados para as partes aéreas, pelo xilema, enquanto o nitrogênio orgânico é exportado da folha, via floema, para outros órgãos (PATE, 1980). Quanto aos frutos, estes parecem depender mais do floema que do xilema, para a sua nutrição. No caso de *Lupinus albus*, por exemplo, foi estimado que 89% do nitrogênio

que entra no fruto é fornecido pelo floema (ATKINS *et alii*, 1975 e PATE *et alii*, 1977). PATE *et alii* (1975) mostraram que os frutos possuem poucas ligações com o xilema e não transpiram. Entretanto, ocorre pronta transferência de substância orgânica do xilema para o floema no caule (PATE *et alii*, 1979 a e b); desta forma, parte dos compostos assimilados nas raízes e translocados para as partes aéreas, via xilema, podem chegar aos frutos sem passar pela folha.

A natureza qualitativa dos compostos nitrogenados encontrados na seiva que vai suprir os frutos é bastante variada, enquanto que quantitativamente, a situação é outra, a maior parte do nitrogênio é transportado na forma de um ou dois compostos específicos, dependendo principalmente da espécie da planta e, eventualmente, das condições de crescimento. Em *Datura* (LEWIS, 1975) e milho (ARRUDA e SILVA, 1979), este composto é a glutamina. Nas leguminosas de regiões temperadas de um modo geral, como *Lupinus* (PATE *et alii*, 1974; ATKINS *et alii*, 1975, e *Pisum* (PATE e WALLACE, 1964; LEWIS e PATE, 1973) o composto nitrogenado de destaque é a asparagina. Por outro lado, nas leguminosas tropicais, os ureídeos (alantoína e ácido alantóico) representam a principal fonte de nitrogênio translocado durante o período de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, como em *Vigna unguiculata* (HERRIDGE *et alii*, 1978; ATKINS *et alii*, 1980; PATE *et alii*, 1980), *Glycine max* (MATSUMOTO *et alii*, 1977 a e b; PATE *et alii*, 1980); *Phaseolus vulgaris* (ENGELBRECHT, 1955; THOMAS *et alii*, 1979); *Cyamopsis tetragonoloba*, *Macrotyloma uniflorum*, *Psophocarpus tetragonolobus*, *Vigna angularis*, *Vigna umbellata*, *Vigna mungo* (PATE *et alii*, 1980). As leguminosas tropicais, ainda assim, apresentam um ponto em comum com as não-tropicais, isto é, a asparagina se destaca em quantidade, em relação aos outros aminoácidos presentes,

quando os ureídeos são a forma nitrogenada predominante. Além das amidas e dos ureídeos, existem alguns casos isolados em que o composto que se destaca para esta função é outro, por exemplo, a arginina, em algumas árvores (TROMP e OVAA, 1973), citrulina em *Albus* (PATE, 1971), citrulina/ glutamina em *Macrozamia* (HALLIDAY e PATE, 1976) e δ -metileno glutamina em *Arachis* (FOWDEN, 1954).

Todos estes compostos nitrogenados possuem pelo menos 2 átomos de nitrogênio por molécula e derivam diretamente do metabolismo de carboidratos, particularmente, as amidas que são produtos primários da assimilação do nitrogênio (MIPLIN e LEA, 1977). A exceção são os urídeos, que envolve um caminho biossintético longo, igual ao de purinas (BEEVERS, 1976). Na figura 1, são apresentadas as fórmulas da alantoína e do ácido alantóico, os dois principais ureídeos envolvidos no transporte de nitrogênio. A origem dos 4 átomos de nitrogênio das moléculas destes compostos envolve a glutamina diretamente ou aminoácidos com estreita ligação com o metabolismo de carboidratos.

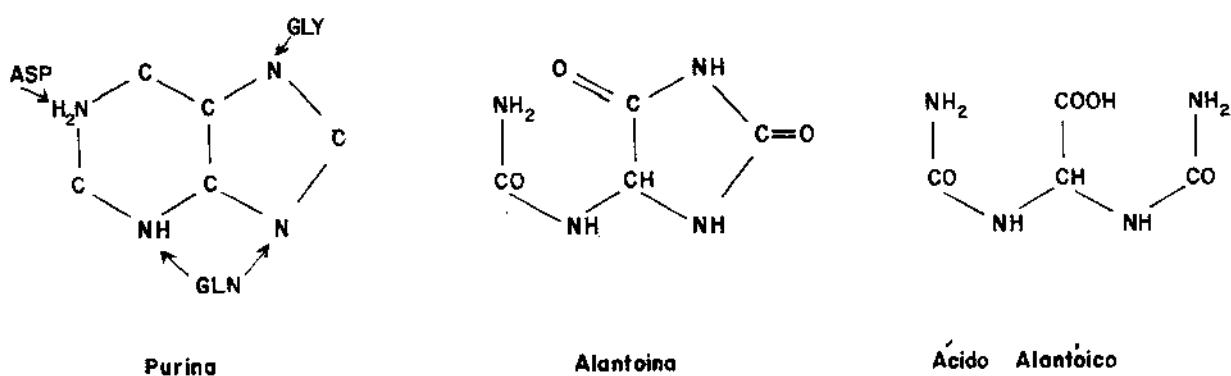


Figura 1. Fórmulas da alantoína e do ácido alantóico.

Uma característica que destaca os ureídeos na sua função de transportar nitrogênio dentro da planta é a alta relação N:C indicando que o processo é bastante econômico no que se refere à quantidade de carbono gasto no transporte de nitrogênio.

A presença dos ureídeos nas leguminosas tropicais tem gerado interesse, pois existem várias evidências que apontam os ureídeos como produtos específicos da fixação de nitrogênio.

Estudos com exsudado do caule de plantas de soja noduladas (MATSUMOTO *et alii*, 1977 a, b e c; STREETER, 1979), mostraram que os ureídeos, alantoína e ácido alantóico, são as principais formas de nitrogênio transportadas das raízes para os outros órgãos da planta. Os ureídeos são progressivamente acumulados nas raízes e partes aéreas de plantas de soja nodulada em desenvolvimento, e decrescem no estágio da formação da semente (MATSUMOTO *et alii*, 1977 a). A incorporação de ^{15}N em alantoína e ácido alantóico, maior em nódulos que em raízes, mostra que a produção de alantoína se dá nos nódulos (MATSUMOTO *et alii*, 1977 b). Estes mesmos autores mostram que plantas de soja tratadas com solução nutritiva contendo compostos nitrogenados não produzem nódulos, e mostram baixa concentração de ureídeos, com consequente aumento nas concentrações de amino-N (MATSUMOTO *et alii*, 1977c). Esta é outra evidência que mostra que o nódulo é o local de síntese dos ureídeos. A quantidade de ureídeos no exsudado do caule depende da fonte de nitrogênio disponível para as raízes da planta. O estudo da composição do xilema de *Vigna unguiculata* nodulada e não nodulada e mais oito outras leguminosas que produzem ureídeo, mostraram que a relação ureídeo/asparagina foi dependente das condições nutricionais da planta, principalmente da fonte de nitrogênio. Foi verifica

do que o NO_3^- inibe a fixação do nitrogênio atmosférico e conseqüentemente, a produção de ureídeo (PATE *et alii*, 1980). As maiores quantidades de ureídeo foram encontradas quando NH_4^- foi fornecida e não NO_3^- (THOMAS *et alii*, 1979), ou ainda quando a principal forma do nitrogênio foi através da fixação do nitrogênio atmosférico (ISRAEL e McCLURE, 1980).

Embora alguns dos compostos envolvidos no transporte de nitrogênio sejam específicos, todos os aminoácidos proteicos são encontrados na seiva que vai em direção aos frutos em desenvolvimento (ATKINS *et alii*, 1975; PATE *et alii*, 1974). Trabalhos com substâncias marcadas com ^{14}C revelaram que muitos desses aminoácidos são incorporados sem transformação, na proteína de reserva da semente (LAWRENCE e GRANT, 1964; FINLAYSON e McCONNELL, 1969; SODEK e WILSON, 1970; ATKINS *et alii*, 1975). Entretanto, a maioria dos aminoácidos proteicos estão presentes em quantidades mínimas em relação aos principais. Desde que a composição em aminoácidos da proteína de reserva difere daquela encontrada na seiva (LEWIS, 1975; PATE *et alii*, 1975), fica evidente que é impossível a incorporação direta de todos os aminoácidos que chegam às sementes pelas vias de transporte é impossível. Este desbalanço em aminoácidos no translocado deve ser corrigido após a sua entrada na semente, de forma que os aminoácidos carentes devem ser sintetizados na própria semente a partir daqueles encontrados em excesso. Isto foi verificado empregando compostos marcados com o isótopo ^{15}N , demonstrando-se que o grupo amida de asparagina ou glutamina é prontamente transferido para o grupo α -amino de muitos aminoácidos da semente (LEWIS e PATE, 1973; ATKINS *et alii*, 1975; LEWIS, 1975). Além disso, trabalhos com precursores marcados com ^{14}C estabeleceram que os caminhos de biossíntese de aminoácidos proteicos tem lugar em sementes em desenvolvimento (BI

LINSKI e McCONNELL, 1975; PATE *et alii*, 1975; SODEK, 1976). Quanto aos ureídeos, não existem evidências diretas quanto à sua utilização pelos frutos, por exemplo, através de estudos com ureídeos marcados. Contudo, a sua pronta utilização pelos frutos é inferida pelo fato de que estes compostos não se acumulam nestes órgãos, apesar das grandes quantidades translocados para o fruto (MATSUMOTO *et alii*, 1977; FUJIHARA *et alii*, 1977).

Como foi visto, os trabalhos com ^{15}N e ^{14}C , mostraram a ocorrência de biossíntese de aminoácidos proteicos em sementes em desenvolvimento através da metabolização de compostos nitrogenados translocados, por exemplo, os ureídeos, asparagina e glutamina. Em função disto, tem sido desenvolvidos vários trabalhos na tentativa de identificar as enzimas envolvidas na utilização destes compostos.

LEES e BLAKENEY (1970) verificaram a atividade de asparaginase no extrato cru de plantas de *Dolichos lab lab*, particularmente nas raízes e nódulos das plantas. No nódulo, a atividade de asparaginase foi encontrada nas frações bacteróide e planta. STREETER (1977) também encontrou uma distribuição similar nos nódulos de plantas de soja, entretanto, nenhum desses autores foram capazes de demonstrar atividade significativa em outras regiões das plantas. Uma preparação de enzima purificada de sementes em desenvolvimento de *L. polyphyllus* mostrou ser ativa (LEA *et alii*, 1978). ATKINS *et alii* (1975) detectou a enzima asparaginase em extrato cru de sementes em maturação, de *L. albus*. BEEVERS e STOREY (1976) tentaram sem sucesso, detectar a enzima em sementes de ervilha. Recentemente, SODEK *et alii* (1980) mostraram a razão disso, demonstrando a presença de asparaginase dependente de K^+ nos cotilédones e testa de sementes de ervilha em maturação.

Em sementes, a presença de uma enzima capaz de metabolizar asparagina, pode explicar a habilidade de cotilédones isolados crescer sô com asparagina como fonte de nitrogênio (MILLERD *et alii*, 1975; THOMPSON *et alii* 1977 ; LEA *et alii* 1979 a). Utilizando inibidor específico de glutamina sintetase (metionina sulfoximina) e glutamato sintase (azaserina), LEA *et alii* (1977 b) foram capazes de demonstrar que a amônia liberada por asparaginase é reassimilada via glutamina sintetase/GOGAT (glutamina oxo-glutarato amino transferase) (esquema da figura 2), para incorporação na proteína de sementes.

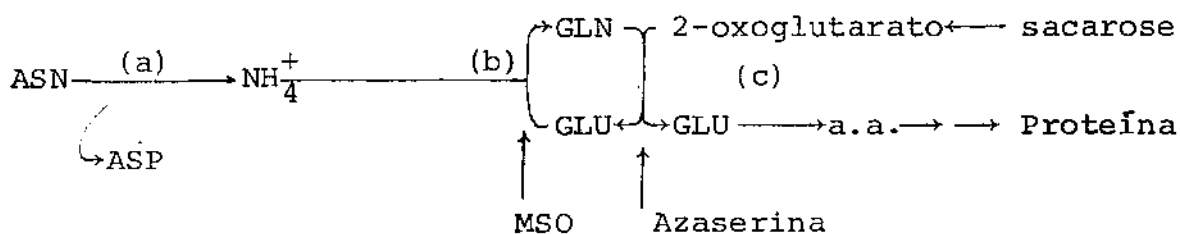


Figura 2. Esquema da reassimilação da amônia liberada pela asparaginase. ASN-asparagina, ASP-aspartato, GLN-glutamina, GLU-glutamato, a.a.-aminoácidos, MSO-metionina sulfoximina, (a) asparaginase, (b) glutamina sintetase e (c) GOGAT (glutamina oxo-glutarato amino transferase).

A asparagina aminotransferase e asparagina amida-transferase também podem metabolizar a asparagina.

A asparagina aminotransferase foi detectada em extrato cru de tecido de plantas por MEISTER *et alii* (1952) e WILSON *et alii* (1954) e em extratos de folha de soja por STREETER (1977). LLOYD e JOY (1978), acham que a

transaminação de asparagina é a maior via de decomposição das amidas nas folhas, porém muito baixa nas sementes de ervilha, comparada com asparaginase dependente de K^+ .

Quando foi verificada a presença da enzima GOGAT que poderia transferir o nitrogênio amida da glutamina para 2-oxoglutarato, FOWLER *et alii* (1974) e DOUGALL (1974); sugeriram também a participação de asparagina na reação.

LEA e MIFLIN (1974) sugeriram que no cloroplasto, a GOGAT (glutamina oxo-glutarato amino transferase) dependente de ferredoxina usaria asparagina como substrato alternativo de glutamina.

A enzima proposta para a reação de transferência do grupo amida da asparagina e glutamina, é determinada através da medida de oxidação de NADH para formação de glutamato (LEA e MIFLIN, 1974). Mais tarde, verificou-se que a reação aparentemente asparagina-dependente foi devido a contaminação por aspartato, pois a asparagina repurificada não apresentou a taxa de oxidação de NADH na presença de 2-oxoglutarato (MIFLIN e LEA, 1975). Embora a demonstração desta amidatransferase com asparagina não esteja bem caracterizada, a possibilidade da presença dessa enzima não pode ser ignorada (LEA e MIFLIN, 1980).

Em sementes imaturas de *Lupinus albus* (LEA e FOWDEN, 1975), ervilha (BEEVERS e STOREY, 1976), cevada (MIFLIN e LEA, 1976) e milho (SODEK e SILVA; 1977), foi verificada a presença da enzima glutamato sintase, enzima que degrada a glutamina, indicando como esta fonte de nitrogênio pode ser utilizada.

As possíveis vias de utilização de ureídeos estão representadas no esquema da figura 3, conforme THOMAS e SCHRADER (1981). Pode-se verificar que os ureídeos são degradados em uréia e glioxilato, por dois caminhos, envolven

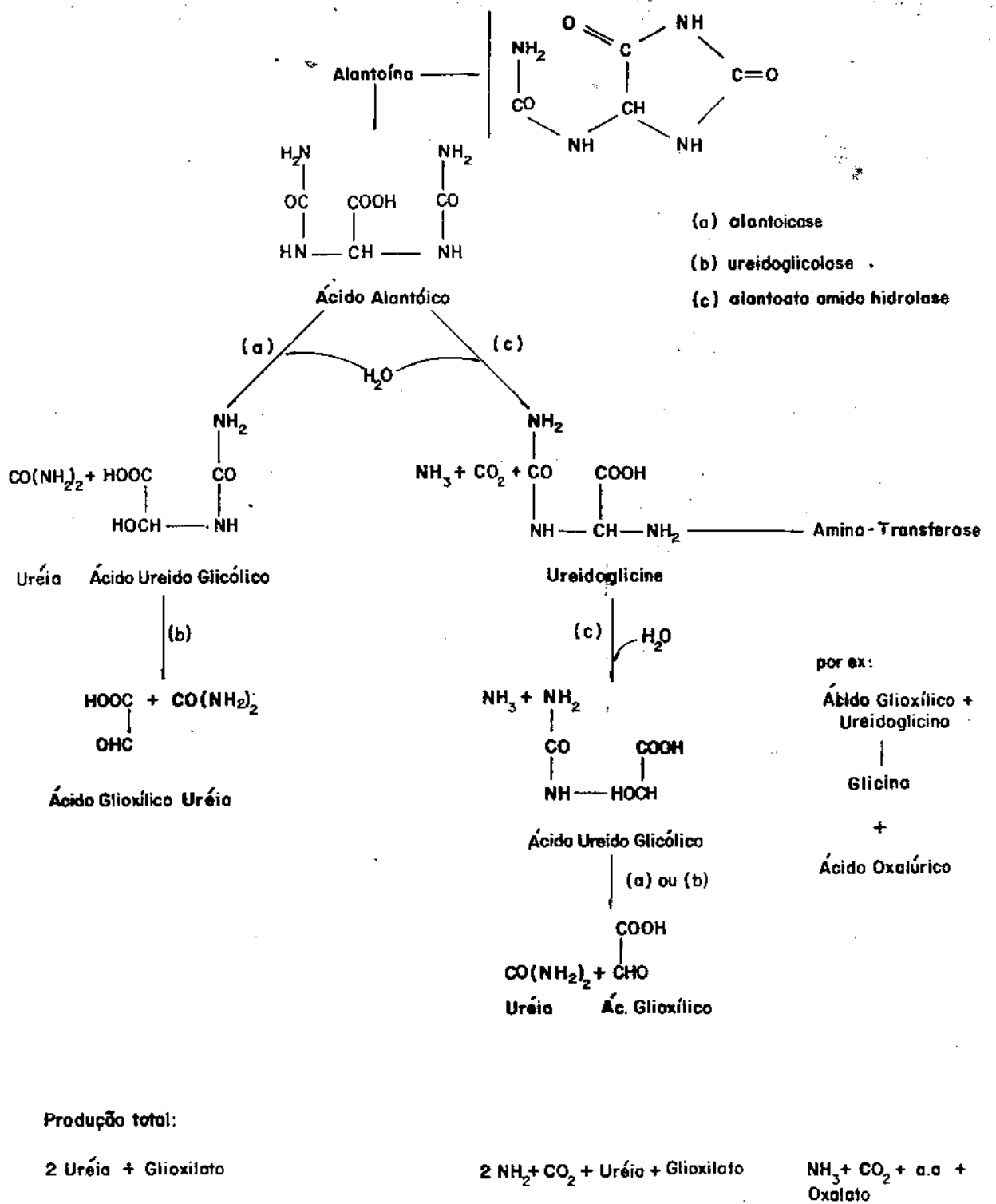


Figura 3. Via metabólica da assimilação dos ureídeos.

do pelo menos duas enzimas, alantoicase e ureidoglicolase (VALENTINE *et alii*, 1962; VALENTINE e WOLF, 1961; VOGELS, 1963). Por um dos caminhos, através da enzima alantoicase o ácido alantóico sofre hidrólise e é transformado em ureido glicolato. O ureidoglicolato sofre a ação de ureidoglicolase e obtem-se ácido glioxílico e uréia. A outra via envolve a enzima alantoato amida-hidrolase. A atividade dessa enzima foi encontrada em *Streptococcus allantoicus* que hidrolisa ácido alantóico em CO₂, amônia e ureidoglicina, em condições anaeróbicas (VOGELS, 1963; VAN DER DRIFT *et alii*, 1970). Essa enzima foi também encontrada em *Pseudomonas* e *Penicillium* sp crescidas em condições aeróbicas (TRIJBELS e VOGELS, 1966).

Em resumo, a degradação do ácido alantóico via alantoicase e ureidoglicolase, resulta na produção de uréia e ácido glioxílico, enquanto que o ureidoglicolato produzido via alantoato amida hidrolase, pode ser degradado em uréia e glioxilato, pela ação da enzima alantoicase ou ureidoglicolase.

Não se sabe se essas reações ocorrem em plantas superiores, porém ambos, alantoína e ácido alantóico, podem ser hidrolizados sob certas condições de pH e temperatura, por reações não enzimáticas. A alantoína é convertida a ácido alantóico que, por sua vez, é hidrolizada em ureidoglicolato e uréia ou isocianato e glioxilato (VOGELS *et alii*, 1969; VOGELS e VAN DER DRIFT, 1969). Não há nenhuma informação de que essas reações ocorram "in vivo" em tecido de plantas superiores. O que se sabe a esse respeito é que dentre os compostos resultantes da atividade de alantoicase em plantas superiores, somente glioxilato tem sido detectado como produto de ácido alantóico (TAJIMA *et alii*, 1977; THOMAS *et alii*, 1980). Pelo uso de hidrólise diferencial de derivados de glioxilato, foi sugerida a presença de ureidoglicolato ou

ureidoglicina, em extratos de folhas de *Phaseolus* incubados com ácido alantóico (VOGELS e VAN DER DRIFT, 1970), embora esses compostos não tenham sido definitivamente identificados (THOMAS *et alii*, 1979).

De qualquer forma, o nitrogênio dos ureídeos é transformado em uréia que, por sua vez, é hidrolizada para amônia através da enzima urease e, em seguida, reassimilada na posição 2-amino dos aminoácidos (LEA e MIFLIN, 1980), que são utilizados na síntese de proteína.

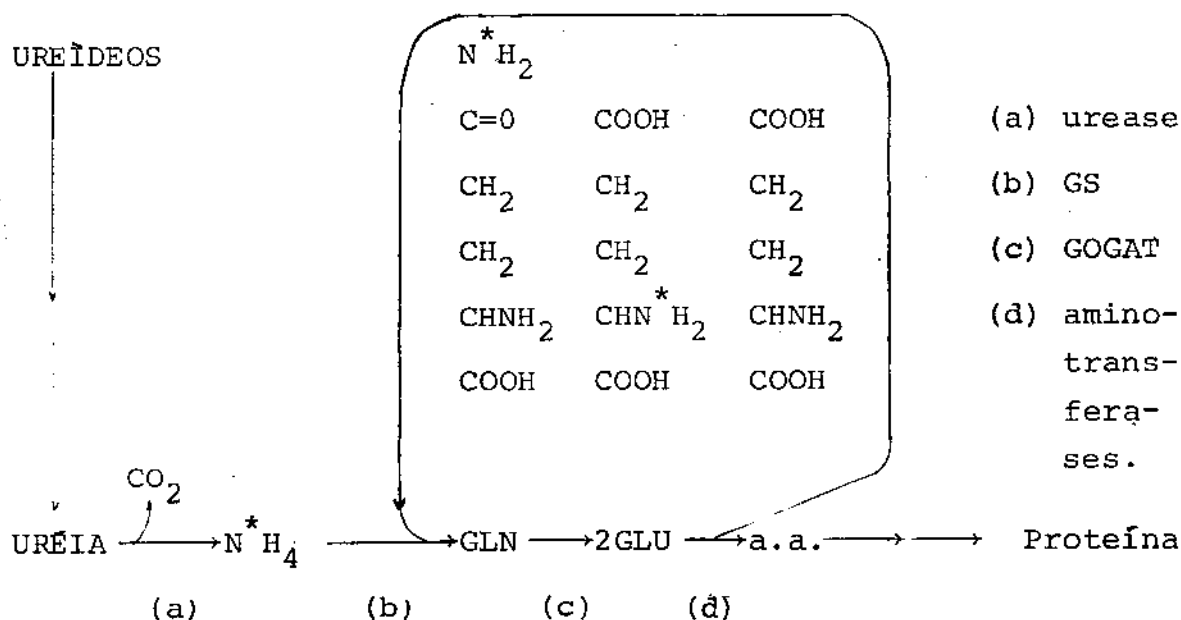


Figura 4. Esquema da utilização de ureídeos.

O sucesso com culturas de cotilédones imaturos de ervilha (MILLERD *et alii*, 1975; LEA *et alii*, 1980) e soja (THOMPSON *et alii*), em meio de cultura definido, usando a glutamina ou asparagina como fonte de nitrogênio, mostra que a semente é capaz de sintetizar a sua proteína de reserva a partir desses aminoácidos. Porém na soja, como foi

verificado, a fonte de nitrogênio disponível na planta, para a síntese de proteína de reserva varia de acordo com as condições de crescimento (nodulada e não nodulada). Em plantas noduladas, a fonte principal de nitrogênio são os ureídeos e nas não-noduladas, a asparagina.

Para o melhor entendimento do processo de utilização dos compostos nitrogenados que chegam até as sementes seria necessário obter outras evidências para completar os estudos com enzimas. A presença ou não de enzimas envolvidas no metabolismo de determinados compostos pode sugerir uma capacidade do tecido no aproveitamento destas substâncias, mas dificilmente indica a eficiência ou a importância do processo "in vivo". Geralmente tais informações são obtidas empregando compostos nitrogenados marcados com ^{15}N , que exigem técnicas sofisticadas. Uma outra maneira de obter essas evidências seria através da eficiência de utilização avaliada em termos de aumento de proteína acumulada a partir delas. É evidente que este tipo de estudo é difícil ou mesmo impossível em sementes "in situ", devido a complexidade do sistema e a impossibilidade de se controlar as condições experimentais. Entretanto, a possibilidade de se cultivar cotilédones imaturos em meio de cultura definido (MILLERD *et alii*, 1975; THOMPSON *et alii*, 1977; LEA *et alii*, 1980) parece ser um sistema ideal para tais estudos. O cotilédone cultivado nessas condições mostra um crescimento normal, pelo menos em termos de acumulação de proteína de reserva, alcançando taxas comparáveis àquelas que ocorrem nas plantas intactas.

O objetivo do presente trabalho é, portanto, determinar quais os compostos nitrogenados dentre aquelas normalmente encontradas no sistema de transporte, mais eficientes como fontes de nitrogênio para a síntese de proteína em cotilédones imaturos de soja.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Material Vegetal

As sementes de soja (*Glycine max* (L) Merrill), cultivar "Santa Rosa", foram semeadas em potes plásticos com capacidade de 3 litros, contendo vermiculita lavada. Foi verificado que esse volume não é limitante para o crescimento das raízes da planta. Foram mantidas duas plantas por recipiente e a intervalos de três dias, regadas com solução nutritiva de Hoagland, com a seguinte composição:

| | solução es- toque (g/l) | ml de solução estoque/ litro de solução |
|--|----------------------------|--|
| Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O | 236 | 5,0 |
| KNO ₃ | 101 | 5,0 |
| Mg SO ₄ · 7H ₂ O | 248 | 2,0 |
| KH ₂ PO ₄ | 136 | 1,0 |
| micro | * | 1,0 |
| Fe | ** | 1,0 |

| *micro | solução estoque (g/l) |
|-----------------------|--------------------------|
| H_3BO_3 | 2,86 |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 1,81 |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,22 |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0,08 |
| $H_2MoO_4 \cdot H_2O$ | 0,02 |

| **solução de Fe | solução estoque (g/l) |
|-----------------|--------------------------|
| $FeSO_4$ | 25 |
| EDTA | 25 |

Quinze dias após o plantio, as plântulas foram submetidas ao tratamento de sete fotoperíodos curtos (9 horas), em câmara escura, conforme descrito e estudado por MORI (1981). Esse tratamento foi feito para induzir a floração e obtenção de plantas de porte pequeno, com 7 folhas trifolioladas.

Antes e após o período de indução da floração, as plantas foram mantidas em casa de vegetação.

Após a floração, que normalmente ocorreu aos 30 dias, foi dado início à determinação da idade dos frutos e acompanhado o seu crescimento. Desta forma, a idade dos cotilédones foi expressa em dias após a antese (DAA).

2. Métodos

2.1. Meio de cultura e incubação dos cotilédones

2.1.1. Meio de cultura

O meio de cultura foi preparado segundo LINS MAIER e SKOOG (1965), modificado por THOMPSON (1977), com a seguinte composição em mg/1000 ml:

a) macronutrientes:

| | |
|--|-------|
| KCl, | 745; |
| CaCl ₂ . 2H ₂ O, | 440; |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O, | 370; |
| KH ₂ PO ₄ , | 170; |
| K ₂ SO ₄ , | 1044; |

b) micronutrientes:

| | |
|--|--------|
| H ₃ BO ₃ , | 6,2; |
| MnSO ₄ . 4H ₂ O, | 22,3; |
| ZnSO ₄ . 4H ₂ O, | 8,6; |
| KI, | 0,83; |
| Na ₂ MoO ₄ , | 0,25; |
| CuSO ₄ . 5H ₂ O, | 0,025; |
| CoCl ₂ . 6H ₂ O, | 0,025; |

c) ferro:

| | |
|--|--------|
| FeSO ₄ . 7H ₂ O, | 27,85; |
| Na ₂ EDTA, | 37,25; |

d) vitaminas:

| | |
|-------------------|-------|
| tiamina HCl, | 0,04; |
| myo-inositol, | 10; |
| ácido nicotínico, | 0,05; |
| piridina HCl, | 0,05; |
| glicina, | 0,2 e |

e) sacarose, 50 000.

Todos esses componentes foram preparados em solução aquosa e o pH ajustado a 6,0, com NaOH, 1N. Foram tomados 4 ml desta solução, mais 2 ml de água destilada e colocados em frascos de erlenmeyer de 25 ml. Estes frascos foram autoclavados a 120° C, por 15 minutos e, a seguir, acrescentados 2 ml de fonte de nitrogênio, com concentração final de 1,75 mg/ml de meio de cultura. A fonte de nitrogênio foi esterilizada através de filtração, em uma câmara de fluxo laminar, marca "VECO", Campinas - SP.

A glutamina foi o composto nitrogenado utilizado como fonte padrão de nitrogênio.

O inibidor específico de glutamina sintetase, metionina sulfoximina (MSO) (MIFLIN e LEA, 1976), foi utilizado no meio de cultura, em alguns experimentos, a fim de verificar o modo de utilização das fontes de nitrogênio. A concentração de MSO foi de 1mM, mantendo o volume final de 8 ml por frasco.

2.1.2. Inoculação e incubação dos cotilédones

As vagens de soja selecionadas foram tratadas em solução sódico dodecil sulfato, 0,1%, contendo hipoclorito de sódio, 0,5%, por 5 minutos e lavados 3 vezes em água des

tilada esterilizada. Em seguida, as vagens foram colocadas em placas de petri, onde, com o uso de bisturi e pinça, as sementes foram retiradas. A testa e o embrião destas sementes foram eliminados cuidadosamente. Para evitar contaminação, todo o material utilizado foi esterilizado e todas as operações realizadas em câmara de fluxo laminar.

Um dos cotilédones foi inoculado no meio de cultura e o outro utilizado para medidas iniciais de peso fresco, peso seco e proteína ou, em alguns experimentos, incubado em meio, com glutamina como fonte de nitrogênio, para fins comparativos com outras fontes de nitrogênio. Os frascos de cultura contendo cotilédones imaturos de soja foram colocados em mesa agitadora, numa câmara de crescimento a 25°C, sob luz contínua com 2000 lux de luminância, por um período de 6 dias. Durante esse tempo foi acompanhado o crescimento dos cotilédones, e as culturas que apresentaram contaminação, foram eliminadas.

Após o período de incubação, os cotilédones foram retirados cuidadosamente do meio de cultura e lavados 3 vezes em água destilada, enxugados em papel de filtro e liofilizadas durante 24 horas.

2.2. Extração de proteína

2.2.1. Extração com eliminação de lipídeos

O cotilédone liofilizado e já com o peso seco determinado, foi homogeneizado em almofariz com etanol 80 %, a temperatura ambiente, e centrifugado a 800g por 10 minutos. O homogeneizado sofreu sucessivas lavagens em álcool absoluto, éter de petróleo (3 vezes), álcool absoluto e etanol 80%, e finalmente a extração foi feita com NaOH 0,2% (preparada no dia). A extração foi feita em 3 vezes, sendo a

crescentado ao volume final, igual volume de TCA (ácido tricloroacético), 10%. Após um período de 12 horas no gelo, para precipitar a proteína, o extrato foi centrifugado a 800g, por 10 minutos. O resíduo foi ressuscendido em NaOH 0,2%.

Cada etapa do processo de lavagem do homogeneizado do cotilédone, foi feita utilizando-se solventes na proporção de 1 ml para cada 5 mg de matéria seca.

As lavagens sofridas pelo homogeneizado tiveram como objetivo eliminar a grande quantidade de lipídeos e existentes no cotilédone.

2.2.2. Extração sem eliminar lipídeos

O material seco foi homogeneizado com NaOH, 0,2%. Após a centrifugação a 800g, por 10 minutos, o sobrenadante foi guardado. Este processo foi repetido por 3 vezes.

2.3. Dosagem de proteína

2.3.1. Método biureto (GORNALL *et alii*, 1949).

Para dosar proteína por esse método, toma-se 4 ml do reagente, mais 1,0 ml do extrato sem lipídeos e agita-se bem. A mistura permanece em repouso por 30 minutos, a temperatura ambiente, para completar a reação. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm.

A quantidade de proteína do extrato foi determinada utilizando-se uma reta padrão na faixa de 1 a 10 mg.

O reagente consiste de uma solução de 1,5g de sulfato de cobre, mais 6,0g de tartarato de sódio potássio, dissolvido em água destilada. A esta solução acrescenta-se 300 ml de NaOH, 10% (preparada no dia do uso). À solução final, acrescenta-se 2g de KI (para evitar auto-redução).

2.3.2. Método descrito por LOWRY *et alii* (1951).

O ensaio para dosar proteínas segundo Lowry, consiste de uma mistura de 0,2 ml da amostra (extrato de proteína sem lipídeos), com 1,0 ml do reagente C, agita-se e deixa-se em repouso, por 10 minutos a temperatura ambiente. Após o período de repouso acrescenta-se à mistura, 0,1 ml do reagente E e agita-se imediatamente. Após 30 minutos de reação, a leitura é feita num espectrofotômetro, a 650 nm.

A quantidade de proteína da amostra foi determinada utilizando-se uma reta padrão na faixa de 10 a 100 µg de proteína.

O reagente C consiste da mistura de 50 ml do reagente A, com 1,0 ml do reagente B. O reagente A é uma solução a 2% de carbonato de sódio em NaOH, 0,1N e o reagente B, solução de 0,5% de sulfato de cobre em tartarato de sódio potássio, 1%, em água destilada. Enquanto que o reagente E consiste do reagente Folin-Ciocalteu, 1N em ácido.

2.3.3. Método descrito por BRADFORD (1975).

Toma-se 0,1 ml da solução de proteína e adicionam-se a 5 ml do reagente. A reação completa-se 2 minutos após a mistura e a leitura da absorbância deve ser feita antes de completar uma hora. A leitura é feita num espectrofotômetro, a 595 nm, e a quantidade de proteína da amostra é determinada através de uma reta padrão, na faixa de 10 a 100 µg de proteína.

O reagente é um corante preparado com "Coomassie Brilliant Blue" G250, onde usam-se 100 mg do corante dissolvido em 50 ml de etanol 95%, acrescentando-se a estes, 100 ml de ácido fosfórico 85% (w/v), completando-se o volume final, para 1000 ml com H₂O destilada.

A proteína utilizada para determinar a reta padrão para todos os métodos foi a albumina de soro bovina.

III. RESULTADOS

1. Extração e dosagem da proteína total do cotilédone.

O trabalho tem por objetivo, verificar a eficiência de aproveitamento de diversas fontes de nitrogênio, pelo cotilédone imaturo, mantido em cultura, através da dosagem da quantidade de proteína acumulada para este fim, fez-se necessário escolher um método mais adequado para dosar proteína em cotilédones individuais. Desta forma, foram testados os métodos descritos por GORNALL *et alii* (1949), LOWRY *et alii* (1951) e BRADFORD (1975).

A figura 5. mostra o padrão segundo o método biureto, descrito por GORNALL *et alii*. Pode-se observar que a sensibilidade é na faixa de concentração de proteína, de 1 a 10 mg, sendo assim, este método é insuficiente para dosar proteína obtida a partir de cotilédones individuais e que caem na faixa de concentração de μg /cotilédone.

A figura 6. apresenta o padrão para os métodos descritos por LOWRY *et alii* e BRADFORD. Os dois métodos apresentam sensibilidade na faixa de concentração de proteína, de 10 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

A tabela I, apresenta a leitura de absorbância da reação colorimétrica de uma alíquota do extrato de proteína de soja, segundo os métodos testados. Pode-se observar ausência de dados do extrato E₂ (do qual não foram eliminados lipídeos), na coluna L (método descrito por LOWRY *et alii*) e G (biureto). Isto porque o tubo de reação se apresentava turvo, impedindo a leitura. Pode-se observar ainda que a coluna G apresenta outra ausência de dado, esta última, devido a baixa concentração de proteína, quantidade insuficiente para provocar a reação colorimétrica (extrato com

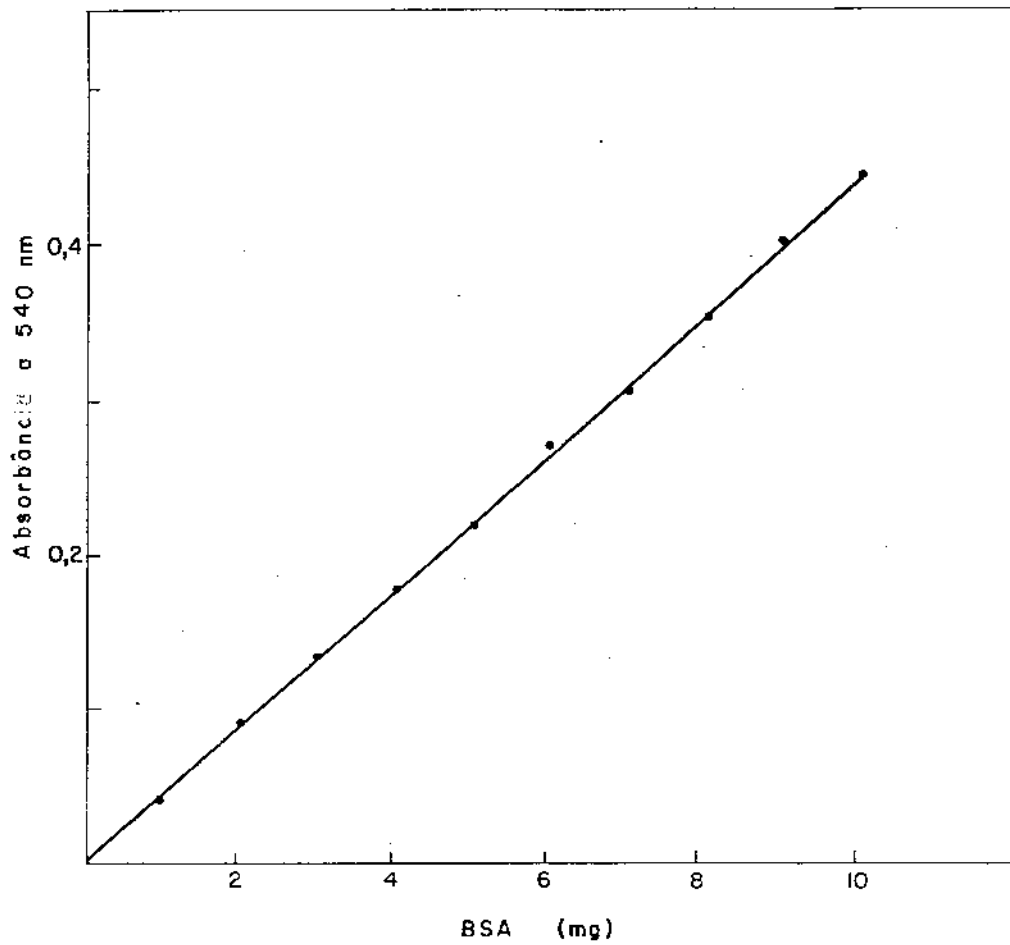


Figura 05. RETA PADRÃO DE PROTEÍNA. Padrão de proteína segundo o método biureto, descrito por GORNALL *et alii* (1949). A concentração de proteína é na faixa de 1 a 10 mg.

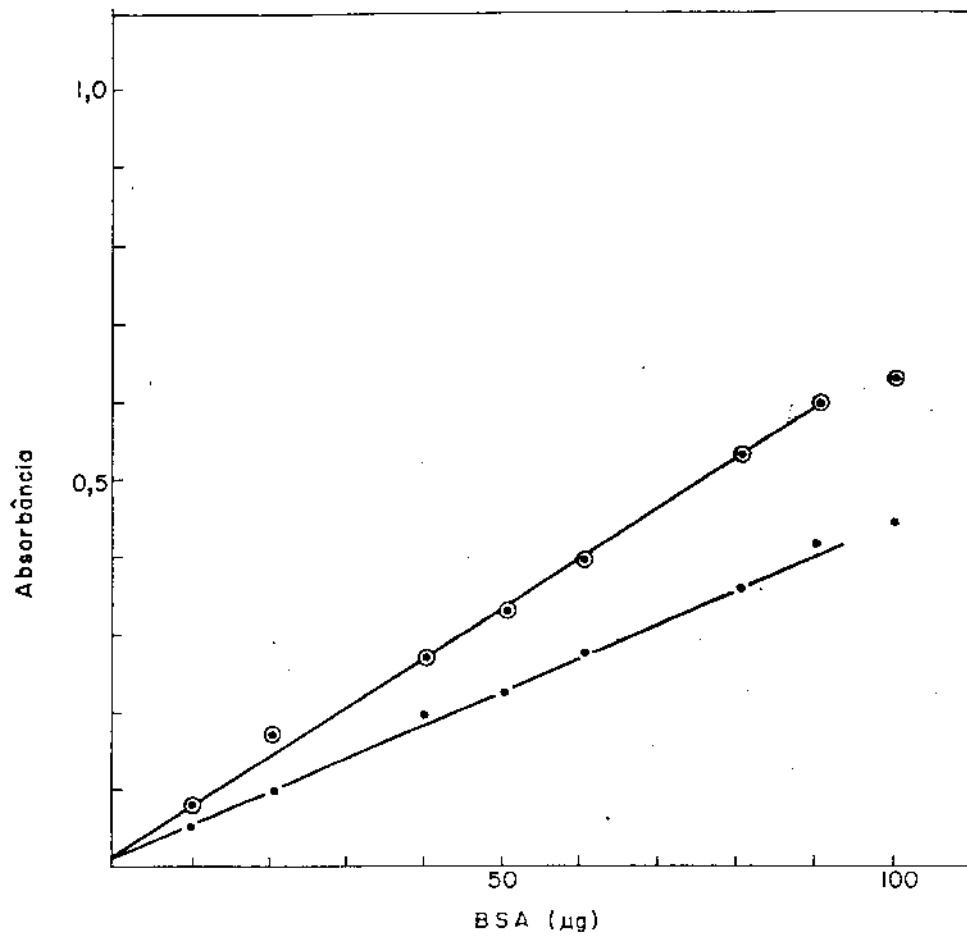


Figura 06. RETA PADRÃO DE PROTEÍNA. \odot — \odot , segundo o método do BRADFORD (1975) e \bullet — \bullet , segundo o método descrito por LOWRY *et alii* (1951). A concentração de proteína foi na faixa de 10 a 100 μg . A leitura da absorvância para o método BRADFORD foi a 595 nm e para o método LOWRY foi a 650 nm.

concentração de proteína na faixa de $\mu\text{g/ml}$).

Após este estudo de comparação entre os métodos para dosar proteína, verificou-se as vantagens oferecidas pelo método BRADFORD, com sensibilidade na faixa de concentração de proteína, de $\mu\text{g/ml}$ e principalmente na extração, sem a necessidade de eliminar lipídeos do extrato. As vantagens constatadas levaram à escolha deste método (BRADFORD), para dosar proteína para o trabalho proposto.

2. Sistema de cultura de cotilédones imaturos de soja.

A fim de entender melhor o metabolismo de utilização do nitrogênio translocado em direção às sementes, foi idealizado uma maneira de acompanhar o desenvolvimento de cotilédones imaturos. Trabalhos de MILLERD *et alii* (1975) e THOMPSON *et alii* (1977), mostraram a possibilidade de cultivar cotilédones em meio de cultura conhecido. Este sistema, de meio de cultura definido, parece adequado para se estudar o aproveitamento de diferentes compostos nitrogenados, uma vez que esta é uma maneira de se acompanhar o desenvolvimento dos cotilédones de soja, com total controle das condições de experimento.

Inicialmente, para utilizar este meio, foi necessário conhecer a dinâmica do sistema de cultura, em termos de tamanho mais adequado dos cotilédones e tempo de incubação.

2.1. O desenvolvimento dos frutos na planta

Foi acompanhado o crescimento das sementes medindo o comprimento das vagens e determinando o peso fresco do par de cotilédones (semente sem a testa e eixo embrionário), durante o desenvolvimento na planta, com início logo após a antese.

TABELA I. DOSAGEM DE PROTEÍNA SEGUNDO OS MÉTODOS BIURETO (G), LOWRY (L) E BRADFORD (B). Extrato de proteína de um cotilédone de soja. O E₁ correspondente à fração sem lipídeos; E₂, sem eliminar lipídeos e E₃ ao extrato com baixo conteúdo proteico.

| | L | B | G | |
|------------------------------|-------|--------|-------|------------------------------|
| Absorbância | 0,179 | 0,349 | 0,149 | |
| Proteína (mg/ cotilédone) | 3,612 | 4,912 | 3,312 | E ₁ [§] |
| Absorbância | turvo | 0,400 | turvo | |
| Proteína (mg/ cotilédone) | 0,000 | 5,654 | 0,000 | E ₂ [§] |
| Absorbância | 0,362 | 0,212 | 0,000 | |
| Proteína (mg/ cotilédone) | 0,785 | 1,0205 | 0,000 | E ₃ ^{§§} |

§ - volume total do extrato - ~14 ml

§§ - volume total do extrato - ~5 ml

A tabela II fornece as medidas de comprimento das vagens e peso do par de cotilédones, durante o período de 10 a 30 dias após a ântese. Estas medidas mostram que as vagens atingiram o máximo em comprimento aos 20 dias após a ântese. A partir desse estágio, a formação da semente tornou-se visível, atingindo um tamanho que oferece condições para manipulá-la.

A tabela III apresenta as medidas em peso seco e proteína, durante o desenvolvimento dos cotilédones (sem a testa e eixo embrionário), no período entre 13 dias a 63 dias após a ântese. Essas medidas foram feitas para se verificar o crescimento dos frutos "in situ".

A figura 7 mostra a curva do ganho em peso seco (PS) dos cotilédones durante o período em que o crescimento foi acompanhado.

A figura 8 mostra a curva de armazenamento de proteína em cotilédones de soja, no período de 13 a 63 DAA. Estes dados mostram que existe um período logo após a ântese em que o ganho em proteína é baixo. Com cerca de 20 DAA, os cotilédones atingem um período de rápido aumento em proteína, até cerca de 40 DAA, quando atingem o máximo em aumento, cerca de 34 mg de proteína/cotilédone. Estes dados e o fato observado anteriormente, de que com cerca de 20 DAA, tornou-se possível a manipulação da semente, permitem concluir que essa é a fase de desenvolvimento dos cotilédones, ideal para o estudo proposto. Isto porque as sementes se encontram na fase inicial de desenvolvimento e conseqüentemente, de armazenamento de proteína.

TABELA II. MEDIDAS DE COMPRIMENTO DE VAGENS E MÉDIA ARITMÉTICA DO PESO FRESCO DE PAR DE COTILÉDONES DE SOJA DE 10 A 30 DIAS APÓS A ANTESE (DAA). Cada cotilédone tem peso fresco acima de 30 mg, a partir de 20 DAA.

| D A A | Comprimento da vagem de soja (cm). | Peso fresco do par de cotilédones (mg). |
|-------|--|---|
| 10 | 2,2 | - |
| 12 | 2,8 | - |
| 16 | 4,3 | 8,65 |
| 20 | 4,5 | 56,37 |
| 21 | 4,5 | 61,10 |
| 22 | 4,5 | 72,62 |
| 23 | 4,5 | 86,24 |
| 24 | 4,5 | 98,00 |
| 25 | 4,5 | 115,34 |
| 26 | 4,5 | 151,36 |
| 27 | 4,5 | 186,04 |
| 28 | 4,5 | 203,12 |
| 29 | 4,5 | 289,34 |
| 30 | 4,5 | 318,42 |

TABELA III. MEDIDAS EM mg DE PESO FRESCO, PESO SECO E PROTEÍNA TOTAL E RESPECTIVOS ERROS PADRÕES, DE CO₂ TILÉDONES DE SOJA DURANTE ONTOGÊNESE DO FRUTO. As medidas foram feitas no período de 13 dias após a ântese (DAA) a 63 DAA. Cada medida é o resultado de 10 repetições.

| DAA | PESO FRESCO | PESO SECO | PROTEÍNA TOTAL |
|-----|----------------|---------------|-------------------|
| 13 | 5,20 (0,12) | 0,64 (0,055) | 0,047 (0,004) |
| 15 | 13,58 (0,31) | 2,27 (0,012) | 0,40 (0,0007) |
| 18 | 22,81 (2,24) | 3,06 (0,050) | 0,46 (0,0011) |
| 19 | 35,59 (3,12) | 6,38 (0,150) | 1,77 (0,0038) |
| 20 | 48,68 (3,64) | 10,59 (0,410) | 2,28 (0,4115) |
| 21 | 45,46 (5,97) | 10,52 (0,100) | 3,47 (0,0164) |
| 22 | 53,57 (1,09) | 14,41 (0,160) | 4,51 (0,0247) |
| 23 | 77,48 (16,39) | 21,94 (1,990) | 8,70 (0,0283) |
| 25 | 85,87 (4,67) | 22,71 (0,560) | 8,03 (0,0650) |
| 28 | 91,34 (5,54) | 30,11 (1,010) | 8,09 (0,0440) |
| 31 | 132,18 (14,34) | 49,05 (2,230) | 16,43 (0,2190) |
| 36 | 156,72 (14,54) | 67,69 (1,990) | 23,36 (0,1460) |
| 41 | 177,30 (11,58) | 82,82 (0,950) | 34,39 (0,8300) |
| 46 | 186,05 (10,95) | 91,44 (3,520) | 33,62 (0,1600) |
| 56 | 129,03 (25,98) | 91,75 (0,340) | 26,05 (0,7800) |
| 63 | 73,47 (4,99) | 68,22 (4,570) | 27,37 (1,0900) |

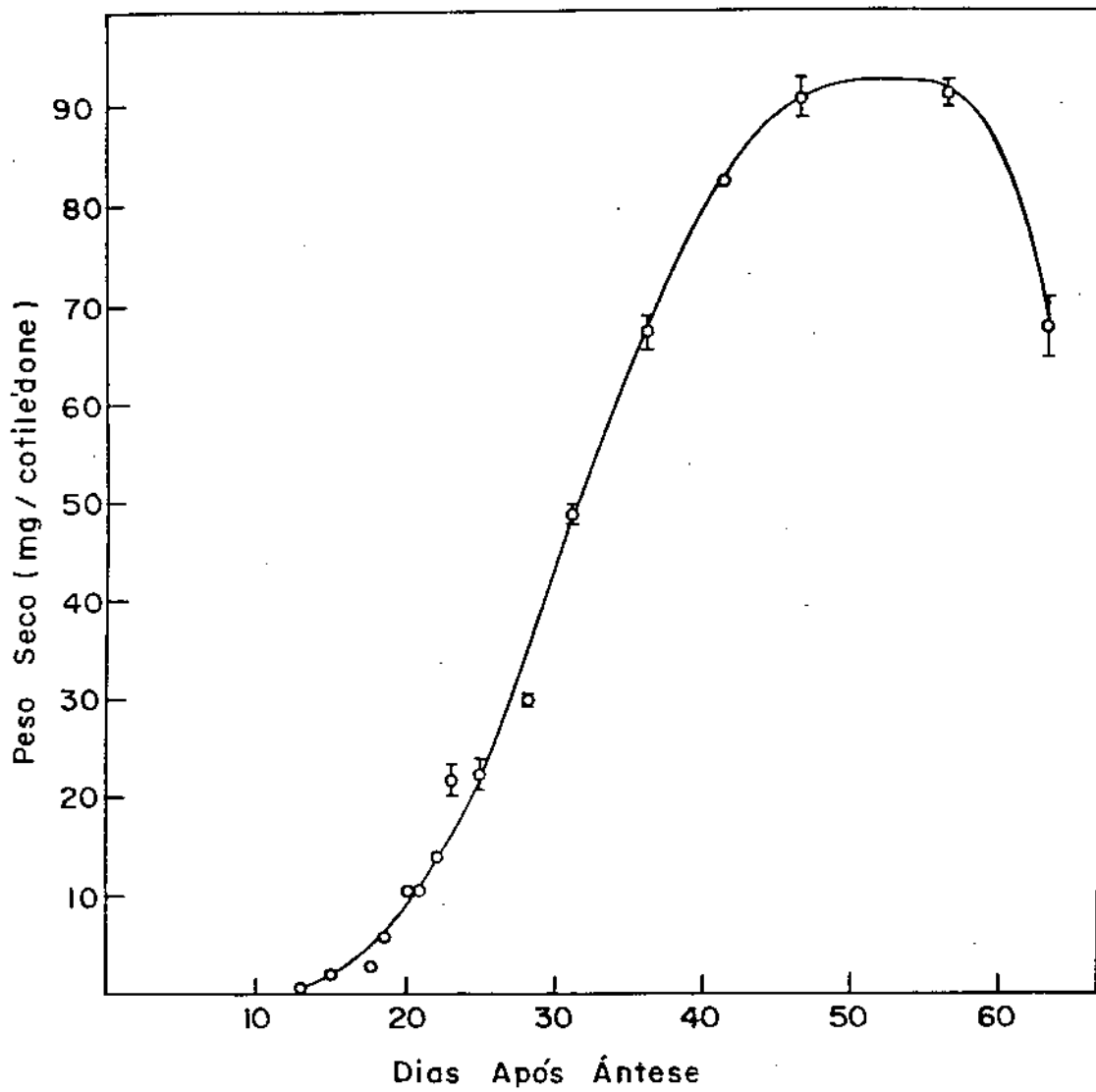


Figura 07. VARIAÇÃO EM PESO SECO DO COTILÉDONE DURANTE A ONTOGÊNESE DO FRUTO; com intervalo de confiança a 95% de probabilidade, de 13 a 63 dias após a antese.

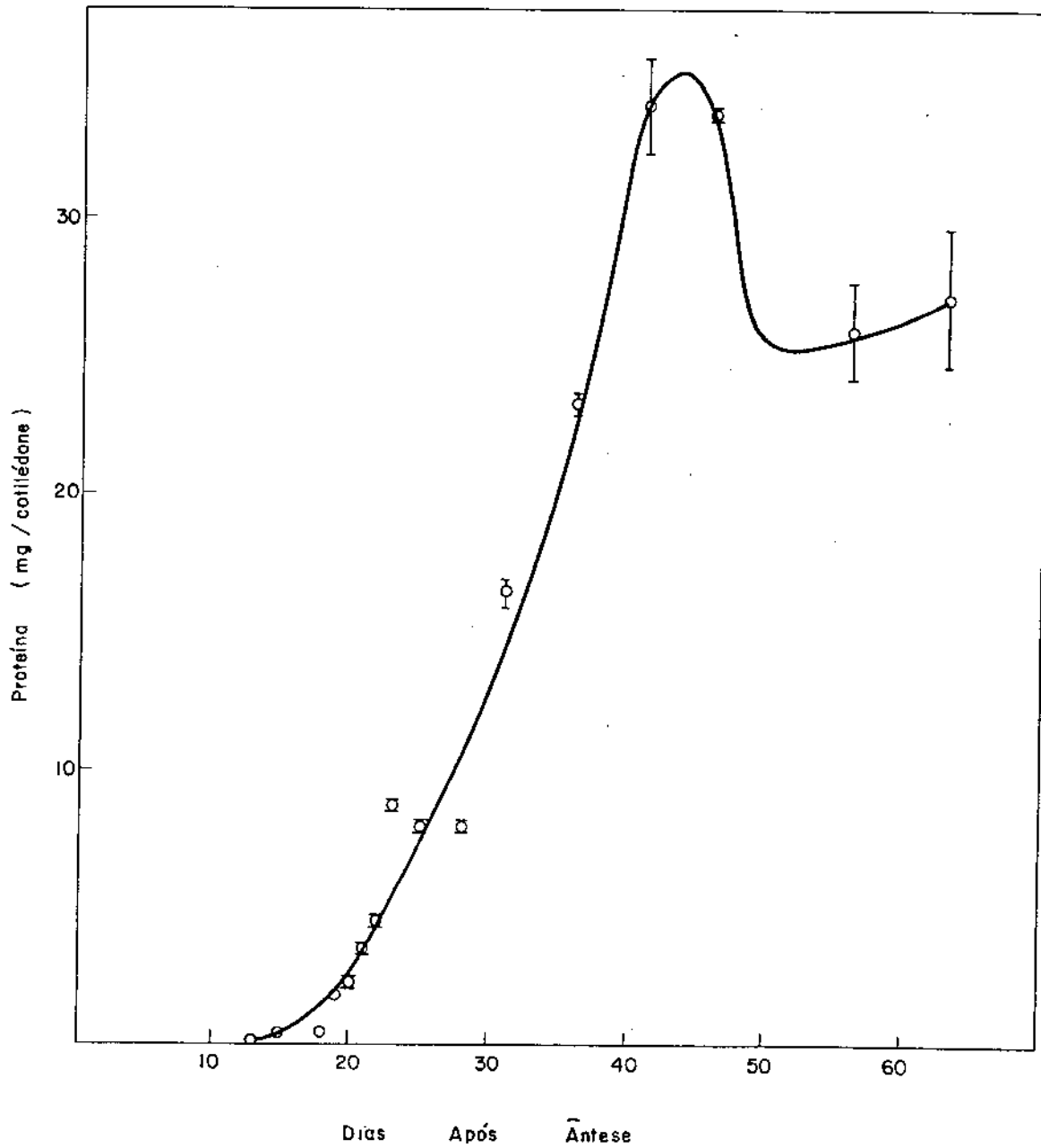


Figura 8. VARIACÃO DO CONTEÚDO EM PROTEÍNA DO COTILÉDONE DE SOJA, DURANTE A ONTOGÊNESE DO FRUTO; com intervalo de confiança a 95% de probabilidade, no período de 13 a 63 dias após a antese.

2.2. Determinação do tamanho ideal de cotilédones de soja, para utilização em cultura.

Com a obtenção dos dados de crescimento dos cotilédones, durante o seu desenvolvimento na planta, foi iniciado o estudo do comportamento dos cotilédones imaturos de soja em meio de cultura definido.

Nesta etapa do trabalho foi feita a verificação do tamanho mais adequado de cotilédone imaturo de soja, para cultivar em meio de cultura. Com este fim, foram feitas culturas de cotilédones na faixa de peso fresco inicial (PFI) de 10 a 80 mg.

A tabela IV e figura 9 mostram os resultados em peso seco (PS) obtidos com cultura de cotilédones imaturos de soja de vários tamanhos, incubados durante o período de 6 dias, usando a glutamina como fonte de nitrogênio.

Pode-se observar que na tabela IV em PS, o máximo de aumento em quantidade de matéria seca (Δ PS) é atingido por cotilédones na faixa de PFI de 20 a 80 mg, sendo que o resultado é mantido constante nesta faixa de PFI.

O máximo aumento em quantidade de proteína é verificado a partir de cotilédones na faixa de PFI de 30 mg e este valor é mantido constante até 80 mg de PFI (tabela V e figura 10). A análise estatística destes dados (tabela IV e V) mostra que cotilédones na faixa de PFI entre 10 e 20 e entre 20 e 30 mg apresentam diferenças significativas em termos de ganho em PS e proteína, mas na faixa de PFI, entre 30 e 80 mg, não apresentam diferenças em ganho de PS e acúmulo de proteína.

Os dados em PS e proteína de cotilédones imaturos de soja, com PFI entre 30 e 80 mg, ou no período de 20 a 24 DAA de desenvolvimento da semente, após a incubação, mostram ser adequados para utilização em cultura. Is

to porque os cotilédones entre 30 e 80 mg de PFI, atingem o mesmo nível de PS e proteína, após o período de incubação (tabelas IV e V e figuras 9 e 10). Além disso, os cotilédones nesta faixa de PFI ou idade estão em fase inicial de síntese de proteína, como mostram as figuras 8 e tabela III. Este resultado é muito importante, pois ele possibilita a utilização de cotilédones imaturos de soja numa larga faixa de PFI, já que a escolha numa única faixa de peso fresco torna-se difícil, pois trata-se de uma manipulação em condições estéreis.

2.3. Determinação do período de incubação

Foi necessário averiguar o tempo adequado de incubação das culturas, para a realização de ensaios numa faixa de período em que houvesse aumento em PS e proteína.

Para este experimento, foram feitas várias culturas e incubadas em diferentes intervalos de tempo (o tempo foi contado em dias). Os intervalos de incubação utilizados foram: 4, 6, 10, 13 e 16 dias. Sendo que os cotilédones usados foram da faixa de PFI entre 30 e 40 mg.

A figura 11 mostra o ganho em PS durante o período de incubação de zero a 16 dias, e a figura 12, os resultados em proteína do ensaio.

Analisando as figuras 11 e 12, pode-se verificar que há um período rápido de ganho em PS e proteína, desde o período de 4 a 10 dias de incubação. Após esse período de incubação, o PS apresentou diminuição da taxa de aumento e a acumulação de proteína atingiu o patamar. Desta forma, a fim de operar numa faixa de período de incubação em que o ganho, principalmente em proteína, estivesse ainda, em fase de aumento, o período mais adequado foi de 6 a 8 dias.

TABELA IV. AUMENTO EM PESO SECO (PS) E ERRO PADRÃO EM MG DE COTILÉDONES DE VÁRIOS TAMANHOS INCUBADOS POR UM PERÍODO DE 6 DIAS. A faixa de peso fresco inicial utilizada foi entre 10 e 80 mg.

| P F I | PESO SECO INICIAL (PSI) | PESO SECO FINAL (PSP) | $\Delta = (\text{PSF} - \text{PSI})$ | AUMENTO PERCENTUAL |
|---------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 11 - 20 | 2,09 (0,020) | 23,05 (0,189) | 20,95 (0,184) | 1055 |
| 21 - 30 | 3,29 (0,089) | 34,56 (0,375) | 28,10 (2,427) | 950 |
| 31 - 40 | 6,10 (0,079) | 36,53 (0,241) | 30,41 (0,313) | 598 |
| 41 - 50 | 9,23 (0,061) | 41,53 (0,257) | 33,36 (0,853) | 450 |
| 51 - 60 | 13,36 (0,256) | 45,13 (0,505) | 34,72 (1,195) | 345 |
| 61 - 70 | 16,80 (0,180) | 46,21 (0,624) | 32,58 (0,641) | 275 |
| 71 - 80 | 18,51 (0,102) | 52,60 (1,103) | 35,84 (4,740) | 284 |

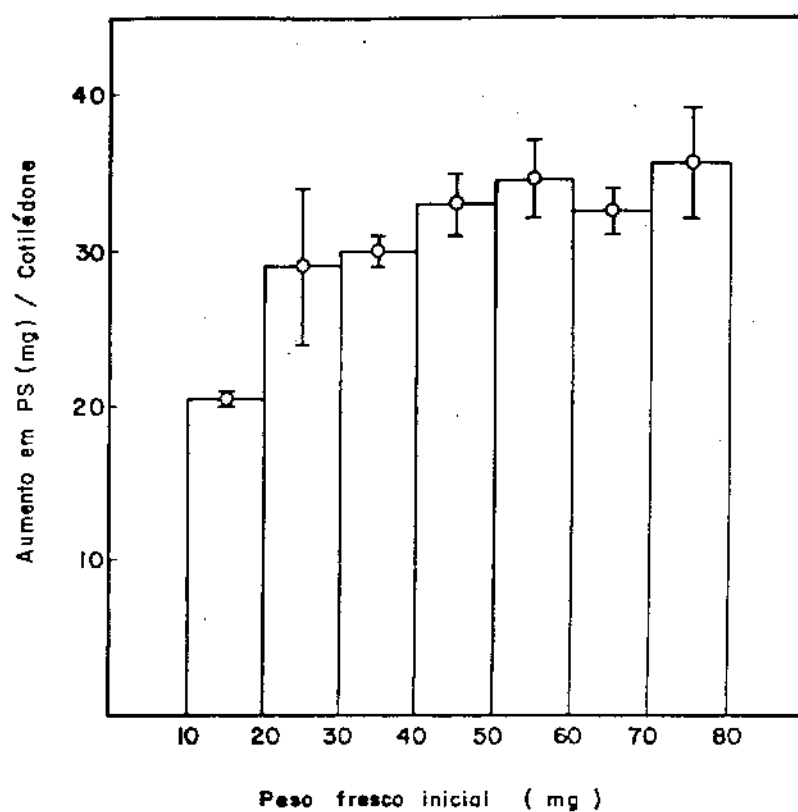


Figura 09. AUMENTO EM PESO SECO (PS) DE COTILÉDONES CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA; com intervalo de confiança, a 95% de probabilidade.

TABELA V. AUMENTO DE PROTEÍNA E ERRO PADRÃO EM mg EM COTILÉDONES DE VÁRIOS TAMANHOS INCUBADOS POR UM PERÍODO DE 6 DIAS. A faixa de peso fresco inicial variou de 10 a 80 mg.

| PESO FRESCO INICIAL | VALOR INICIAL (VI) | VALOR FINAL (VF) | $\Delta = (VF - VI)$ | AUMENTO PERCENTUAL |
|---------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|
| 11 - 20 | 0,32 (0,024) | 15,65 (0,295) | 15,14 (1,534) | 4490 |
| 21 - 30 | 0,64 (0,025) | 17,15 (0,250) | 16,68 (0,411) | 2679 |
| 31 - 40 | 1,30 (0,050) | 22,44 (0,469) | 21,14 (1,187) | 1726 |
| 41 - 50 | 2,01 (0,036) | 23,19 (0,144) | 20,74 (0,172) | 1153 |
| 51 - 60 | 2,65 (0,068) | 23,24 (0,347) | 20,62 (0,983) | 876 |
| 61 - 70 | 3,43 (0,015) | 23,62 (0,284) | 20,27 (0,456) | 688 |
| 71 - 80 | 7,09 (0,134) | 27,10 (0,376) | 18,10 (0,936) | 382 |

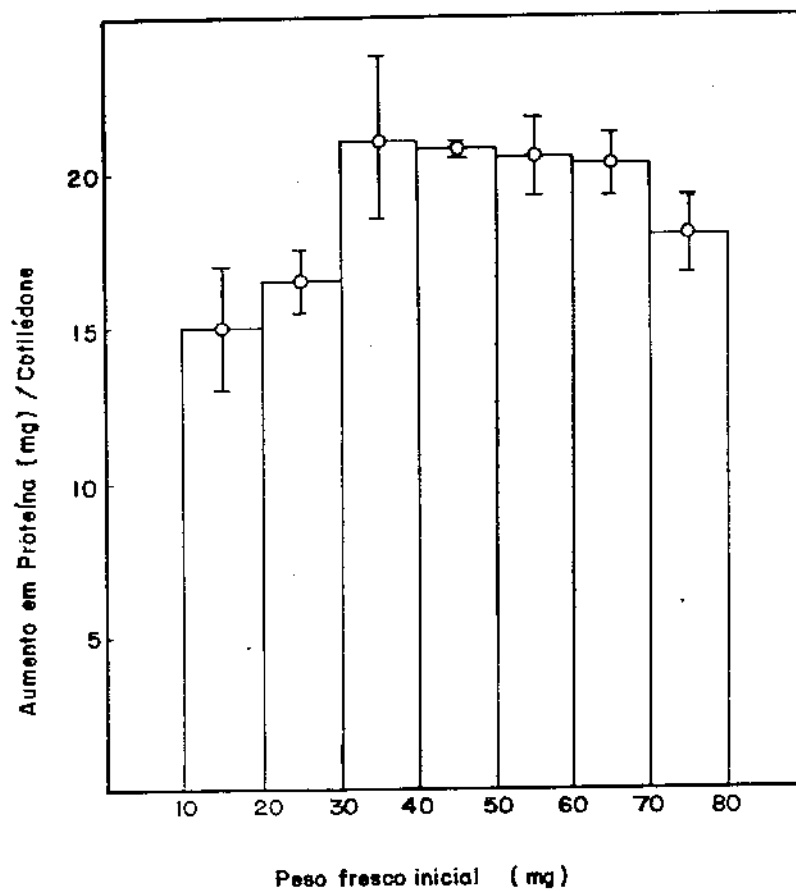


Figura 10. AUMENTO EM PROTEÍNA DE COTILÉDONES CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA; com o intervalo de confiança, a 95% de probabilidade.

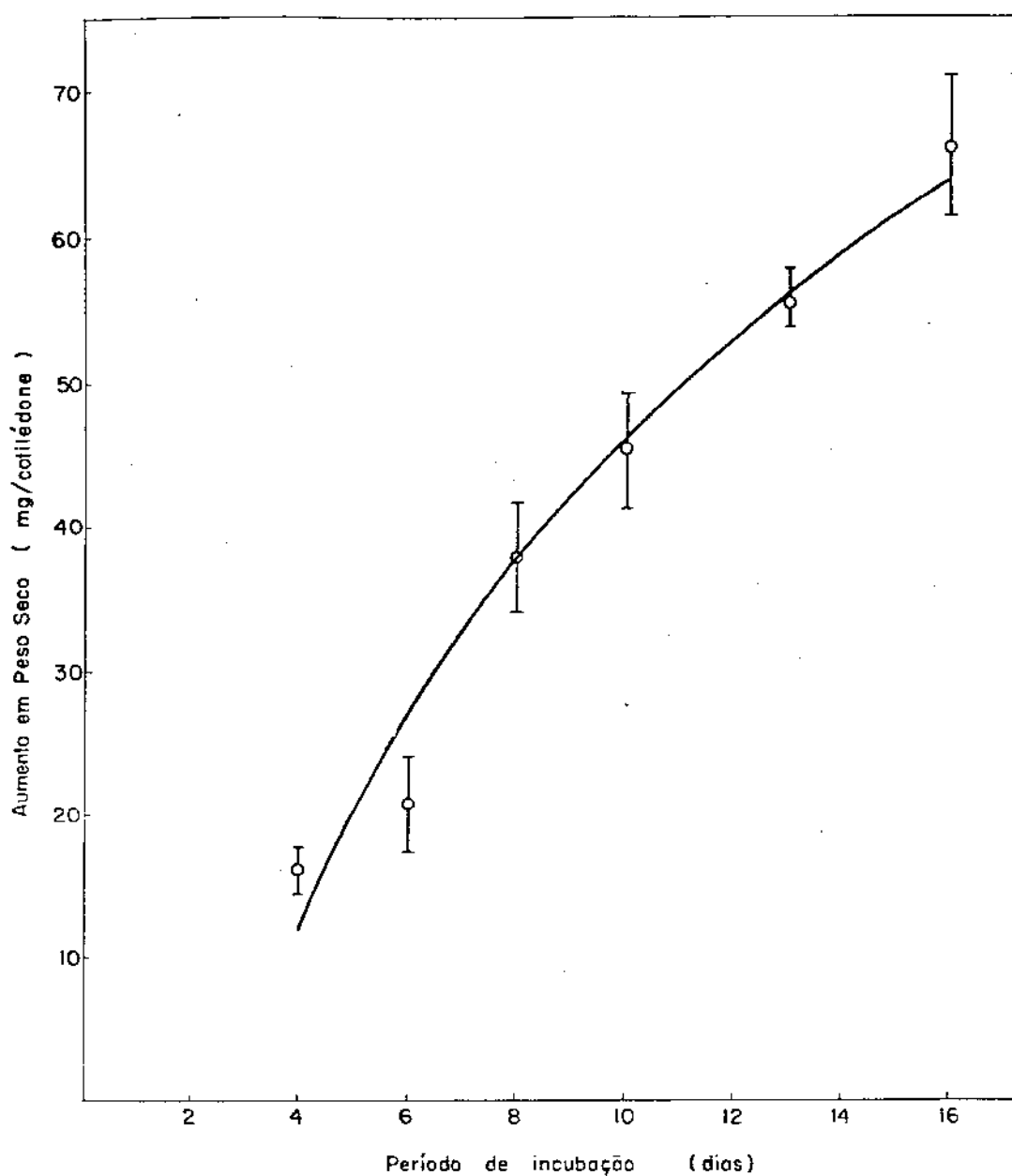


Figura 11. AUMENTO EM PESO SECO, COM INTERVALO DE CONFIANÇA A 95% DE PROBABILIDADE, DE COTILÉDONES IMATUROS DE SOJA, COM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO. A faixa de peso fresco inicial utilizada foi entre 30 e 40 mg.

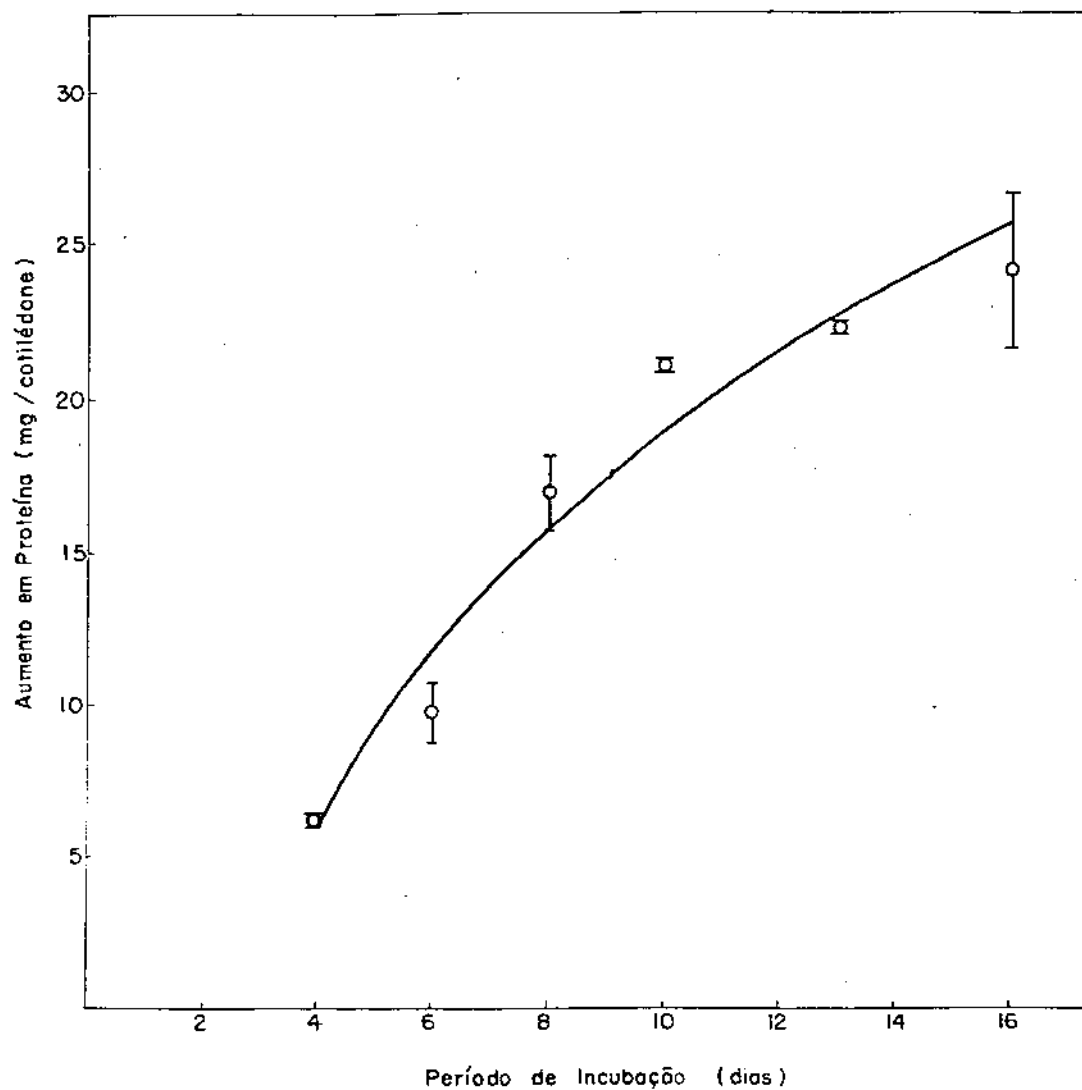


Figura 12. AUMENTO EM PROTEÍNA E INTERVALO DE CONFIANÇA A 95% DE PROBABILIDADE, EM COTILÉDONES DE SOJA, INCUBADOS EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO. Os cotilédones utilizados foram da faixa de peso fresco inicial entre 30 e 40 mg.

2.4 Crescimento dos cotilédones pertencentes ao mesmo embrião e cotilédones ao acaso.

A avaliação do aproveitamento de diferentes compostos nitrogenados na síntese de proteína pelos cotilédones, foi feita através de comparações. A fim de verificar a variabilidade entre cotilédones, foi feito um experimento para se estudar as respostas de cotilédones, em termos de ganho em matéria seca e síntese de proteína, nas mesmas condições de meio de cultura. O resultado desse experimento é apresentado nas tabelas VI e VII, onde cotilédone A e cotilédone B, pertencem ao mesmo embrião.

Os dados obtidos com cotilédones pareados e ao acaso foram estatisticamente analisados, através do teste de médias. A análise dos dados de PS e proteína, mostrou que cotilédones tomados ao acaso apresentam diferença significativa ao nível de 5%. Sendo assim, cotilédones pares são mais adequados para estudos comparativos.

3. Aproveitamento de vários compostos como fonte de nitrogênio.

Conhecendo-se a dinâmica do sistema de cultura de cotilédones, tornou-se possível a prática do teste de aproveitamento de vários compostos como fonte de nitrogênio, para síntese de proteína nos cotilédones imaturos de soja. Uma fonte de nitrogênio, a glutamina, foi escolhida como padrão, a fim de estabelecer comparações entre os resultados obtidos com os vários compostos nitrogenados. As fontes de nitrogênio escolhidas, foram compostos representativos, daqueles normalmente encontrados na via de transporte, em direção à semente em formação, ou outros compostos importantes no metabolismo de nitrogênio da planta. Estes compostos ni

TABELA VI. MEDIDAS DE PESO SECO FINAL (mg) NO PAR DE COTILÉDONES (A E B) DO MESMO EMBRIÃO, APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO. Os cotilédones utilizados estavam na faixa de peso fresco inicial de 40 mg.

| AMOSTRA | COTILÉDONE A | COTILÉDONE B | $A_i - B_i$ | $A_i - B_j$ |
|---------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| Nº | | | | |
| 01 | 23,77 | 23,67 | 0,10 | -10,40 |
| 02 | 28,85 | 34,17 | -5,32 | - 1,21 |
| 03 | 25,10 | 30,06 | -4,96 | -12,70 |
| 04 | 38,08 | 37,80 | 0,28 | 5,93 |
| 05 | 33,40 | 32,15 | 1,25 | 3,07 |
| 06 | 27,41 | 30,33 | -2,92 | - 8,06 |
| 07 | 28,32 | 35,47 | -7,15 | 2,62 |
| 08 | 24,57 | 25,70 | -1,13 | - 0,14 |
| 09 | 28,09 | 24,71 | 3,38 | - 8,61 |
| 10 | 36,45 | 36,70 | -0,25 | 6,72 |
| 11 | 28,12 | 29,73 | -1,61 | 0,45 |
| 12 | 32,67 | 27,67 | 4,99 | 11,07 |
| 13 | 27,90 | 21,60 | 6,30 | 4,90 |
| 14 | 25,85 | 23,00 | 2,85 | - 1,15 |
| 15 | 26,48 | 27,00 | -0,52 | 0,28 |
| 16 | 27,40 | 26,20 | 1,20 | 3,73 |
| MÉDIA | 28,72 | 29,11 | 2,76 | 5,06 |

TABELA VII. DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL (mg) NO PAR DE COTILÉDONES (A E B) DO MESMO EMBRIÃO, APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO. Os cotilédones utilizados estavam na faixa de peso fresco inicial de 40 mg.

| AMOSTRA | COTILÉDONE A | COTILÉDONE B | $A_i - B_i$ | $A_i - B_j$ |
|---------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| Nº | | | | |
| 01 | 6,64 | 6,10 | 0,54 | -3,23 |
| 02 | 8,93 | 9,87 | -0,94 | 1,47 |
| 03 | 6,73 | 7,46 | -0,68 | -3,17 |
| 04 | 11,25 | 9,90 | 1,36 | 1,29 |
| 05 | 7,78 | 9,96 | -1,88 | -1,05 |
| 06 | 7,49 | 8,83 | -1,34 | -0,62 |
| 07 | 7,36 | 8,11 | -0,75 | 2,99 |
| 08 | 5,33 | 4,37 | 0,96 | 0,16 |
| 09 | 5,28 | 5,17 | 0,11 | -3,15 |
| 10 | 9,11 | 8,43 | 0,71 | 2,12 |
| 11 | 6,35 | 6,99 | -0,64 | -1,36 |
| 12 | 8,19 | 7,71 | 0,48 | 2,86 |
| 13 | 4,29 | 5,33 | -1,03 | -0,78 |
| 14 | 5,50 | 5,07 | 0,44 | 0,54 |
| 15 | 5,65 | 6,04 | 0,39 | -0,58 |
| 16 | 6,35 | 6,23 | 0,12 | 0,25 |
| MÉDIA | 7,20 | 7,41 | 0,77 | 1,60 |

trogenados foram: asparagina, aspartato, glutamina, ácido alantóico, alantoina, mistura de aminoácidos (caseína hidrolizada, 13% de nitrogênio), uréia, sulfato de amônia, nitrato de potássio e nitrato de sódio. A concentração final em nitrogênio, para todas as fontes de nitrogênio, orgânico ou inorgânico, foi de 1,75 mg/ml de meio de cultura. Foi incluído também, a cultura de cotilédones de soja com meio de cultura não contendo nenhuma fonte de nitrogênio, como controle.

3.1 Compostos nitrogenados orgânicos.

Na tabela VIII, podem ser observados os resultados obtidos de cotilédones imaturos de soja, cultivados em diferentes fontes de nitrogênio orgânico, já comparados diretamente com o padrão (outro par cultivado com glutamina). Estes dados podem ser ordenados de forma decrescente, quanto à eficiência na síntese de proteína, como mostra o esquema que se segue.

GLN > ASN > Cas.Hidr. > Á.Alant.> ASP > Alant.> GLU > uréia

Este resultado mostra que a fonte mais eficiente para incorporação de nitrogênio foi a glutamina, superando inclusive a mistura de aminoácidos (caseína hidrolizada).

Em soja, a asparagina, fonte nitrogenada mais importante que a glutamina, em quantidade transportada mostrou ser uma fonte de nitrogênio menos eficiente que glutamina. Quanto aos ureídeos, principalmente a alantoina, mostraram uma baixa eficiência, considerando a sua importância na nutrição da semente e quantidade transportada (bem maior que a glutamina).

TABELA VIII. VALORES PERCENTUAIS E ERRO PADRÃO PARA MATÉRIA SECA E PROTEÍNA RELATIVOS À GLUTAMINA (FONTE PADRÃO) EM COTILÉDONES IMATUROS DE NITROGÊNIO ORGÂNICO. Os resultados foram obtidos após incubação durante 7 dias. A concentração final de nitrogênio em cada frasco foi de 1,75 mg/ml de meio de cultura.

| FONTES DE N | REPETIÇÕES Nº | VALOR PERCENTUAL EM RELAÇÃO À FONTE PADRÃO | |
|-------------------------------------|------------------|---|-----------------|
| | | MATÉRIA SECA | PROTEÍNA |
| Sem N | 5 | 54,00 (8,03) | 17,00 (0,26) |
| Caseína hidrolizada (13,7% de N) | 4 | 81,37 (8,70) | 58,43 (0,58) |
| Asparagina | 6 | 78,47 (0,75) | 72,05 (4,56) |
| Ácido Aspártico | 5 | 80,26 (1,64) | 32,46 (1,84) |
| Ácido Glutâmico | 6 | 34,18 (1,45) | 15,86 (3,39) |
| Alantoina | 7 | 60,62 (1,07) | 30,68 (0,96) |
| Ácido Alantóico | 6 | 53,85 (2,00) | 48,66 (7,64) |
| Uréia | 7 | 26,70 (2,67) | 10,48 (0,51) |

3.2 Compostos nitrogenados inorgânicos.

Os resultados da tabela IX mostram que a utilização de fontes de nitrogênio inorgânico, por cotilédones imaturos é insipiente. Mesmo assim, apenas nitrato de amônia mostrou algum rendimento em proteína, enquanto que nitratos na forma de potássio e sódio e a amônia na forma de sulfato, produziram quantidades semelhantes ao controle (fonte menos N).

4. Estudo com inibidor específico

As fontes de nitrogênio mais importantes devido a sua alta concentração no transporte dentro da planta são: glutamina, asparagina e ureídeos. Pelo que se conhece do metabolismo desses compostos, pode-se esperar o envolvimento de amônia no metabolismo de asparagina (LEA *et alii*, 1977b) e ureídeos, (LEA e MIFLIN, 1980). Uma das maneiras de verificar a presença dessa etapa no metabolismo desses compostos nitrogenados, poderá ser feita como o uso de MSO. A metionina sulfoximina é inibidor específico da enzima glutamina sintetase (GS) (MIFLIN e LEA, 1976), que está normalmente envolvida em processos de reassimilação de amônia na planta.

Os ensaios com inibidor foram feitos com fontes de nitrogênio, tais como, a glutamina, asparagina, alanina, ácido alantóico e ausência de nitrogênio. A concentração final de nitrogênio foi de 1,75 mg/ml de meio de cultura.

Os dados da tabela X, mostram os resultados deste experimento, e eles demonstram que, na síntese de proteína, os cotilédones cultivados em meio de cultura com glutamina e ausência de nitrogênio, não foram inibidos por MSO,

TABELA IX. VALORES PERCENTUAIS E ERRO PADRÃO PARA MATÉRIA SECA E PROTEÍNA DE COTILÉDONES IMATUROS DE SOJA CULTIVADOS EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO I NORGÂNICO. Os resultados foram obtidos após in cubação durante 7 dias. A concentração final do nitrogênio em cada frasco foi de 1,75 mg/ml de meio de cultura.

| FONTES DE N | REPETIÇÕES Nº | VALOR PERCENTUAL EM RELAÇÃO À FONTE PADRÃO | |
|---|------------------|---|-----------------|
| | | PS | PROTEÍNA |
| Sem N | 5 | 54,00 (8,03) | 17,00 (0,26) |
| KNO ₃ | 4 | 22,68 (2,20) | 12,15 (1,78) |
| NaNO ₃ | 7 | 19,67 (0,93) | 5,36 (0,71) |
| NH ₄ NO ₃ | 4 | 45,75 (1,93) | 34,00 (1,87) |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 5 | 14,16 (1,26) | 10,55 (3,54) |

enquanto que resultados da adição das fontes de asparagina, alantofina e ácido alantóico, causaram inibição no processo de acumulação de proteína.

Os níveis de inibição na síntese de proteína, foram de cerca de 76% para asparagina, 70% para alantofina e 80% para ácido alantóico, em relação ao par sem inibidor.

Os dados de proteína em cotilédones cultivados em meio de cultura -N, na presença do inibidor, apresentam resultados superiores aos de asparagina, alantofina e ácido alantóico (com inibidor), embora esses cotilédones devessem apresentar níveis semelhantes de compostos nitrogenados endógenos.

TABELA X. AUMENTO EM PROTEÍNA DE COTILÉDONES CULTIVADOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE METIONINA SULFOXIMINA (MSO) E PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO (I), COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO. A concentração final do MSO foi de 1 mM/3ml. Os dados de proteína foram calculados pela diferença, Proteína = proteína final - proteína inicial (conteúdo de proteína do cotilédone na faixa de peso inicial de 30 a 40 mg). Foram utilizados cotilédones da faixa de PFI de 30-40 mg e um período de incubação de 7 dias.

| FONTES DE N | REPETIÇÕES | PROTEÍNA | | I |
|-----------------|------------|----------|---------|----|
| | | COM MSO | SEM MSO | |
| | Nº | mg | mg | % |
| GLN | 10 | 19,50 | 19,32 | 0 |
| ASN | 09 | 4,23 | 17,17 | 76 |
| Alantoína | 09 | 3,02 | 10,20 | 70 |
| Ácido Alantóico | 08 | 2,00 | 10,79 | 80 |
| sem nitrogênio | 09 | 6,78 | 6,0 | 0 |

IV. DISCUSSÃO

A síntese de proteína de reserva de sementes de soja se completa normalmente num período de cerca de 20 dias (HILL e BRIEDENBACH, 1974 a e b; MORI, 1981), atingindo o valor de cerca de 70 mg de proteína por semente, que corresponde de 37 a 50% (HARTWIG, 1969). Após o período de maturação das sementes, a quantidade de proteína decresce (HILL e BRIEDENBACH, 1974 b). A determinação de proteína de cotilédones (sem a testa e eixo embrionário) em desenvolvimento, mostrou que ocorre um acúmulo rápido de proteína no período de 20 a 40 DAA, chegando a um valor máximo (26 mg de proteína por cotilédone), apresentando um pequeno decréscimo (de cerca de 5 mg por cotilédone) até o final do período de maturação. Com 20 DAA, os cotilédones de soja se encontram na fase inicial de síntese de proteína, como pode ser visto na figura 4. Esta é uma fase ideal para utilização desses cotilédones para cultivá-los e acompanhar síntese e armazenamento de proteína de reserva. Outro fator importante é que, nesta fase, os cotilédones já estão em condições para manipulação, provocando um mínimo de injúria. A injúria provocada nos cotilédones imaturos, antes da inoculação, provoca o retardamento no crescimento e desenvolvimento em meio de cultura.

MILLERD *et alii* (1975) utilizou cotilédones imaturos de ervilha entre 8 e 11 dias após a ântese, período que inicia síntese de proteína (MILLERD e SPENCER, 1974).

THOMPSON *et alii* (1977) mostrou que o resultado final foi proporcional ao tamanho inicial do cotilédone e procurou minimizar as diferenças nos resultados, usando cotilédones na faixa de peso fresco inicial entre 20 e 40 mg. Ao contrário, o

estudo estatístico dos resultados obtidos em PS (tabela IV e figura 6), mostrou que cotilédones imaturos de soja com PFI na faixa de 30 a 80 mg, em termos de ganho em matéria seca e proteína, não apresentaram variação. Portanto, qualquer cotilédone nesta faixa de PFI é adequado para este tipo de trabalho. Desta forma, torna-se possível o uso de cotilédones numa larga faixa de PFI; este fato facilita o trabalho de escolha das sementes imaturas para manipulação e inoculação em condições estéreis. Os cotilédones, nesta faixa de peso fresco, correspondem a faixa de 19 a 24 DAA, que estão em fase inicial de síntese e armazenamento de proteína (tabela III).

As comparações entre cotilédones do mesmo embrião minimizam o efeito do tamanho inicial do cotilédone (THOMPSON *et alii*, 1977). A escolha desses cotilédones deve diminuir as eventuais diferenças de respostas durante o período de crescimento, como mostra a análise estatística dos dados da tabela VI e VII.

MILLERD *et alii* (1975) mostraram que cotilédones isolados de ervilha podem ser cultivados até 8 dias apresentando síntese de proteína e LEA *et alii* (1979) utilizaram o período de 5 dias de incubação para ervilha. THOMPSON *et alii* (1977) incubaram cotilédones de soja por 6 dias, obtendo nível de proteína semelhante à semente desenvolvida na planta, com maior velocidade de síntese e armazenamento de proteína.

O período de 4 a 10 dias de incubação foi o que apresentou acúmulo rápido de proteína (figura 12). O máximo em proteína foi atingido com 10 dias de incubação, permanecendo constante até o período de 16 dias. O período até 6 ou 8 dias parece o mais adequado, já que neste período, além de ocorrer intensa síntese de proteína, a fonte de nitrogênio no meio ainda não é limitante, atinge um nível de armazenamento de proteína satisfatória, oferecendo assim, melhores condições para comparações entre diferentes fontes de ni

trogênio.

MILLERD *et alii* (1975) sugeriram que em ervilha, a asparagina teve papel importante na síntese de aminoácidos proteicos, nas glutamina não. LEA *et alii* (1979) mostraram que asparagina e glutamina são as melhores fontes de nitrogênio para síntese de proteína em cotilédones de ervilha. A glutamina não funcionou como fonte de nitrogênio para síntese de proteína para MILLERD *et alii* (1975), devido a decomposição deste aminoácido durante o processo de esterilização (LEA *et alii*, 1979).

THOMPSON *et alii* (1977) mostraram que a glutamina foi melhor que a asparagina como fonte de nitrogênio para cotilédones de soja. Embora em termos de quantidade transportada, a asparagina desempenha papel mais importante (PATE *et alii*, 1975).

Os dados da tabela VIII (página 44) e IX (página 46), mostram que a melhor fonte de nitrogênio foi a glutamina superando até mesmo os resultados da mistura de aminoácidos (caseína hidrolizada). A asparagina ficou em segundo lugar e os ureídeos, apesar de representarem a maior fonte de nitrogênio transportado (MIFLIN *et alii*, 1980), apresentaram baixa eficiência. A razão da baixa eficiência é desconhecida, embora trabalhos recentes (THOMAS e SCHRADER, 1971; GOMES e SODEK, 1982) mostram que a enzima alantoinase, supostamente envolvida na utilização de alantoina, está presente em cotilédones imaturos em grandes qualidades. MATSUMOTO *et alii* (1977a), MATSUMOTO *et alii* (1977 b) e GOMES (comunicação pessoal, mostraram a presença dos ureídeos em sementes imaturas de soja, portanto, a baixa eficiência de utilização possivelmente seja devido a problemas de absorção pelo cotilédone em cultura, já que foi detectada a presença de enzima alantoinase.

A eficiência da glutamina como fonte de nitrogênio na síntese de proteína, demonstra que os cotilédones imaturos são capazes de sintetizar outros aminoácidos a partir da glutamina, com grande eficiência. A inabilidade do glutamato agir como fonte de nitrogênio deve ser devido a falta de amônia requerida para síntese de amidas glutamina e asparagina.

O menor aproveitamento dos ureídeos pode significar que os processos de transformações dessas fontes em NH_4^+ são menos eficientes que glutamina a aminoácidos. A total ineficiência da uréia como fonte de nitrogênio pode ser devido ao rápido aumento do pH do meio durante o período de incubação do cotilédone.

A metionina sulfoximina é conhecida inibidora específica da enzima glutamina sintetase (MIFLIN e LEA, 1976), que por sua vez é importante na assimilação da NH_4^+ . Os resultados obtidos com cotilédones imaturos de soja cultivados em diferentes fontes de nitrogênio com este inibidor (tabela X, página 48), mostram uma inibição na utilização de asparagina, alantoína e ácido alantóico, sugerindo que a utilização destes compostos deve envolver a amônia como intermediária e que a reassimilação de NH_4^+ envolve a enzima GS. Este dado estaria de acordo com o esquema abaixo, que representa a maneira pela qual, estes compostos são possivelmente utilizados. LEA *et alii* (1979) sugeriram um esquema semelhante (para asparagina), quando verificaram que a metionina sulfoximina inibiu a utilização de asparagina por cotilédones de ervilha em cultura. O resultado com asparagina por cotilédones imaturos de soja possuem uma asparaginase (GOMES e SODEK, 1982) que libera NH_4^+ da asparagina.

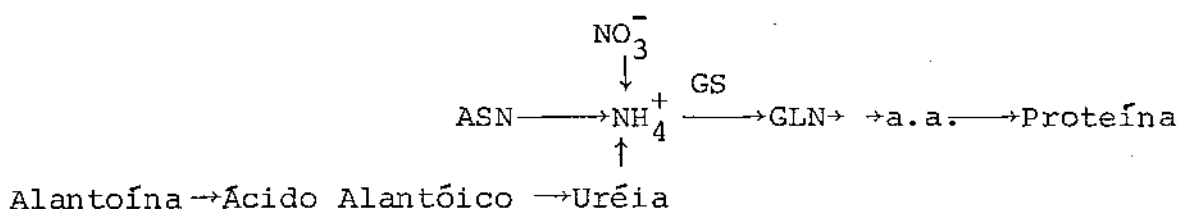


Figura 13. Esquema da assimilação da amônia.

Os resultados (tabela X, página 48), tanto de asparagina como de ureídeos, com inibidor, mostram resultados inferiores a sem nitrogênio com inibidor, talvez este fato se deva à inibição do aproveitamento dos aminoácidos endógenos pelas fontes de nitrogênio fornecidas ao meio de cultura.

O envolvimento da amônia como intermediário, sugere que sais de amônia deveriam constituir uma boa fonte de nitrogênio. No entanto, tal fato não foi verificado experimentalmente (tabela IX, página 46). Provavelmente, esta ineficiência está ligada à eficiência de entrada da amônia nos compartimentos onde ocorrem os processos de assimilação de NH_4^- .

A ineficiência da utilização do NO_3^- se deve à incapacidade dos cotilédones, em reduzi-lo. MORI (1981) não teve sucesso na tentativa de detectar a atividade de redução de nitrato em cotilédones imaturos de soja. De qualquer forma, existe uma certa dúvida quanto ao transporte de NO_3^- até as sementes em desenvolvimento, uma vez que o transporte de NO_3^- parece ser exclusivo do xilema (PATE, 1980), que por sua vez tem poucas ligações com a semente (PATE *et alii*, 1975). Portanto, não haveria necessidade da redução de nitrato em sementes imaturas.

V. CONCLUSÕES

1. O método descrito por BRADFORD, foi mais adequado para dosar proteína em cotilédones individuais, com a vantagem que não sofrem interferência de lipídeos presentes no extrato.

2. É possível cultivar cotilédones imaturos de soja em meio de cultura definido, atingindo níveis de síntese de proteína semelhantes aos obtidos "in situ".

3. Os cotilédones que pertencem ao mesmo embrião apresentam uma menor variação durante o desenvolvimento em cultura e portanto são mais indicados para estudos comparativos.

4. Nas condições experimentais onde as fontes de N foram ministradas exogenamente os principais compostos nitrogenados utilizados na nutrição de frutos de soja, foram a glutamina e a asparagina. Estas se constituem nas fontes de nitrogênio para a síntese de proteína em cotilédones em cultura, enquanto que os ureídeos foram menos eficientes.

5. O uso da metionina sulfoximina, inibidor específico de glutamina sintetase, mostrou que a utilização de asparagina e ureídeos envolve a amônia como intermediário.

VI. RESUMO

O trabalho com cotilédones imaturos de soja em meio de cultura definido tem como objetivo, levar à melhor compreensão do metabolismo do nitrogênio, com respeito a síntese e armazenamento de proteínas nas sementes. Para este estudo, testou-se diferentes fontes de nitrogênio, tais como, a glutamina, asparagina, glutamato, aspartato, mistura de aminoácidos (caseína hidrolizada), alantoína, ácido alantóico e NO_3^- , que são encontrados no soluto transportado para a semente em desenvolvimento e outros compostos, como amônia e uréia que são produtos intermediários do metabolismo de alguns compostos.

Antes de comparar o efeito das diferentes fontes de nitrogênio sobre a síntese de proteína, foi necessário o conhecimento da dinâmica do sistema de cultura, em termos de tamanho ideal de cotilédones e tempo de incubação. Foi verificada também, a validade das comparações entre cotilédones. A fonte de nitrogênio utilizada como padrão foi a glutamina.

Foi verificado que o tamanho ideal de cotilédones imaturos de soja fica entre 30 e 80 mg, uma vez que nesta faixa de peso fresco inicial não mostram dependência do tamanho inicial para o aumento em peso seco e proteína. Além disso, estão na fase inicial do crescimento, como mostram as medidas em peso seco e proteína durante a ontogênese das sementes; então, torna-se possível acompanhar o desenvolvimento dos cotilédones, quando cultivados em meio de cultura.

Quanto ao período de incubação, o que se mostrou mais adequado para o estudo com diferentes fontes de nitrogênio, foi entre 6 e 8 dias, atingindo níveis semelhantes

aos verificados "in situ".

O estudo estatístico (teste de médias) dos dados da cultura de cotilédones pareados e ao acaso mostrou que, a escolha de cotilédones que pertencem ao mesmo embrião é mais adequado para estudos comparativos.

A melhor fonte de nitrogênio para a síntese de proteínas para cotilédones imaturos de soja foi a glutamina, seguida de asparagina. Embora em termos de quantidades transportadas, os ureídeos tenham um papel importante, não apresentaram a eficiência esperada.

As fontes inorgânicas na forma de NO_3^- ou NH_4^+ , produziram quantidades semelhantes ao controle (meio de cultura sem nitrogênio).

O estudo com inibidor específico, MSO, mostrou que a síntese de proteína foi inibida quando a fonte de nitrogênio foi a asparagina, alantoina ou ácido alantóico e não a glutamina. Estes resultados sugerem que, para o aproveitamento destes compostos nitrogenados, ocorre a liberação de NH_4^+ e este é reassimilado via GS, já que o inibidor é específico de GS.

VII. SUMMARY

This study with immature soybean cotyledons cultured in a defined medium objectivates a better understanding of nitrogen metabolism in relation to the synthesis of storage protein. For this purpose several sources of nitrogen were tested, such as glutamine, asparagine, glutamine, aspartate, amino acid mixture (hydrolysed casein), allantoin, allantoic acid and nitrate, all of which are found in the transport stream supplying the developing seeds, as well as other compounds such as ammonia and urea ~~metabolic~~ metabolic intermediates of these compounds.

Before making a comparison of these sources of nitrogen, it was necessary determine the limitations of the experimental system, such as cotyledon size and period of incubation, as well as the variation in response between cotyledons. Glutamine was used as a standart source for comparative purposes.

The most adequate size of immature soybean cotyledons was found to be between 30 and 80 mg, since in this range of fresh weight the increase in dry weight and protein was independent of size. Besides, such cotyledons are at an initial stage of development, as the date for dry weight and protein during development of the seeds show. Thus it is possible to follow the development of cotyledons by these parameters growing them in the culture medium.

As to the period of incubation, the most adequate for the purpose of different nitrogen sources was 6 to 8 days, during which time the rate of synthesis was similar to that "in situ".

A statistical analysis (teste of means) of data

for cotyledons taken in pairs and at random revealed that cotyledons that belong to the same embryo show less variation and therefore are more suitable for comparative studies.

The most effective source of nitrogen for the synthesis of protein in immature soybean cotyledons was glutamine, followed by asparagine. On the other hand, the ureides were little effective in spite of their importance as transport compounds in soybean.

Inorganic sources in the form of NO_3^- or NH_4^+ lead to the formation of protein in quantities similar to the control without nitrogen.

A study with the inhibitor MSO, revealed a strong inhibition with asparagine, allantoin and allantoic acid, but not glutamine. These data suggest that, during the utilization of these compounds ammonia is liberated and reassimilated in glutamine via GS, since this enzyme is inhibited by methionine sulfoximine (MSO).

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ARRUDA, P. e SILVA, W.J. da. 1979. Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncle. *Phytochem.* 18: 409-410.
- ATKINS, C.A., PATE, J.S. e SHARKEY, P.J. 1975. Asparagine metabolism-key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. *Plant Physiol.* 56: 807-812.
- ATKINS, C.A., PATE, J.S. e LAZZELL, D.B. 1979. Assimilation and transport of nitrogen in non-nodulated (NO_3^- grown) *Lupinus albus* L. *Plant Physiol.* 64: 1072 - 1082.
- ATKINS, C.A., PATE, J.S., GRIFFITHS, G.J. e WHITE, S.T. 1980. Economy of carbon and nitrogen in nodulated and non-nodulated (NO_3^- grown) Cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp). *Plant Physiol.* 66: 978 - 983.
- BEEVERS, L. 1976. Nitrogen metabolism in plants. Edward Arnold, London. pp.118 - 121.
- BEEVERS, L. e HAGEMAN, R.H. 1969. Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. 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 developing and maturation. *Plant Physiol.* 49: 476 - 481.
- BEEVERS, L. e STOREY, R. 1976. Glutamate synthetase in developing cotyledons of *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 57: 862 - 866.
- BILINSKI, E. McCONNEL, W.B. 1957. The utilization of acetate for amino acid biosynthesis. *Can. J. Biochem. Physiol.* 35: 357 - 364.
- BOND, D.A. 1970. The development of field beans as a crop in Britain. *Proc. Nutr. Soc.* 29: 74 - 79.

- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248 - 251.
- DOUGAL, D.K. 1974. Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58: 639 - 646.
- ENGELBRECHT, L. 1955. *Flora.* 142: 25 - 44.
- EVANS, A.M. e GRIDLEY, H. E. 1979. Prospects for the improvement of protein and yield in food legumes. *Current Advances in Plant Science.* 11(1): 1 - 17.
- FINLAYSON, A.J. e McCONNEL, W.B. 1969. The utilization of ^{15}N and phenylalanine-2- ^{14}C by wheat plants. *Can.J. Biochem.* 47: 415 - 418.
- FOWDEN, L. 1954. The nitrogen metabolism of ground nut plants: the role of δ -methyleneglutamine and δ -methylene-glutamic acid. *Ann. Bot.* 18: 417 - 440.
- FOWLER, M.W. , JESSUP, W. e SARKISSIAN, G.S. 1974. Glutamate synthase type activity in higher plants. *FEBS Lett.* 46 :340 - 342.
- FUJIHARA, S., YAMAMOTO, K. e YAMAGUCHI, M. 1977. A possible role of allantoin and influence of nodulation on its production in soybean plants. *Plant Soil.* 48: 233 - 242.
- GOMES, M.A.F. e SODEK, L. 1982. Allantoinase e asparaginase activities in maturing fruits of nodulated and non - nodulated soybeans. *Plant Physiol.* 69 Suppl. Abstr. 608.
- GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.S. e DAVID, M.M. 1949. Determination of protein by the biuret method. *J. Biol. Chem.* 177: 751.
- HALL, S.M. e BAKER, D.A. 1972. The chemical composition of Ricinus phloem exudate. *Planta.* 106: 131 - 140.

- HALLIDAY, J., PATE, J.S. 1976. Symbiotic nitrogen fixation by coralloid roots of the cycad, *Macrozamia riedlei*: Physiological characteristics and ecological significance. *Aust. J. Plant Physiol.* 3: 349 - 358.
- HARTWIG, E.E. 1969. Breeding soybeans for high protein and quality. *In: New Approaches to Breeding for Improved Plant Protein.* IAEA, Vienna. pp. 67 - 70.
- HAWTIN, G.C., RACHIE, K.O. e GREEN, J.M. 1977. Breeding strategy for the nutritional improvement of pulses. *In: J.H. HULSE, K.O. RACHIE e L. W. BILLINGSLEY (eds). Nutritional evaluation for food legume breeders.* IDRC, Ottawa. pp. 48 - 51.
- HERRIDGE, D.F., ATKINS, C.A., PATE, J.S. e RAINBIRD, R. M. 1978. Allantoin and allantoic acid in the N economy of the cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) *Plant Physiol.* 62: 495 - 498.
- HILL, J.E. e BREIDENBACH, R.W. 1974 a. Proteins of soybean seeds. I. Isolation and characterization of the major components. *Plant Physiol.* 53: 742 - 746.
- HILL, J.E. e BREINDENBACH, R.W. 1974 b. Proteins of soybean seeds. II. Accumulation of the major protein components during seed development and maturation. *Plant Physiol.* 53: 747 - 751.
- ISRAEL, D.W. e McCLURE, P.R. 1980. *In: Proceedings of the World Soybean Research Conference II* (Corbin F.T., ed.) p. 111 Westview Press, Granada.
- KAUL, A.K. 1971. Research in combining nutritive quality with high yield. *In: Recent Research in the Improvement of Protein and Nutritive Properties of Food Plants* IARI. Research Service. 6: 7 - 32.
- KAUL, A.K. 1973. Mutation Breeding and Crop Protein Improvement. *In: Improve Plant Protein by Nuclear Techniques.* IAEA Symposium, Vienna. pp. 1 - 16.

- LAWRENCE, J.M. e GRANT, D.R. 1964. Incorporation of lysine-¹⁴C into the developing grain of wheat, *Arch. Biochem. Biophys.* 104: 73 - 78.
- LEA, P.J. e FOWDEN, L. 1975. Asparagine metabolism in higher plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 168: 3 - 14.
- LEA, P.J., FOWDEN, L. e MIFLIN, B.J. 1978. The purification and properties of asparaginase from *Lupinus* species *Phytochemistry.* 17: 212 - 222.
- LEA, P.J., MIFLIN, B.J. 1974. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature.* 251: 614 - 616.
- LEA, P.J. e MIFLIN, B.J. 1980. Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. *In: The biochemistry of plants.* Vol. 5 cap. 16.pp.569-607. Academic Press, Inc. NY.
- LEA, P.J., HUGHES, J.S. e MIFLIN, B.J. 1979 B. Glutamine and asparagine dependent protein synthesis in maturing legume cotyledons cultured "in vitro". *J. of. Exp.Bot.* 30 (116): 529 - 537.
- LEA, P.J., MILLS, R. e MIFLIN, B.J. 1979 a. The isolation of a lysine-sensitive aspartate kinase from pea leaves and its involvement in homoserine biosynthesis in isolated chloroplasts. *FEBBS Lett.* 98 (1): 165- 168.
- LEES, E.M. e BLAKENEY, A.B. 1970. The distribution of asparaginase activity in plants. *Biochem. Biophys. Acta.* 215: 145 - 151.
- LEWIS, O.A.M. 1975. An ¹⁵N - ¹⁴C study of the role of the leaf in the nitrogen nutrition of the seed of *Datura stramonium* L. *J. of Exp. Bot.* 26(92): 361 - 366.
- LEWIS, O.A.M. e PATE, J.S. 1973. The significance of transpirationally derived nitrogen in protein synthesis in fruiting plants of pea (*Pisum sativum* L.) *J. of Exp. Bot.* 24(80): 596 - 606.

- LINSMAIER, E.M. e SKOOG, F. 1965. Organic growth Factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Pl.* 18: 100 - 127.
- LLOYD, N.D.H. e JOY, K.W. 1978. 2-hidroxisuccinamic acid: a product of asparagine metabolism in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81: 186 - 192.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. e RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265 - 275.
- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M. e YAMAMOTO, Y. 1977a. Distribution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulating and non-nodulating soybean plants. *Plant e Cell Physiol.* 18: 353 - 359.
- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M. e YAMAMOTO, Y. 1977b. Incorporation of ^{15}N into allantoin in nodulated soybean plants supplied with $^{15}\text{N}_2$. *Plant e Cell Physiol.* 18: 459 - 462.
- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M. e YAMAMOTO, Y. 1977c. Effects of exogenous nitrogen compounds on the concentrations of allantoin and various constituents in several organs of soybean plants. *Plant e Cell Physiol.* 18: 613 - 624.
- MEISTER, A., SOBER, H.A., TICE, S.V. e FRASER, P. E. 1952. Transamination and associated deamination of asparagine and glutamine. *J. Biol. Chem.* 197: 319 - 330.
- MIFLIN, B.J. e LEA, P.J. 1975. Glutamine and asparagine as nitrogen donors for reductant-dependent glutamate synthesis in pea roots. *Biochem. J.* 149: 403 - 409.
- MIFLIN, B.J. e LEA, P.J. 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry.* 15: 873 - 885.
- MIFLIN, B.J. e LEA, P.J. 1977. Amino acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 299 - 329.
- MILLERD, A. 1975. Biochemistry of legume seed proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 53 - 72.

- MILLERD, A. e SPENCER, D. 1974. Changes in RNA synthesizing activity and template activity in nuclei from cotyledons of developing pea seeds. *Aust. J. Plant Physiol.* 1: 331-341.
- MORI, T.E.S. 1981. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia, UNICAMP. Campinas, SP.
- MURPHY, J.J. e DALBY, A. 1971. Changes in the protein fractions of developing normal and opaque-2 maize endosperm. *Cereal Chem.* 48: 336 - 349.
- PATE, J.S. 1971. Movement of nitrogenous solutes in plants. In: nitrogen-15 in soil plant studies. Int. At. Energy Agency, Vienna, IAEA - Pl - 341/13: 165 - 187-
- PATE, J.S. 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 313 - 340.
- PATE, J.S., LAYZELL, D.B. e McNEIL, D.L. 1979a. Modeling the transport and utilization of C and N in a nodulated legume. *Plant Physiol.* 63: 730 - 738.
- PATE, J.S., LAYZELL, D.B. e ATKINS, C.A. 1979b. Economy of C and N in a nodulated and a non-nodulated (NO_3^- grown) legume. *Plant Physiol.* 64: 1083 - 1088.
- PATE, J.S., SHARKEY, P.J. e LEWIS, O.A.M. 1974. Phloem bleeding from legume fruits a technique for study of fruit nutrition. *Planta.* 120: 229 - 243.
- PATE, J.S., SHARKEY, P.J. e LEWIS, O.A.M. 1975. Xilem to phloem transfer of salutes in fruiting shoots of legumes, studies by a phloem bleeding technique. *Planta.* 122: 11-26.
- PATE, J.S., SHARKEY, P.J. e ATKINS, C.A. 1977. Nutrition of a developing legume fruit - functional economy in terms of carbon, nitrogen, water. *Plant Physiol.* 59: 506 - 510.
- PATE, J.S. e WALLACE, W. 1964. Movement of assimilated nitrogen from the root system to the field pea (*Pisum arvense* L.) *Ann. Bot.* 28: 83 - 99.

- SCOTT, D.B. 1978. Recent developments in the legume *Rhizobium* symbiosis. *Ciência e Cultura*. 30(2): 185 - 194.
- SHLESIER, G. 1977. Occurrence and function of nitrate reductase in pods of legumes. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. 171: 511 - 523.
- SODEK, L. 1976. Biosynthesis of lysine and other amino acid in developing maize endosperm. *Phytochemistry*. 15: 1903-1906.
- SODEK, L. e SILVA, W.J. 1977. Glutamate synthase: A possible role in nitrogen metabolism of the developing maize endosperm. *Plant Physiol*. 60: 602 - 605.
- SODEK, L. e WILSON, C.M. 1970. Incorporation of leucine $-^{14}\text{C}$ and lysine $-^{14}\text{C}$ into protein in the developing endosperm of normal and opaque-2 corn. *Arch. Biochem. Biophys*. 140: 29 - 38.
- 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. 1977. Proteolytic activity in relationship to senescence and cotyledonary development in *Pisum sativum* L. *Planta*. 137: 37 - 44.
- STREETER, J.G. 1977. Asparaginase and asparagine transaminase in soybean leaves and root nodules. *Plant Physiol*. 60: 235 - 239.
- STREETER, J. 1979. Allantoin and allantoic acid in tissues and stem exudate from field-grown soybean plants. *Plant Physiol*. 63: 478 - 480.
- SUN, S.M., MUTSCHLER, M.A., BLISS, F.A. e HALL, T.C. 1978. Protein synthesis and accumulation in bean cotyledons during growth. *Plant Physiol*. 61: 918 - 923.

- TAJIMA, S., YATAZAWA, M. e YAMAMOTO, Y. 1977. Allantoin production and its utilization in related to nodule formation in soybean-enzymatic studies. *Soil Science and Plant Nutrition*. 23: 225 - 235.
- THOMAS, R.J., FELLER, U. e ERISMANN, K.H. 1979. The effect of different inorganic nitrogen sources and plant age on the composition of bleeding sap of *Phaseolus vulgaris*. *The New Phytologist* 82 (3): 657 - 669.
- THOMAS, R.J. e SCHRADER, L.E. 1981. Ureid metabolism in higher plants. *Phytochemistry*. 20: 361 - 371.
- THOMAS, R.J., FELLER, U. e ERISMANN, K.H. 1980. Ureide metabolism in non-nodulated *Phaseolus vulgaris* L.J. of *Exp. Bot.* 31(121): 409 - 417.
- THOMPSON, J.F., MADISON, J.T, e MUENSTER, A.M.E. 1977. *In vitro* culture of immature cotyledons of soya bean (*Glycine max* L. Merr.). *Ann. Bot.* 41: 29 - 39.
- TRIJELS, F. e VOGELS, G.D. 1966. Degradation of allantoin by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochem. Biophys. Acta* . 113: 292 - 301.
- TROMP, J. e OVAA, J.C. 1973. Spring mobilization of protein nitrogen in apple bark. *Physiologia Pl.* 29: 01 - 05.
- VALENTINE, R.C. e WOLFW, R.S. 1961. In: Ureide metabolism in higher plants, por R.J. THOMAS e L.E. SCHRADER. 1981. *Phytochem.* 20: 361 - 371.
- VALENTINE, R.C., BOJANOWSKI, R. e WOLFE, R.S. 1962. In: Ureide metabolism in higher plants, por R.J. THOMAS e L.E. SCHRADER. 1981. *Phytochem.* 20: 361 - 371.
- VAN DIE, J. e TAMMES, P.M.L. 1975. Phloem exudation from monocotyledons axes. In: *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 - N.Y. Springer.

- VOGELS, G.D. 1963. Ph. D. Thesis. Institute of Technology Delft.
- VOGELS, G.D. e VAN DER DRIFT, C. 1969. In: Ureide metabolism in higher plants, por R.J. THOMAS e L.E. SCHRADER. 1981. *Phytochem.* 20: 361 - 371.
- VOGELS, G.D. e VAN DER DRIFT, C. 1970. Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.* 33: 143 - 157.
- VOGELS, G.D., WINDT, F.E. de e BASSIE, W. 1969. In: Ureide metabolism in higher plants, por R.J. THOMAS e L.E.SCHRADER. 1981. *Phytochem.* 20: 361 - 371.
- WILSON, D.G., KING, K.W. e BURRIS, R.H. 1954. Transamination reactions in plants. *J. Biol. Chem.* 208: 863 - 874.
- WOOLFE, J.A. e HAMBLIN, J. 1974. Within and between genotypes variation in crude protein content of *Phaseolus vulgaris* L. *Euphytica.* 23: 28 - 30.