

JOÃO PAULO FEIJÃO TEIXEIRA

Este exemplar corresponde a redação final da tese
defendida pelo João Paulo Feijão Teixeira e aprovada
pela Comissão Julgadora

Campinas, 3 de julho de 1984



TRANSLOCAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS DA PLANTA PARA OS
FRUTOS EM DESENVOLVIMENTO E ACÚMULO DE SUBSTÂNCIAS DE
RESERVA EM GRÃOS DE SOJA *Glycine max* (L.) MERRILL CV
SANTA ROSA.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a Obtenção de
Título de Mestre em Ciências Bio-
lógicas na Área de Biologia
Vegetal.

Orientador: LADASLAV SODEK

CAMPINAS

1984

A

meus pais

João e Renée

Ofereço

À minha esposa

Maria Helena

e filhas

Christiane, Fabiana e Juliana

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ladaslav Sodek do Departamento de Fisiologia Vegetal, UNICAMP, pela sua orientação durante o desenvolvimento deste estudo.

Aos pesquisadores e funcionários da Seção de Fitoquímica do Instituto Agronômico, em especial a Maria Tereza Baraldi Ramos e Míriam A. Bonatto Pissolatto pelo auxílio prestado durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Hipólito A.A. Mascarenhas da Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico pelo incentivo e facilidades proporcionadas na obtenção de material vegetal.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Desenvolvimento e composição dos grãos de soja	3
1.3 Influência do ambiente ou de eventos fisiológicos sobre a composição de grãos de soja	14
1.4 Proteínas de reserva em grãos de soja	18
1.4.1 Tipos e acúmulo durante desenvolvimento dos grãos	19
1.4.2 Extração e fracionamento das proteínas	25
1.5 Fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico	30
1.6 Compostos transportadores de nitrogênio em plantas	40
1.6.1 Ureídeos	44
1.6.2 Aminoácidos	60
2. OBJETIVOS	69
3. MATERIAL E MÉTODOS	71
3.1 Material e experimentação de campo	71
3.1.1 Descrição do material	71
3.1.2 Cultivo do material	72
3.2 Técnica de amostragem	75
3.2.1 Escolha da posição dos frutos na planta para amostragem	75
3.2.2 Coleta de amostras	77
3.3 Preparo das amostras para análises	77
3.3.1 Preparo das amostras	77
3.3.2 Preparo de extratos para análise ..	78
3.3.2.1 Extração de ureídeos e aminoácidos livres	78

	Página
3.4 Análises químicas	78
3.4.1 Matéria seca	78
3.4.2 Óleo e ácidos graxos	79
3.4.3 Carboidratos	79
3.4.4 Nitrogênio total	80
3.4.5 Fracionamento de proteínas	80
3.4.6 Ureídeos	81
3.4.6.1 Ureídeos totais	81
3.4.6.2 Ácido alantóico	85
3.4.6.3 Alantoína	85
3.4.7 Análise de aminoácidos	85
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4.1 Acúmulo de matéria seca, óleo, ácidos graxos, proteínas e carboidratos durante o desenvolvimento de frutos de soja	87
4.2 Acúmulo de nitrogênio total em vagens e grãos	105
4.3 Frações proteicas nos cotilédones de grãos de soja	112
4.4 Composição da fração nitrogênio solúvel em pedúnculo, vagens e grãos	119
4.4.1 Aminoácidos	121
4.4.2 Ureídeos	125
4.4.3 Balanço de distribuição de compostos aminados em frutos de soja.....	132
5. DISCUSSÃO GERAL	136
6. CONCLUSÕES	140
7. RESUMO	142
8. SUMMARY	144
9. ABREVIATURA	146
10. BIBLIOGRAFIA	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Diagrama ilustrativo das interrelações de reações envolvidas no processo de fixação de nitrogênio em nódulo de leguminosas	35
2 Reações envolvidas na fixação de nitrogênio em nódulos de soja	36
3 Representação esquemática da assimilação simbiótica de nitrogênio em nódulos	41
4 Metabolismo em nódulos de plantas que transportam predominantemente amidas e ureídeos	43
5 Degradação de bases purinas a outros produtos nitrogenados	50
6 Via metabólica para assimilação de ácido alantóico demonstrada em microorganismos	59
7 Sequências metabólicas para síntese de aminoácidos em plantas	62
8 Temperatura média e precipitação pluviométrica, diárias, durante o período de desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa, ano agrícola 1978/79	73
9 Temperatura média e precipitação pluviométrica diárias, durante o período de desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa, ano agrícola 1979/80	74

10	Marcha esquemática para extração de proteínas em grãos de soja	82
11	Reações envolvidas na determinação de ureídeos, conforme YOUNG & CONWAY (1942)	84
12	Quantidade de matéria fresca por órgão, fruto vagem e grão durante o desenvolvimento dos frutos de soja cv Santa Rosa nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80	90
13	Quantidade de água em frutos, vagens e grãos de soja cv Santa Rosa durante o período de desenvolvimento dos frutos nos anos agrícolas 1978/79 e 1979/80	93
14	Quantidade de matéria seca por órgão, fruto , vagens e grão, durante o desenvolvimento dos frutos de soja cv Santa Rosa, nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80	96
15	Variação na composição química e acúmulo de proteína (%N.6,25) por grão durante o desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80	100
16	Quantidade de açúcares solúveis e polissacarídeos acumulada por grão durante o desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80	103
17	Quantidade de óleo acumulado por grão e variação na composição do óleo durante o desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80	106

Figuras

Página

18	Fluxos de nitrogênio da planta para a vagem e grãos e da vagem para os grãos durante o desenvolvimento de frutos de soja	111
19	Variação na quantidade de nitrogênio total e nitrogênio de ureídeos na fração nitrogênio solúvel de pedúnculos, vagens e grãos durante o desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa	122
20	Variação na composição em aminoácidos e amônia da fração nitrogênio solúvel em pedúnculos (A) e grãos (B) durante o desenvolvimento dos frutos	127
21	Fluxos de nitrogênio da planta para o fruto e grão e da vagem para o grão durante o desenvolvimento de frutos de soja, indicando a possível contribuição de cada composto envolvido no transporte de nitrogênio	133

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela	Página
1 Variação dos teores de proteína, óleo, açúcares solúveis e polissacarídeos em grãos de soja cv Santa Rosa em função da posição dos frutos na planta	76
2 Quantidade de matéria fresca por órgão, fruto, vagem e grão, durante o desenvolvimento dos frutos de soja cv Santa Rosa, nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80	89
3 Teor de água em frutos, vagens e grãos de soja cv Santa Rosa, durante o período de desenvolvimento dos frutos nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80	91
4 Quantidade de água por órgão, vagem, fruto e grão, durante o desenvolvimento dos frutos de soja cv Santa Rosa nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80	92
5 Teor de matéria seca em frutos, vagens e grãos de soja cv Santa Rosa, durante o período de desenvolvimento dos frutos nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80	94
6 Quantidade em matéria seca por órgão, fruto, vagem e grão, durante o desenvolvimento dos frutos de soja cv Santa Rosa nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80	95
7 Variação da composição química durante o desenvolvimento de grãos de soja cv Santa Rosa nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80	99

Tabela

Página

8	Quantidade de proteína, óleo, açúcares solúveis e polissacarídeos por grão de soja cv Santa Rosa durante o desenvolvimento dos frutos, nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80	102
9	Variação na composição do óleo durante o desenvolvimento de grãos de soja cv Santa Rosa, nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80	105
10	Quantidade de nitrogênio total acumulada em grãos e nitrogênio solúvel ($\mu\text{g}/\text{órgão}$) em vagens e grãos durante o período de desenvolvimento dos frutos, ano agrícola 1978/79	109
11	Quantidade de nitrogênio total na matéria seca e por órgão, fruto, vagem e grãos de um fruto, durante o desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa, ano agrícola 1979/80	110
12	Quantidade de nitrogênio por fração proteica e resíduo na matéria fresca e seca de grãos durante o desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa, 1978/79	114
13	Quantidade de nitrogênio nas frações proteicas por órgão ($\text{mg N}/\text{fração proteica.grão}$) de soja cv Santa Rosa, ano agrícola 1978/79	116
14	Composição em aminoácidos de grãos maduros de soja cv Santa Rosa	117
15	Quantidade de nitrogênio total solúvel ($\mu\text{g}/\text{órgão}$) em pedúnculo, vagens e grãos durante o período de desenvolvimento dos frutos, ano agrícola de 1978/79	120

Tabela

Página

16	Composição em aminoácidos livres e amônia(mol %) da fração nitrogênio solúvel de pedúnculos duran <u>te</u> o desenvolvimento de frutos de soja	123
17	Composição em aminoácidos livres e amônia(mol %) da fração nitrogênio solúvel de grãos durante o desenvolvimento de frutos de soja	.127.
18	Quantidade de ureídeos e N-ureídeos em pedúncu- los, vagem e grão durante o desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa, ano agrícola de 1978/79	128
19	Quantidade dos ureídeos ácido alantóico e alan- toína em pedúnculo, vagem e grão durante o desen <u>volvimento</u> de frutos de soja cv Santa Rosa, ano agrícola de 1978/79	130

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A produção de alimentos preocupa seriamente as autoridades em todo o mundo, principalmente porque segundo cálculos da ONU a população atual da Terra praticamente dobrará até o final do século (SAOUMA, 1981). Esse problema será particularmente grave quanto ao suprimento de alimentos proteicos. A soja que tantos benefícios tem trazido à humanidade, inclusive nas fases críticas dos conflitos mundiais, é apontada, com ênfase, como um dos grãos capazes de ajudar a solucionar esse importante problema. O Brasil, pela sua extensão territorial e área agriculturável com amplas possibilidades para a cultura da soja, muito poderá contribuir para minorar tal situação.

Botanicamente, a soja pertence à família *Leguminosae*, sub-família *Papilionoideae* e ao gênero *Glycine* L. que compreende cerca de 15 espécies, sendo classificada como *Glycine max* (L.) Merrill.

A origem dessa planta perdeu-se no tempo, sendo mencionada na obra de Pen Ts'ao Kang Mu, escrita no ano de 2838 AC, durante o Império de Sheng-Nung (MORSE, 1950). Seu cultivo expandiu-se pela China antiga e começou a ser cultivada em outras regiões da Ásia, como a Índia, Ceilão, Malásia, etc. (NAGATA, 1972). Em 1739 ocorreu o plantio de soja no Jardim Botânico de Paris e em 1770 na Inglaterra, em Kew (MIYASAKA, 1977). Nos Estados Unidos a primeira referência sobre o comportamento da soja foi feita em 1804, com o plantio na região da Pensilvania (ROSOLEM, 1980). No Canadá, Filipinas, Argentina, Egito e Cuba, ela tornou-se conhecida no final do século XIX. No Brasil, a mais antiga referência encontrada na literatura nacional é de experiência feita em 1882, no Estado da Bahia, por Gustavo D'Utra, enquanto em São Paulo, Daffert em 1892 fez as primeiras observações na Estação Agronômica - atual Instituto Agrônomo - em Campinas, no Rio Grande do Sul a introdução dessa leguminosa foi feita pelo Professor Craig da Escola Superior de Agricultura e Veterinária, Universidade Técnica, em 1914 (REIS, 1956).

O aumento significativo da produção mundial verificou-se a partir de 1925, graças a esforços de técnicos norte-americanos que estudaram esse vegetal sob todos os ângulos. No Brasil, o grande impulso dessa cultura se deu a partir de 1970, atingindo atualmente a produção anual maior que dez milhões de toneladas de grãos.

1.2 DESENVOLVIMENTO E COMPOSIÇÃO DE GRÃOS DE SOJA

O metabolismo durante o desenvolvimento de sementes de soja provavelmente determina, em grande parte, a qualidade em relação à composição química, e em menor extensão a quantidade de sementes produzidas (OGREN & RINNE, 1973).

As alterações citológicas e bioquímicas durante o desenvolvimento de cotilédones de soja a partir de 15 dias após o florescimento até a maturidade foram detalhadamente estudadas por BILS & HOWELL (1963). Aos 15 dias após o florescimento (DAF) somente partículas de ribonúcleo-proteínas e núcleos foram observados nos cotilédones. Aos 18 DAF, as células dos cotilédones apareceram formando plastídeos, mitocôndria e outras estruturas membranosas. Muitas mitocôndrias, cloroplastos imaturos e grãos de amido estavam presentes aos 26 DAF e as células eram caracterizadas por taxa relativamente alta de respiração. Nesse período, grânulos de lipídeos de 0,2 a 0,3 μ de diâmetro e glóbulos de proteínas de 4 a 5 μ de diâmetro estavam presentes no citoplasma. Nesses estágios iniciais de desenvolvimento 50% da proteína pode ser sedimentada com força de 50.000g. Com o desenvolvimento dos cotilédones, estruturas de lipídeos e proteína continuaram a crescer em tamanho, enquanto mitocôndrias e cloroplastos decresceram em número. Em torno de 54 DAF, o peso fresco atingiu o máximo, as células dos cotilédones eram preenchidas com grãos de amido, grânulos de lipídeos e glóbulos de proteína. À medida que as sementes de soja amadurecem, os grãos de amido desaparecem e não são evidentes em sementes totalmente maduras. Na maturi-

dade também, de 80 a 90% da proteína é solubilizada após centrifugação por 2 horas a 50.000g.

BILS & HOWELL (1963), também, revelaram que durante os primeiros 22 DAF de desenvolvimento dos cotilédones a proteína sintetizada foi "proteína metabólica" e após 22 DAF a síntese desse tipo de proteína torna-se mais lenta e decresce, enquanto a de proteína de reserva inicia e continua até a maturação dos grãos.

Para que esses eventos encontrados por BILS & HOWELL (1963) realizem-se, deve haver crescimento e nutrição dos frutos de maneira a suprir as suas necessidades conforme relatado por CROOKSTON *et al* (1974), PATE *et al* (1974), QUEBEDEAUX & CHOLLET (1975), ATKINS *et al* (1975) e PATE *et al* (1977).

Dentre esses trabalhos destaca-se o de PATE *et al* (1977) que avalia a nutrição de fruto de *Lupinus albus* durante o desenvolvimento em relação à economia funcional de carbono, nitrogênio e água. A nutrição do fruto em desenvolvimento de leguminosas, assim como de muitos outros frutos, consiste das seguintes atividades principais: entrada de translocado através de floema, recebimento de água e solutos conduzidos pelo xilema como resultado da transpiração, e fixação pelo fruto de CO₂ proveniente da atmosfera ou do espaço gasoso da respiração das sementes. Em *Lupinus albus* mostrou-se que o crescimento do fruto se dá em três fases:

a) 1a. fase - 0 a 4 semanas, quando ocorre a expansão da vagem, primeiramente através da entrada de água. A entrada de carbono e nitrogênio é baixa nesse estágio e o

crescimento da semente é mínimo;

b) 2a. fase - 4 a 8 semanas, quando verifica-se alta taxa de utilização de carbono e nitrogênio pelo fruto e crescimento rápido das sementes;

c) 3a. fase - 8 a 12 semanas, que coincide com a deposição de compostos de reserva nas sementes. Entrada de carbono e nitrogênio é mantida a alto nível até que a vagem e sementes comecem a desidratar. As sementes apresentam 96% do nitrogênio do fruto e estima-se que a mobilização de nitrogênio dos tecidos da vagem durante as últimas 4 semanas do desenvolvimento do fruto supra 16% das necessidades em nitrogênio das sementes.

Conforme relatado por OGREN & RINNE (1973), durante o desenvolvimento dos frutos de soja, a maioria dos assimilados vão da folha para a vagem de sua axila. Se as vagens são removidas, o assimilado irá predominantemente para baixo e para a vagem mais próxima, e pouco assimilado vai para regiões mais altas. WARDLAW (1968), mostrou que o fruto da axila de uma folha é sustentado também pelas folhas imediatamente acima ou abaixo. JOHNSTON & PENDLETON (1968) e HICKS & PENDLETON (1969) encontraram, entretanto, que algumas vagens no terço superior das plantas de soja desenvolviam mesmo removendo-se as folhas desses nós.

O padrão de distribuição de assimilados é determinado pela fotossíntese de um lado e pela força e proximidade dos vários "sinks" de outro, modificado de alguma forma pelos padrões de conexões vasculares e condições ambientais (EVANS, 1975). Esse autor considera que embora sejam encontradas di-

ferenças na taxa de acúmulo de compostos em frutos, a produção final está relacionada à duração do período de enchimento dos grãos. Para soja, HANWAY & WEBER (1971) encontraram para muitos cultivares a mesma taxa de enchimento de grãos ou seja $9,9 \text{ g.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$, embora a taxa de crescimento da cultura neste período variasse de 8,8 a $14,9 \text{ g.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ nos diferentes cultivares.

A competição entre frutos devido à posição de inserção na planta durante o desenvolvimento para receber fotosíntatos, nitrogênio, minerais e água, tem sido relatada. COLLINS & CARTTER (1956), estudando os teores de óleo e proteína em função da posição das vagens na planta, posição das vagens nos ramos e dos grãos nas vagens, constataram variação na composição química principalmente devido à posição de inserção das vagens na planta, o que também foi verificado por BRIM *et al* (1967). As sementes de soja produzidas no topo e centro das plantas eram menores em tamanho com menor teor de proteína do que sementes produzidas na região inferior da planta (COLLINS & CARTTER, 1956). Em nosso meio, TEIXEIRA *et al* (1982) estudando vários cultivares de soja mostraram que a composição química dos grãos varia com cultivares e posição das vagens na planta. Os grãos oriundos da base das plantas apresentavam tamanho e teor de proteína menores do que os de outras partes, na maioria dos cultivares. Para alguns cultivares, no ápice se encontravam os grãos mais ricos em óleo, não variando para outros. Para a maioria dos cultivares os grãos da base das plantas foram mais ricos em açúcares solúveis e os do ápice apresentaram os menores teores de polissacarídeos.

carídeos. Esses autores atribuíram as variações encontradas como devidas à influência de temperatura, precipitação pluviométrica, água no solo e radiação solar, sobre a síntese e acúmulo de compostos químicos em grãos de soja, principalmente durante períodos do desenvolvimento dos grãos, aliada à capacidade variável de translocação de fotossintatos, água e compostos nitrogenados em função da idade da planta e competição entre frutos. Esses dados de TEIXEIRA *et al* (1982) assim como os de COLLINS & CARTTER (1956) mostram a necessidade de se considerar as variações relatadas ao se comparar dados sobre a composição de grãos entre amostras ou selecioná-las para análises químicas com a finalidade de melhoramento de plantas.

Estudando o acúmulo de matéria seca e nutrientes em soja cv Santa Rosa, BATAGLIA *et al* (1976) mostraram que durante o período de 90 a 130 dias de plantio as sementes atingiram seu maior desenvolvimento, produzindo 2093 kg/ha de matéria seca ao mesmo tempo que isso acontecia observaram perda de matéria seca pela parte vegetativa não só devido à queda de folhas, mas também à translocação de matéria seca das hastes e folhas para vagens e sementes. Dados semelhantes foram observados por HANWAY & WEBER (1971) e MASCARENHAS (1973).

SILVA *et al* (1981) consideram que o ponto de maturação fisiológica dos grãos de soja é atingido quando as sementes atingem o seu maior peso seco, há porém outros autores que consideram que esse ponto é atingido quando os grãos atingem cor amarela. MARCOS Fº (1980) considera que na avaliação da maturidade fisiológica de sementes de soja o máximo peso seco não é parâmetro suficiente e que se deve, também, consi-

derar a ausência de sementes verdes-amareladas com hilo homogêneo e de plantas com vagens verdes para identificar o momento em que as sementes de soja atingem a máxima qualidade fisiológica.

BILS & HOWELL (1963) mostraram que o peso fresco e seco de sementes de soja aumentam até 50 DAF, após o que o peso fresco decresce rapidamente e o seco ligeiramente.

KROBER & GIBBONS (1962), encontraram que durante o desenvolvimento e crescimento da semente de soja, a porcentagem de proteína total alterou muito pouco. Esse estudo mostrou queda em nitrogênio não proteico de valor de 12% em pequenas sementes a valor de aproximadamente 2% em sementes maduras. Este decréscimo nos valores percentuais de nitrogênio não proteico foi acompanhado pela elevação de proteína líquida de cerca de 28% nas sementes pequenas a 38% nas maduras. Isso também foi observado por RUBEL (1970), porém com a informação adicional de que a variação verificada foi de acordo com a parte da planta onde estavam as vagens, revelando aumento em proteína e decréscimo na porcentagem de óleo de grãos de vagens do topo das plantas. SILVA *et al* (1981) estudando o cultivar Santa Rosa mostraram que o teor de nitrogênio não variou muito durante o enchimento do grão embora tenha crescido de 0,32 a 7,39mg.grão⁻¹ no período de 37 a 65 DAF. Isolando e caracterizando as principais proteínas dos grãos, HILL & BREIDENBACH (1974a) mostraram que são poucas as proteínas em sementes de soja, prevalecendo as com coeficientes de sedimentação de 2,25 , 7,55 e 11,85, sendo que as duas últimas atingem 70% do total de proteínas das semen

tes. Em outro trabalho HILL & BREIDENBACH (1974b) estudando o acúmulo das principais proteínas durante o desenvolvimento de sementes de soja, mostraram que a fração proteica de coeficiente de sedimentação de 2,25 predominou nos estágios iniciais do desenvolvimento dos grãos, decrescendo proporcionalmente através da maturação. As frações 7,55 e 11,85 foram sintetizadas mais tardiamente na maturação e em quantidades bem maiores que a fração 2,25, concordando com o encontrado por OCHIAI-YANAGI *et al* (1978). Estes autores estudando a formação dos componentes de proteína de reserva durante o desenvolvimento de sementes mostram que o maior acúmulo de nitrogênio ocorreu a partir de 40 DAF até a maturidade, embora percentualmente esse composto não sofresse grandes variações em todo o período de desenvolvimento do grão de soja. YAZDISAMADI *et al* (1977) analisando aminoácidos proteicos durante o desenvolvimento de grão de soja mostraram que arginina, serina, ácido glutâmico, glicina, valina, isoleucina e leucina aumentaram no período, enquanto histidina, alanina e metionina decresceram. Segundo OGREN & RINNE (1973) há necessidade de se conhecer a síntese de aminoácidos durante o desenvolvimento de cotilédones para melhor entendimento da síntese proteica em sementes de soja pois pouco se sabe a respeito.

Ao contrário do que ocorre com proteína, muito se tem estudado sobre a biossíntese de óleo em soja. SIMMONS & QUACKENBUSH (1954) observaram que aproximadamente aos 40 DAF, a porcentagem de óleo em sementes alcançou valor de 20% com ácido oleico, linoleico, linolênico e os ácidos graxos saturados alcançando, percentualmente, um valor constante. A 24 DAF,

ácido linolênico tinha valor de 23% que declinou a 6,2% aos 62 DAF. A porcentagem de ácido linoleico a 24 DAF tinha valor de 39,0% e aumentou a 54,9% aos 62 DAF. Ácido oleico decresceu de 20,8 aos 40 DAF a 16,5% a 62 DAF. Os teores percentuais para ácidos graxos saturados eram 12,5% a 24 DAF e 18,1% a 62 DAF. RUBEL (1970), citado por OGREN & RINNE (1973), observou que o teor de óleo e também a composição percentual em ácidos graxos alcançou o máximo valor quando os grãos de soja atingiram um terço da matéria seca acumulada até a maturação. ROEHM & PRIVETT (1970) relataram que as maiores alterações na composição em ácidos graxos dos triglicerídeos ocorreram durante os primeiros 52 DAF. Durante o período de desenvolvimento, ácido palmítico decresceu de 13,9 a 10,6%, ácido esteárico permaneceu constante com teor em torno de 3,8%, ácido oleico aumentou de 11,4 a 25,5%, ácido linoleico aumentou de 37,7 a 52,4% e ácido linolênico decresceu de 34,2 a 7,6%. Embora ocorram alterações no teor dos vários ácidos graxos através do período de desenvolvimento, em quantidade absoluta todos os ácidos graxos aumentaram nas sementes maduras (SIMMONS & QUACKENBUSH, 1954, ROEHM & PRIVETT, 1970, RUBEL *et al*, 1972). Em trabalho recente SILVA *et al* (1981) mostraram que para o cultivar Santa Rosa houve maior acúmulo de matéria graxa durante o período de 51 a 65 DAF, 4,3 a 15,6mg de óleo na matéria seca de um grão. Verificaram, também, a influência de temperatura e precipitação pluviométrica sobre a taxa de acúmulo desse composto nos grãos, à semelhança de TEIXEIRA *et al* (1982). HIRAYAMA & HUIJII (1965) encontraram que o período de maior produção de óleo foi de 20 a 40 DAF em

soja. HOWELL & CARTTER (1953, 1958) verificaram que as variações climáticas exercem maior influência sobre o acúmulo de óleo em determinados períodos do desenvolvimento dos grãos do que em outros. Em nossas condições o mesmo foi verificado por FARACO *et al* (1982) para soja 'Santa Rosa'. Essa influência está relacionada principalmente com a síntese, taxa de acúmulo, de óleo nos grãos desde que o teor verificado na maturação dos grãos não difere para um mesmo cultivar em diferentes anos agrícolas. HOWELL & CARTTER (1958) revelaram que os grãos de soja colhidos no período de 4 a 6 semanas antes da maturação apresentaram alto quociente respiratório - taxa de CO_2 perdido para O_2 assimilado - e alta assimilação de oxigênio, coincidindo com a máxima intensidade de síntese de óleo. Isso pode indicar a conversão de açúcares a compostos que possuem menos átomos de oxigênio por átomo de carbono, ou seja óleos.

O caminho biossintético de ácidos graxos vai de ácido oleico a linoleico (DUTTON & MOUNTS, 1966), enquanto os ácidos graxos palmítico e esteárico através de sistema enzimático de desaturase originam os ácidos graxos insaturados correspondentes (INKPEN & QUACKENBUSH, 1969, RUBEL *et al* 1972 e RINNE, 1969).

Para soja cultivar Santa Rosa, FARACO *et al* (1982) após três anos agrícolas de observação mostraram que durante o desenvolvimento dos grãos a composição de óleo variou, tendo os ácidos graxos palmítico, esteárico, oleico e linolênico diminuído e o ácido linoleico aumentado, mostrando correlação positiva e significativa com o acúmulo de óleo. Esses au

tores mostraram correlação negativa entre o acúmulo de óleo e o teor de ácidos graxos saturados, evidenciando a síntese de ácidos graxos insaturados a partir dos componentes saturados.

Durante o desenvolvimento de grãos de soja grande quantidade de amido é acumulada, alcançando o valor máximo no estágio de grãos verdes. Desse estágio até a maturação completa o amido praticamente desaparece e há aumento correspondente de oligossacarídeos e outros polissacarídeos (BILS & HOWELL, 1963; RACKIS, 1979). Porém, segundo BOONVISUT & WAITAKER (1976) sementes maduras de soja podem conter até 0,5% de amido.

YAZDI-SAMADI *et al* (1977) mostraram que a porcentagem de carboidratos nas sementes de cultivares de soja representam 13-15% da matéria seca das sementes aos 25 DAF. Esse teor decresceu ligeiramente durante o desenvolvimento das sementes e em seguida aumentou atingindo aproximadamente o valor original na maturação. SILVA *et al* (1981) estudando a variação de componentes químicos durante o desenvolvimento de grãos de soja cv Santa Rosa, mostraram que os polissacarídeos acumularam-se nas sementes principalmente no período de 37 a 65 DAF atingindo 19,95 mg/grão e os açúcares totais acumularam de 37 a 72 DAF alcançando 2,16 mg/grão. Os açúcares determinados nesse trabalho de SILVA *et al* (1981) são os carboidratos solúveis existentes nos grãos representados por frutose, glicose, sacarose, rafinose e estaquiose conforme HYMOWITZ *et al* (1972a, 1972b) e YAZDI-SAMADI *et al* (1977). Os polissacarídeos totais são constituídos principalmente de arabinogalactanas e polissacarídeos acídicos de acordo com estu-

dos de ASPINAL *et al* (1967).

Em relação à composição da semente de soja após a maturação muitas são as informações na literatura. RUBEL *et al* (1972) mostraram que normalmente as sementes maduras de soja contêm aproximadamente 40% de proteína, 20% de óleo, 17% de celulose e hemicelulose, 7% de açúcares, 5% de fibra bruta e cerca de 6% de cinza em peso seco. Porcentualmente os carboidratos solúveis encontrados em sementes de soja são constituídos de sacarose, 5,96%, rafinose, 0,75% e estaquiose, 2,65%, com diferenças entre cultivares e grupos de maturação (HYMOWITZ *et al*, 1972a). Verbascose também tem sido identificada em pequena quantidade, enquanto glicose e outros açúcares redutores presentes nos grãos imaturos em quantidade substancial, desaparecem na maturação e a ocorrência de glicose em grãos maduros é questionável (SMITH & CIRCLE, 1980).

Nos grãos maduros de soja 25 a 30% da matéria seca é constituída por cinza, fibra bruta e celulose (YAZDISAMADI *et al*, 1977), dos quais 4,5 a 5,5% corresponde a cinzas, geralmente composta de 1,83% de potássio, 0,78% de fósforo, 0,31% de magnésio e 0,24% de sódio, cálcio e enxofre, cada um (SMITH & CIRCLE, 1980). Para cv Santa Rosa a fração mineral dos grãos é constituída por 0,58% de fósforo, 2,15% de potássio, 0,41% de cálcio, 0,29% de magnésio e 0,21% de enxofre (BATAGLIA *et al*, 1976).

SMITH & CIRCLE (1980) discute a utilização de fator de conversão de nitrogênio para teor de proteína, que para soja não foi ainda devidamente determinado e que por convenção tem sido utilizado 6,25. Esses autores revelam que o

grão de soja contém pequena quantidade de peptídeos e amino-ácidos não proteicos com dimensões moleculares variáveis que ocorrem como resíduos de síntese incompleta de proteína ou possivelmente resultantes da degradação de proteínas. O extrato livre de proteínas de grãos maduros de soja contém adenina, arginina, colina, glicina, betaína, trigonelina, guanadina e provavelmente canavanina, além de glutathione, aminas quartenárias, todos estes compostos constituem o nitrogênio não proteico de sementes de soja. Esses autores encontraram valores de nitrogênio não proteico variando de 7,8 a 2,88% em peso de grãos moídos e desengordurados.

KRIVORUCHCO *et al* (1979) mostraram que variedades precoces de soja são mais ricas em óleo que as tardias, sendo estas mais ricas em proteínas. KROBER & CARTTER (1962) mostraram que a elevação do teor de proteína por efeito de cultivar ocasionou decréscimo de 30% em açúcares, óleo, holocelulose e pentosanas do grão. Estudo das relações entre constituintes químicos de grãos de soja tem mostrado que açúcar total está correlacionado positivamente com teor de óleo e negativamente com proteína, enquanto individualmente os teores de sacarose e rafinose estão correlacionados positivamente com o teor de óleo e o de estaquiose com os teores de proteína (HYMOWITZ *et al*, 1972a).

1.3 INFLUÊNCIA DO AMBIENTE OU DE EVENTOS FISIOLÓGICOS SOBRE A COMPOSIÇÃO DE GRÃOS DE SOJA

A composição química de sementes de soja pode ser influenciada tanto por fatores genéticos como ambientais. Mui

tos trabalhos têm mostrado variações nos teores de óleo, proteína, ácidos graxos e carboidratos de sementes de soja em função de localidades, cultivares, adubação química, anos agrícolas, tipos de solos e práticas culturais (COLLINS & HOWELL, 1957; COLLINS & SEDGWICK, 1959; MAINI & BAINS, 1965; TEIXEIRA *et al*, 1979a, 1979b).

HILL *et al* (1979) mostraram que o mais importante fator influenciando a produção de soja de uma localidade para outra, ou de um ano para outro, é a disponibilidade de água no solo, daí a necessidade de práticas racionais de manejo de água.

O estudo de correlação entre o teor de óleo e temperaturas máxima e mínima durante o desenvolvimento do grão de soja até a maturação permitiu a HOWELL & CARTTER (1953) verificarem que nos períodos de 20 a 30 e 30 a 40 dias antes da maturação há maior influência da temperatura sobre o teor de óleo do que o exercido em outros períodos. SILVA *et al* (1981) estudando o cultivar Santa Rosa verificou a influência de temperatura e precipitação pluviométrica sobre o acúmulo de óleo nos grãos. FARACO *et al* (1982) verificaram que no período de 20 a 40 dias antes da maturação, temperaturas mais elevadas e menor precipitação pluviométrica afetam positivamente a taxa de acúmulo de óleo, porém isto não implicou em teor final mais elevado nas sementes do cultivar Santa Rosa. Entretanto, HOWELL & CARTTER (1958) obtiveram grãos de soja com 23,0 , 20,8 e 19,5% de óleo quando desenvolvidos em casa de vegetação a temperaturas de 29, 25 e 21°C, respectivamente, durante o período de enchimento de vagens. Segundo

OGREN & RINNE (1973) a temperatura afeta principalmente a fração triglicerídeos e só ligeiramente afeta os outros lipídeos, estando temperaturas mais elevadas relacionadas com maior teor de óleo e proteína, menor grau de poli-insaturação e menores quantidades de ácidos linoleico e linolênico (SMITH & CIRCLE, 1972; CHAPMAN *et al*, 1976).

COLLINS & CARTTER (1956) estudando a variabilidade na composição química de sementes provenientes de vagens de diferentes partes da planta de soja, embora ressaltando os fatores internos de desenvolvimento, concordam que as diferenças na síntese de óleo podem ser devidas às condições ambientais que ocorrem ao tempo que o óleo estava sendo metabolizado nas sementes em diferentes partes da planta. Resultados semelhantes foram encontrados por RUBEL *et al* (1972) e TEIXEIRA *et al* (1982), tendo estes últimos encontrado diferença qualitativa na composição do óleo, porém não quantitativa em relação ao teor total desse composto, atribuindo-se as variações encontradas, em parte, às condições climáticas. HOWELL & COLLINS (1957) mostraram que os teores dos ácidos linoleico e linolênico variam com localidades e variedades, e que os teores dos dois ácidos graxos eram forte e inversamente correlacionados com temperatura. RINNE (1969), mostrou que a síntese de ácidos graxos insaturados é dependente da temperatura do meio, tendo temperatura menores favorecido o aumento da concentração dos ácidos poli-insaturados no óleo de grãos de soja, estes tem concentração mais elevada quando provenientes, também, de plantas crescidas em terra irrigada (CHU & SHELDON, 1979).

HOWELL & CARTTER (1958) revelaram que soja colhida no período de 4 a 6 semanas antes da maturação apresentam alto quociente respiratório e alta assimilação de oxigênio, coincidindo com a máxima intensidade de síntese de óleo. Isso pode indicar a conversão de açúcares a compostos que possuem menos átomos de carbono, por exemplo, óleos. A alta assimilação de oxigênio indica alta taxa de respiração. No período citado há correlação do teor de óleo e temperatura, indicando que o efeito primário da temperatura é no estabelecimento do sistema metabólico para conversão de açúcares a óleo, principalmente nas taxas de reações específicas. A taxa de translocação é um importante fator afetando o peso final individual da semente e assim a produção. WENT (1956) mostrou que a translocação em plantas intactas de tomate está inversamente relacionada a temperaturas acima de 20°C. Assim altas temperaturas não são provavelmente tão favoráveis como baixas temperaturas para translocação de materiais às sementes. Portanto, alguma perda de peso da semente pode ser esperada a partir do aumento da conversão de açúcares a óleo e do aumento de respiração a altas temperaturas favoráveis ao conteúdo mais elevado de óleo. GEIGER & SOVONICK (1970) mostraram que pelo menos em beterraba, a taxa de translocação embora possa ser diminuída temporariamente por baixas temperaturas, é recuperada prontamente ao cessar essa condição desfavorável.

A translocação, distribuição de assimilados, é dependente portanto da atividade fotossintética das plantas e a demanda dos órgãos em desenvolvimento (EVANS, 1975) e influenciada pelas condições ambientes (WENT, 1956; EVANS, 1975).

As condições do meio que diferenciam localidades, são importantes fatores afetando o teor de carboidratos totais, assim como individualmente dos açúcares sacarose, estaquiose e rafinose (HYMOWITZ *et al*, 1972). KROBER & GIBBONS (1962) mostraram que as condições desfavoráveis do clima, muito frio e úmido ou muito quente e seco, estão associados a alto teor de nitrogênio não proteico em sementes. KRIVORUCHCO *et al* (1979) mostraram que o teor de lipídeos é mais alto em variedades precoces, tendo as variedades tardias mostrado significativamente teores menores e baixa atividade do inibidor de tripsina.

A variação do teor de proteína que é resultante pelo menos dos fatores solo, condições ambientes e variedade (SMITH & CIRCLE, 1980) pode ser detectada em função de anos agrícolas, localidades, cultivares e formas de adubação (TANGO *et al*, 1974a, 1974b, 1974c, 1974d) ou de localidades e anos consecutivos de plantio (TEIXEIRA *et al*, 1979), embora esses autores não encontrassem influência de adubação sobre o acúmulo de proteína nos grãos de soja 'Santa Rosa'.

1.4 PROTEÍNAS DE RESERVA EM GRÃOS DE SOJA

As sementes, de maneira geral, apresentam-se constituídas por vários tipos de proteínas, como albuminas, globulinas, glutelinas e prolaminas. Esses três últimos tipos constituem-se em proteínas de reserva de sementes, sendo os produtos de sua degradação - aminoácidos - utilizados para a síntese de proteína pela plântula em desenvolvimento (DERBYSHIRE *et al*, 1976). As proteínas de reserva perfazem um total de 80% das proteínas existentes em sementes de feijão (BARKER *et al*, 1976).

O momento da deposição das proteínas de reserva nos corpos proteicos, em sementes de cereais ou leguminosas, varia, sugerindo a existência de um mecanismo de controle, o qual estaria ligado aos mRNA específicos para cada tipo de fração proteica (CROCOMO, 1977, 1979).

A composição em aminoácidos de proteínas de reserva também varia com as diferentes espécies vegetais (SGARBIERI, 1980), igualmente há variação na intensidade de síntese dessas proteínas. Assim, os cereais normalmente possuem mais glutelinas e prolaminas, e as leguminosas contêm principalmente albuminas e globulinas (GRAHAM & GUNNING, 1970; HILL & BREIDENBACH, 1974a; DERBYSHIRE *et al*, 1976; ARRUDA, 1979). As globulinas de sementes de leguminosas são importante fonte de proteína para alimentação (STOCKMAN *et al*, 1976).

1.4.1 TIPOS E ACÚMULO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DOS GRÃOS

Trabalhos realizados por Osborne na década de 1890 a 1900, mostraram que em sementes de leguminosas predominam globulinas solúveis em soluções salinas. Esse pesquisador juntamente com Campbell em 1898, separaram as duas principais frações proteicas de *Pisum sativum*, legumina e vicilina, mostrando que a primeira é menos solúvel que vicilina em soluções salinas e que vicilina é coagulável a 95°C, enquanto legumina não é (DERBYSHIRE *et al*, 1976).

Osborne demonstrou posteriormente que frações similares podiam ser extraídas de outras sementes de legumino-

sas, como em *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, porém com composição química não idêntica. As proteínas de reserva são de poucas espécies mas constituem alta proporção da proteína total da semente madura de soja (HILL & BREIDENBACH, 1974b).

Das três principais frações proteicas existentes em sementes maduras de soja, com coeficiente de sedimentação 2,2 S, 7,5 S e 11,8 S, estas duas últimas representam 70% do total das proteínas da semente (HILL & BREIDENBACH, 1974a).

Através de estudo de gêneros de onze tribos de leguminosas, encontrou-se que proteínas imunologicamente relacionadas a vicilina e legumina são de ocorrência generalizada em *Fabaceae* (*Vicieae*) e *Trifolieae*, e que as proteínas similares a legumina são mais comuns do que as de vicilina nessas tribos investigadas (DERBYSHIRE *et al*, 1976).

Em soja as quantidades das proteínas 11S e 7S variam durante o desenvolvimento do grão, sendo 7S sintetizada antes da 11S (DERBYSHIRE *et al*, 1976). Em *Vicia faba* (L.) a vicilina é formada antes da legumina, embora a taxa de síntese desta seja mais rápida, o que provoca no grão maduro a razão legumina:vicilina de 4:1 por peso (WRIGHT & BOULTER, 1972).

Em feijão a maior proteína de reserva, 7 S, representa 60% da proteína total da semente e é composta de duas subunidades com peso molecular de 50.000 e 47.000, na razão de 2-3:1. Essa proteína é solúvel a pH 4,7 e crioprecipitada a 0-4°C, também é denominada de glicoproteína II (BARKER *et al*, 1976). Esses autores mostraram também que em *Pisum sativum* a vicilina, proteína solúvel a pH 4,7, é crioprecipitada de extrato aquoso, enquanto a crioprecipitada a partir

de extrato aquoso de soja é composto principalmente de 11S ou seja proteína tipo legumina. As leguminas são precipitadas em pH 4,7 (WRIGHT & BOULTER, 1972), tendo peso molecular na região de 300.000 - 400.000 e em soja recebem o nome de glicinina como relatado por DERBYSHIRE *et al* (1976). A nível celular as legumina e vicilina estão claramente localizadas em corpos de proteína. Algumas leguminosas começam a acumular albuminas antes de suas globulinas. Essas albuminas também podem ser armazenadas em corpos de proteína especializados (GRAHAM & GUNNING, 1970). Estudando a formação de proteínas de reserva em sementes de soja OCHIAI-YANAGI *et al* (1978) concluíram que os componentes 7S e 11S que aparecem nos estágios iniciais do desenvolvimento não são as mesmas globulinas 7S e 11S verificadas no estágio maduro. Essas diferenças eram vistas nas subunidades que as compunham e em suas propriedades imunológicas.

THANH & SHIBASAKI (1976) propõem que todas as proteínas de soja sejam chamadas de glicinina, individualizando-as pela informação do coeficiente de sedimentação, 2S glicinina, 7S glicinina, 11S glicinina, etc. No caso da 7S que é composta por três a cinco componentes, essas seriam denominadas 7S α - glicinina, 7S β - glicinina (THANH & SHIBASAKI, 1976), designando os tipos dímeros ou não, respectivamente. Estes dois tipos de globulina 7S tem sido identificados, também, como β e γ - conglucinininas (OCHIAI-YANAGI *et al*, 1978). Esta última forma de designar as proteínas de soja origina-se de nomenclatura baseada em imunoeletroforese e desenvolvida por CATSIMPOOLAS (1969). Assim, glicinina seria equivalente

ao maior componente (11S) das globulinas de soja, porém distinto do termo glicinina proposto por Osborne e Campbell em 1898 e que representa uma mistura heterogênea de proteínas.

Enquanto, α - conglícinina equivaleria à fração globulina 2S, γ - conglícinina, um dos componentes da fração 7S e β - conglícinina, o maior componente da fração proteica bruta 7S.

Até o presente não há sistema de nomenclatura com aceitação geral para proteínas de soja (WOLF, 1980), porém a que maior aceitação apresentou foi a proposta por NAISMITH (1955), baseada no critério de coeficientes de sedimentação. Embora, HILL & BREIDENBACH (1974b) julguem que o critério de sedimentação isoladamente não é suficiente para caracterizar completamente essas proteínas.

As propriedades de sedimentação de proteínas de soja, entretanto, dependem das condições de composição do tampão, pH e outros fatores (WOLF, 1980). Por exemplo, a porção da fração 7S observada a pH 7,6 e 0,5 de força iônica, dimeriza a 0,1 de força iônica para formar o componente 9S (DERBYSHIRE *et al*, 1976; WOLF, 1980).

A fração 7S das proteínas extraíveis com água contém alantoinase, β -amilase, hemaglutinina, lipoxigenase e pelo menos duas globulinas 7S (WOLF, 1980). Segundo esse mesmo autor a fração 11S, contém somente uma proteína isolada e extraída em água. A globulina 11S pode assim ser considerada a maior proteína de sementes de soja, tem peso molecular aproximado de 350.000, o que é típico das principais globulinas de outras sementes de leguminosas (WOLF, 1980).

A fração 15S é um polímero de glicinina (CATSIMPOOLAS, 1969), considerando nesta terminologia que a proteína 11S se-

ria um dímero de glicinina. Porém, não há informações sobre o isolamento e caracterização daquela fração para estabelecer identidade química com 11S (WOLF, 1980).

As proteínas extraíveis com água frequentemente contêm uma pequena quantidade de material que sedimenta acima da fração 15S, possuindo peso molecular de aproximadamente um milhão (WOLF, 1980). Desde que a urease de soja tem valor de 18S a pH 7 (TANIS & NAYLOR, 1968) é um dos componentes dessa fração, além de ácido nucleico e núcleo proteínas que também podem estar presentes (WOLF, 1980).

Durante o desenvolvimento dos grãos de soja o acúmulo de proteínas tem sido objeto de estudo de alguns autores, porém com dados não concordantes, principalmente devido às diferenças nas condições e técnicas de extração e fracionamento das proteínas. Assim, HILL & BREIDENBACH (1974b) encontraram nos estágios iniciais de desenvolvimento dos grãos de soja a fração sedimentada a 2,2 S como a principal proteína, apresentando entre outras atividade enzimática, decrescendo até a maturação. Não se verificou diferença em tempo do início de síntese e acúmulo entre as proteínas sedimentadas a 7,5 S e 11,8 S, presentes desde 12 DAF, porém ocorreram diferenças entre os componentes da fração 7,5 S. Por outro lado, OCHIAI-YANAGI *et al* (1978) verificaram que grãos de soja aumentaram rapidamente matéria seca e nitrogênio a partir de 40 DAF. Tendo aos 33 DAF sido identificadas as frações 3,3 S, 7,0 S e 12,2 S e após 40 DAF, 6,5 - 7,5 S e 11 - 12 S. Porém, não se detectou imunoprecipitação com anti-11 S globulina, senão após 50 DAF, aumentando rapidamente a partir de então. OCHIAI-

YANAGI *et al* (1978) verificaram, através de teste de especificidade de antígenos, que os componentes 7S e 12S que aparecem aos 33 DAF eram diferentes daquelas frações 7 S e 11 S de globulinas de sementes maduras e que a quantidade relativa de 2-4 S gradualmente decresceu com a maturação e o componente 15 S só foi verificado após 50 DAF.

A dinâmica do acúmulo de proteína total em grãos de soja tem sido estudada por vários autores. RUBEL *et al* (1972) mostraram que quando os grãos de soja alcançavam o máximo peso fresco, somente 61% da proteína encontrada em grãos maduros estava sintetizada. Tendo por base o peso seco, a porcentagem de proteína bruta só aumenta ligeiramente do estágio verde para o maduro (BATES *et al*, 1977; SILVA *et al*, 1981), encontrando-se nos estágios iniciais de desenvolvimento de grão, alto teor de nitrogênio não proteico, 30%, valor esse que diminui constantemente até a maturação completa, 3% (KROBER & GIBBONS, 1962). Para soja 'Santa Rosa', SILVA *et al* (1981) encontraram que o acúmulo de nitrogênio total deu-se principalmente entre 37 a 65 DAF, quando a maturação foi atingida aos 82 DAF. A quantidade de nitrogênio total nos grãos, entretanto aumentou ligeiramente de 8,10 para 8,86% na matéria seca desengordurada, no período de desenvolvimento dos grãos.

Como resultado das diferentes épocas de acúmulo de proteína nos grãos de soja ou de frações dessa proteína, tem-se variação na composição em aminoácidos durante o desenvolvimento do grão. YAZDI-SAMADI *et al* (1977) verificaram esse fato, mostrando que embora dependesse do genótipo da planta, os aminoácidos arginina, serina, ácido glutâmico, valina,

glicina, isoleucina e leucina e às vezes lisina e fenilalanina, aumentam linearmente com a maturação, enquanto os aminoácidos histidina, alanina, metionina e às vezes ácido aspártico, decrescem nesse período.

Quanto ao conteúdo em aminoácidos de frações proteicas de sementes de leguminosas, tem sido revelado que vicilina, 7S, normalmente apresenta menores teores de metionina, triptofano e treonina quando comparada com legumina, 11 S (DERBYSHIRE *et al*, 1976; WOLF, 1980). Especificamente para soja, DERBYSHIRE *et al* (1976) mostraram que a fração 7 S é mais rica em lisina e apresenta menores teores de glicina, cistina, metionina e triptofano, sempre em comparação com a fração 11 S. SMITH & CICLE (1980), também para grãos de soja, mostraram que a proteína precipitada em meio ácido, pH 4,4, apresenta baixos teores dos aminoácidos essenciais, lisina, triptofano, treonina, metionina e cistina, enquanto na proteína solúvel verificou-se que apresentava teores aproximadamente 20% mais elevados para histidina, lisina, tirosina, treonina, cistina e metionina quando comparada com aquela primeira fração proteica.

1.4.2 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS

Como relatado no item anterior, 1.4.1, as proteínas de sementes de leguminosas são praticamente de duas espécies, albuminas e globulinas, prevalecendo estas últimas. Por isso, os solventes mais eficientes para extração das mesmas são água, água e álcali (pH 7-9), soluções aquosas de NaCl, 0,5 a 2M (FUKUSHIMA, 1969a e 1969b; WOLF, 1980), tam-

pão de fosfato pH 7,6, ao qual se adiciona NaCl, 0,4 a 0,5M (WOLF & BRIGGS, 1956, HILL & BREIDENBACH, 1974a e 1974b, OCHIAI-YANAGI *et al* 1978) e mercaptoetanol 0,01M (NASH & WOLF, 1967, HILL & BREIDENBACH, 1974a e 1974b, OCHIAI-YANAGI *et al*, 1978) ou ascorbato, 0,25M (STOCKMAN *et al* 1976). Tampão de Tris-HCl 0,03M, pH 8, também tem sido utilizado para extração de proteínas de sementes de leguminosas (THANH & SHIBASAKI, 1976). Para soja, NASH & WOLF (1967), conseguiram elevar em até 20% a extração de proteínas pela adição de 0,01M de mercaptoetanol a tampão de fosfato, pH 7,6, 0,4M de NaCl. A concentração de NaCl no tampão afeta principalmente a solubilidade das frações 11S e 15S de globulinas de sementes de soja, indicando-se a concentração entre 0,25 e 1M para utilização (WOLF & BRIGGS, 1956).

A solubilidade de proteínas em solução tampão de fosfato de sódio, pH 7,6, é bastante variável (31-87%) conforme a espécie leguminosa, sendo mais elevada para soja, feijão (*Phaseolus vulgaris*), enquanto para espécies de *Vigna* e de guandu (*Cajanus cajan*) apresentam solubilidade mais baixa (SGARBIERI, 1980). Quando as proteínas são de grãos de soja em início de desenvolvimento há menor eficiência de extração (80%) em contraste com grãos mais desenvolvidos (90%), o que é reflexo da alta quantidade de proteína organelar não extraível em células jovens (HILL & BREIDENBACH, 1974b).

Normalmente a extração é realizada em temperatura ambiente (WOLF & BRIGGS, 1956, FUKUSHIMA, 1969, THANH & SHIBASAKI, 1976, WOLF, 1980), porém alguns autores usam tampão com temperaturas mais baixas (4°C) quando estudando proteína de so

ja (HILL E BREIDENBACH, 1974a e 1974b; OCHIAI-YANAGI *et al*, 1978) ou feijão (STOCKMAN *et al*, 1976). Porém, a crioprecipitação de algumas globulinas impede a utilização de tampão a baixa temperatura em muitos casos (DERBYSHIRE *et al*, 1976).

Quanto ao pH do solvente para extração a recomendação básica é que esteja entre 6,5 a 9,0 (WOLF, 1980), lembrando-se que entre pH 3 e 5 estão os pontos isoelétricos das principais proteínas de leguminosas.

Para sementes de soja, embora seu teor relativamente alto de lipídeos, 18-22% (TEIXEIRA *et al*, 1979, 1980), não há unanimidade na utilização de farinha desengordurada, alguns indicam (WOLF & BRIGGS, 1956; WOLF & SLY, 1967; FUKUSHIMA, 1969; THANH & SHIBASAKI, 1976), outros não (HILL & BREIDENBACH, 1974a, 1974b; DERBYSHIRE *et al*, 1976; OCHIAI-YANAGI *et al*, 1978). Porém, praticamente todos utilizam a razão farinha-solvente de 1:10 inicialmente e 1:5 na sequência da extração.

Para fracionamento dessas proteínas há grande diversidade de técnicas, todas, entretanto, apresentam características que não permitem separação tão satisfatória como a que ocorre no caso de utilizar fracionamento com solventes (ARRUDA, 1979) em proteínas de cereais.

A utilização de íons metálicos, particularmente cálcio e magnésio, a crioprecipitação, precipitação com sulfato de amônio, extração fracionada aproveitando o efeito do pH e a precipitação isoelétrica, são algumas delas.

A mínima solubilidade a aproximadamente pH 4,2 corresponde a ponto isoelétrico das principais proteínas, de que extratos proteicos com pH ajustado para 4,0 - 4,2, tem

precipitação de cerca de 90% das proteínas extraídas, globulinas com coeficientes de sedimentação de 2, 7, 11 e 15 S, enquanto as proteínas menores, coeficiente de sedimentação de 2 e 7 S, ficam na fase solúvel a pH 4,2 (WOLF, 1980). A partir dessa propriedade, tem sido utilizado o método da precipitação isoelétrica para purificar legumina (proteína 11 S) separando-a de vicilina (proteína 7 S) que fica em solução quando o pH está na região de 4,7 (DERBYSHIRE *et al*, 1976). Em soja, apesar da proximidade do ponto isoelétrico das proteínas 7 S e 11 S, é possível separá-las através do uso da força iônica adequada, $\mu = 0,5$, principalmente dializando o extrato, antes de precipitá-las, para remoção de fitato que é o maior contaminante das proteínas separadas por precipitação isoelétrica (DERBYSHIRE *et al*, 1976). Porém, é difícil através de técnica de isolamento de proteínas baseada em solubilidade conseguir preparações homogêneas (STOCKMAN *et al*, 1976).

Utilizando o artifício da precipitação isoelétrica, FUKUSHIMA (1969) encontrou para grãos de soja desengordurados que 77,5% da proteína extraída precipitava-se a pH 4,5 enquanto 8,75% permanecia solúvel e 5% do total extraído era constituído de complexo de fitato-proteína e 8,75% de compostos não proteícos.

O fracionamento através de ponto isoelétrico também tem sido utilizado associando-se a baixas temperaturas, 2 a 5°C, para aproveitar a propriedade de crioprecipitação das proteínas de soja. Dessa maneira, THANH & SHIBASAKI (1976) encontraram a partir de grãos de soja desengordurados que 36% das proteínas extraídas eram do tipo legumina ou seja 11 S, 44%,

vicilina ou 7 S, 6% eram formas polimerizadas e 14% solúveis a pH 4,8.

ELDRIDGE & WOLF (1967), utilizando aproximadamente pH 4,5 encontraram que quase 25 a 35% do total das proteínas de grãos desengordurados de soja consistia do componente 11 S, com peso molecular de 350.000.

A filtração em gel tem sido outra técnica utilizada, como por STOCKMAN *et al* (1976), de maneira auxiliar na identificação de proteínas de grãos de feijão, porém sua aplicação a proteínas de soja mostra que um dos componentes 7 S é co-eluído com a 11 S, não se separando (DERBYSHIRE *et al* 1976). De uso mais generalizado é a ultracentrífuga (WOLF & BRIGGS, 1956; HILL & BREIDENBACH, 1974a e 1974b; THANH & SHIBASAKI, 1976; OCHIAI-YANAGI *et al*, 1978) que constitui poderosa ferramenta, fornecendo informações sobre a pureza de preparação e tamanho molecular, porém o poder de resolução da técnica é inferior ao da eletroforese (HILL & BREIDENBACH, 1974a e 1974b; STOCKMAN *et al*, 1976; OCHIAI-YANAGI *et al*, 1978). Nesta última o pH do tampão eletroforético pode ser selecionado para modificar a carga livre nas proteínas e pode-se utilizar 0,5M de NaCl e 2-mercaptoetanol no sistema de gel para prevenir a dissociação ou agregação de globulinas durante a eletroforese (DERBYSHIRE *et al*, 1976). Uma variante dessa técnica é a imunoeletroforese que pode ser usada para testar a pureza das preparações (THANH & SHIBASAKI, 1976; OCHIAI-YANAGI *et al*, 1978) desde que é excelente método para separação de misturas de legumina e vicilina (DERBYSHIRE *et al*, 1976). Estes autores relatam que extratos de *Vicia faba* dão bandas claramente

distintas de vicilina e legumina assim como uma terceira proteína de mobilidade eletroforética intermediária. Porém, alertam que a posição dessas bandas é influenciada pela concentração dos antígenos das proteínas, e quando ocorre uma só banda nem sempre é possível saber qual a que representa.

DERBYSHIRE *et al*, (1976) concluem que as globulinas de reserva são proteínas complexas e a técnica para o isolamento, purificação e caracterização somente agora está suficientemente conhecida para que possa obter resultados comparáveis entre vários laboratórios.

1.5 FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO ATMOSFÉRICO

A simbiose leguminosa - *Rhizobium* é a mais elaborada e eficiente associação entre plantas e bactérias, sendo por essa razão a melhor estudada. Não há dúvida que a maioria das leguminosas pode obter o nitrogênio que necessita para crescimento e produção de grãos da fixação biológica em seus nódulos nas raízes.

O nitrogênio do solo ou de fertilizantes compete com a fixação biológica, sendo usado preferencialmente pela planta em detrimento do nitrogênio atmosférico. Cerca de 12 milhões de toneladas de soja são produzidas anualmente no Brasil tendo como fonte de nitrogênio somente a fixação simbiótica, o que representa uma economia de 5 milhões de toneladas de fertilizante nitrogenado mineral (DOBEREINER, 1978), este com síntese química dependente de combustível fóssil enquanto o *Rhizobium* usa energia solar coletada pela planta através da fotossíntese.

As leguminosas vêm desenvolvendo importante papel na produção agrícola através da história. Seu sucesso em solos deficientes em nitrogênio resulta dos nódulos radiculares, que contêm a bactéria simbiótica *Rhizobium*, capazes de reduzir N_2 a NH_3 (PHILIPS, 1980) e responsáveis por 20% do nitrogênio que se estima ser fixado biologicamente em nosso planeta (FRANCO, 1978).

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma planta capaz de fixar o nitrogênio atmosférico mediante simbiose com a bactéria *Rhizobium japonicum*, o que coloca essa leguminosa numa situação de independência de adubação para suprir as suas necessidades em nitrogênio (MASCARENHAS *et al*, 1978) sendo no Brasil, a fixação simbiótica o principal meio de nutrição nitrogenada da soja (LOPES, 1978). A grandeza da fixação de nitrogênio atmosférico em plantas de soja é estimada em 40 a 206 kg N/ha (FRANCO, 1978) e 100 a 160 kg N/ha.ano (MASCARENHAS *et al*, 1978; BEZDICEK *et al*, 1978; RUSCHEL, 1979). Estas quantidades de nitrogênio fixado simbioticamente fornecem 25 a 65% do nitrogênio total das plantas adultas de soja quando bem noduladas (MASCARENHAS, 1978).

A fixação de nitrogênio molecular do ar, ou seja a sua redução para produzir amônia e outras formas biologicamente úteis de nitrogênio é um processo extremamente importante na biosfera. Para a fixação ocorrer há necessidade de ação conjunta da planta hospedeira e das bactérias presentes nos nódulos das raízes.

Os microorganismos que infestam as raízes das plantas leguminosas entram no parênquima cortical da raiz e ori-

ginam um nódulo, que é uma estrutura altamente organizada com sacos membranosos contendo colônias das bactérias. O nódulo está em conexão direta com o sistema vascular da planta e contém quantidade considerável de hemoglobina, o que não é comum no Reino Vegetal. A hemoglobina auxilia na fixação de N_2 indiretamente por disciplinar o transporte de oxigênio a baixa pressão parcial para o nódulo, pois o oxigênio livre é inibidor da fixação de nitrogênio (BERGEPSSEN, 1971; RUSCHEL, 1979). Segundo LEHNINGER (1976) a informação genética para a síntese de hemoglobina vem da planta, mas esta não se forma na ausência de bactérias.

Os nódulos, que são concreções e expansões de células das raízes, são o centro de fixação e distribuição do nitrogênio fixado. Em soja, eles se apresentam em forma esférica estando presentes na raiz principal ou distribuídos em todo o sistema radicular. A caracterização da eficiência do *Rhizobium*, quando associado a leguminosas, pode ser verificada no campo pela coloração interna do nódulo: os rosados possuem hemoglobina, sendo ativos; os de coloração clara são infectivos e os de coloração escura são deteriorados. A bactéria dentro do nódulo caracteriza-se por morfologia diferente da conhecida em meio de cultura, sendo denominada bacteróide. O *Rhizobium* é uma bactéria gram-positiva, não esporulante, com a forma de bastonete de 0,5 a 0,9 por 1,2 a 3 μ , móvel. Pertence à família *Rhizobiaceae* e na colocação dentro do gênero é apoiada inteiramente na especificidade de formar nódulos com determinadas espécies de leguminosas, havendo no entanto determinados *Rhizobia* que infectam mais de uma espécie, sendo

denominados então de *Rhizobium* de inoculação cruzada (RUSCHEL, 1979). A soja é considerada como integrante do grupo de inoculação cruzada monoespecífica, requerendo *R. japonicum* para o estabelecimento de associação fixadora de N_2 (LOPES, 1978).

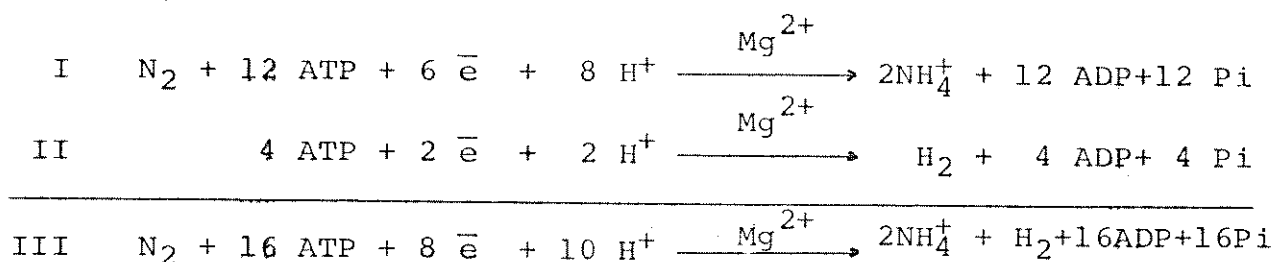
A especificidade entre bactéria e planta foi caracterizada recentemente por uma proteína e um polissacarídeo presentes nos pelos radiculares e na superfície da bactéria, respectivamente. Permitindo a hipótese de que a proteína age como um elemento de ligação entre ambos, acoplando-se a sítios específicos do polissacarídeo e permitindo que a bactéria penetre nos pelos radiculares através de invaginação, dando origem ao canal de infecção. Este canal, com a bactéria em intensa proliferação, penetra até o córtex ou o periciclo, quando eventualmente se rompe em células tetraplóides. Estas se diferenciam em nódulos, cuja estrutura consiste em uma zona central na qual reside a bactéria (bacteróide) envolvida por uma área cortical, encontrada no sistema vascular da planta (EPSTEIN, 1975; RUSCHEL, 1979).

Os organismos fixadores de nitrogênio diferem de seres similares pela presença do complexo nitrogenase, enzima composta de duas proteínas individualmente conhecidas como molibdênio-ferroproteína e ferroproteína. A primeira com peso molecular de 220.000 a 250.000, sendo composta de quatro subunidades. Possui 24 átomos de ferro e dois de molibdênio. A ferroproteína tem peso molecular de 55.000 a 67.000, com quatro átomos de ferro e é constituída de duas subunidades (BURRIS *et al*, 1978; EVANS *et al*, 1978). Pesquisas demonstraram (SCHRAUZER, 1977) que ambas as proteínas fariam parte de uma

reação de óxido redução, agindo independentemente em reações acopladas, envolvendo a oxidação de Mo^{+4} a Mo^{+6} , para a redução de nitrogênio. Esse sistema enzimático precisa ser suprido com Mg-ATP e uma fonte redutora, normalmente ferredoxina (BURRIS *et al*, 1978).

As interrelações das reações envolvidas no processo fixador de nitrogênio em nódulos de leguminosas são apresentadas nas figuras 1 e 2, através de diagramas bastante elucidativos adaptados de EVANS *et al*(1978) e BERGERSEN (1971).

Para PHILIPS (1980), a estequiometria possível das reações envolvendo o sistema nitrogenase na fixação simbiótica de N_2 pode ser a que segue, considerando-se que a razão entre I e II foi calculada com um coeficiente de alocação de um elétron de 0,75.



A eficiência da fixação de nitrogênio em termos de energia situa-se entre 5,0 e 10,4g C/g N, segundo estimativa de PHILIPS (1980).

Uma técnica utilizada para estimar a efetividade da fixação é o emprego da redução de acetileno pela nitrogenase, portanto, avaliando-se a sua atividade. Através dessa técnica pode-se verificar que a atividade da nitrogenase declina no nódulo durante o desenvolvimento da semente de soja, assim como senescem as folhas nesta época (HARPER, 1974; THI-

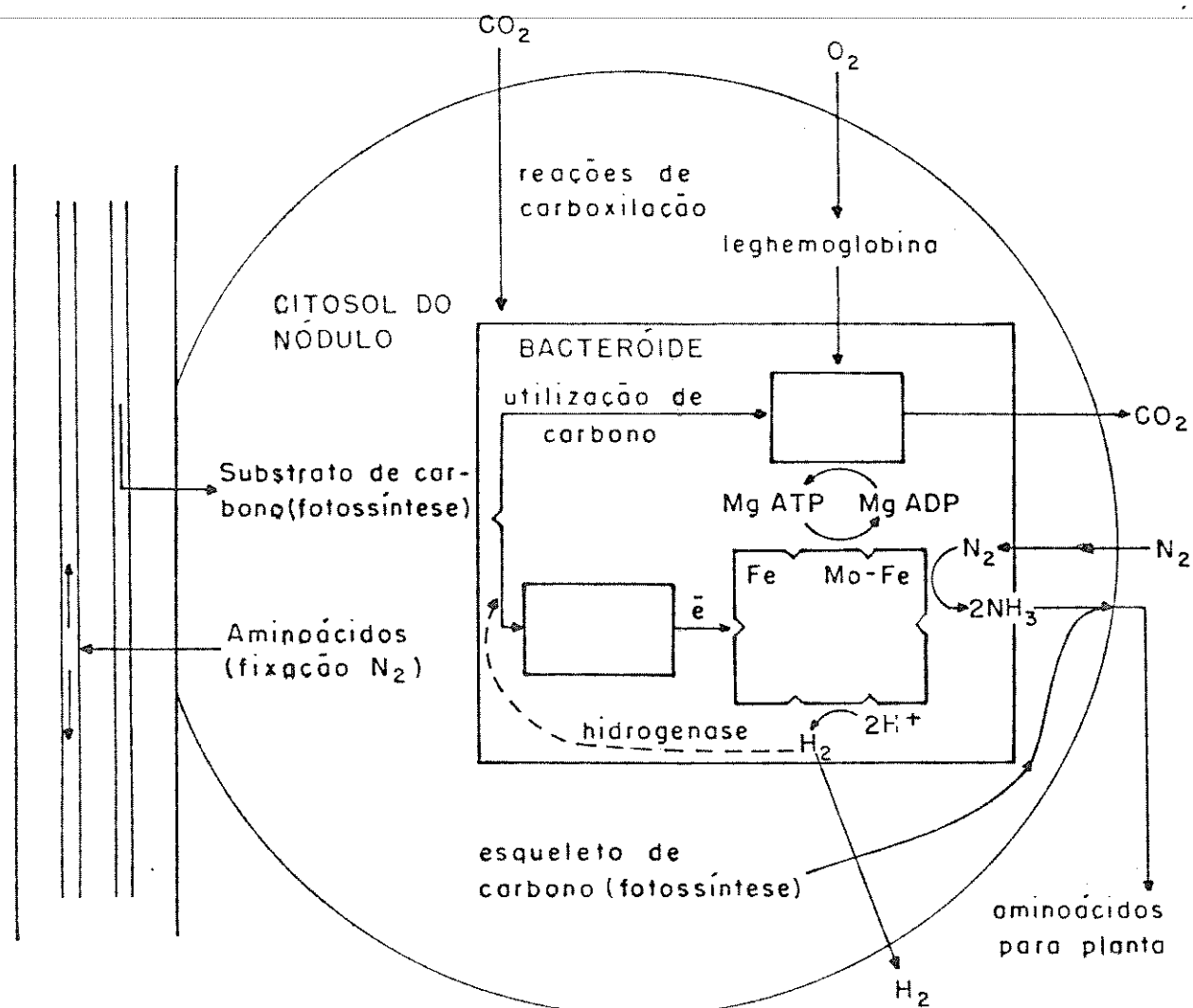


Figura 1. Diagrama ilustrativo das interrelações de reações envolvidas no processo de fixação de nitrogênio em nódulo de leguminosas. Adaptado de EVANS *et al* (1978).

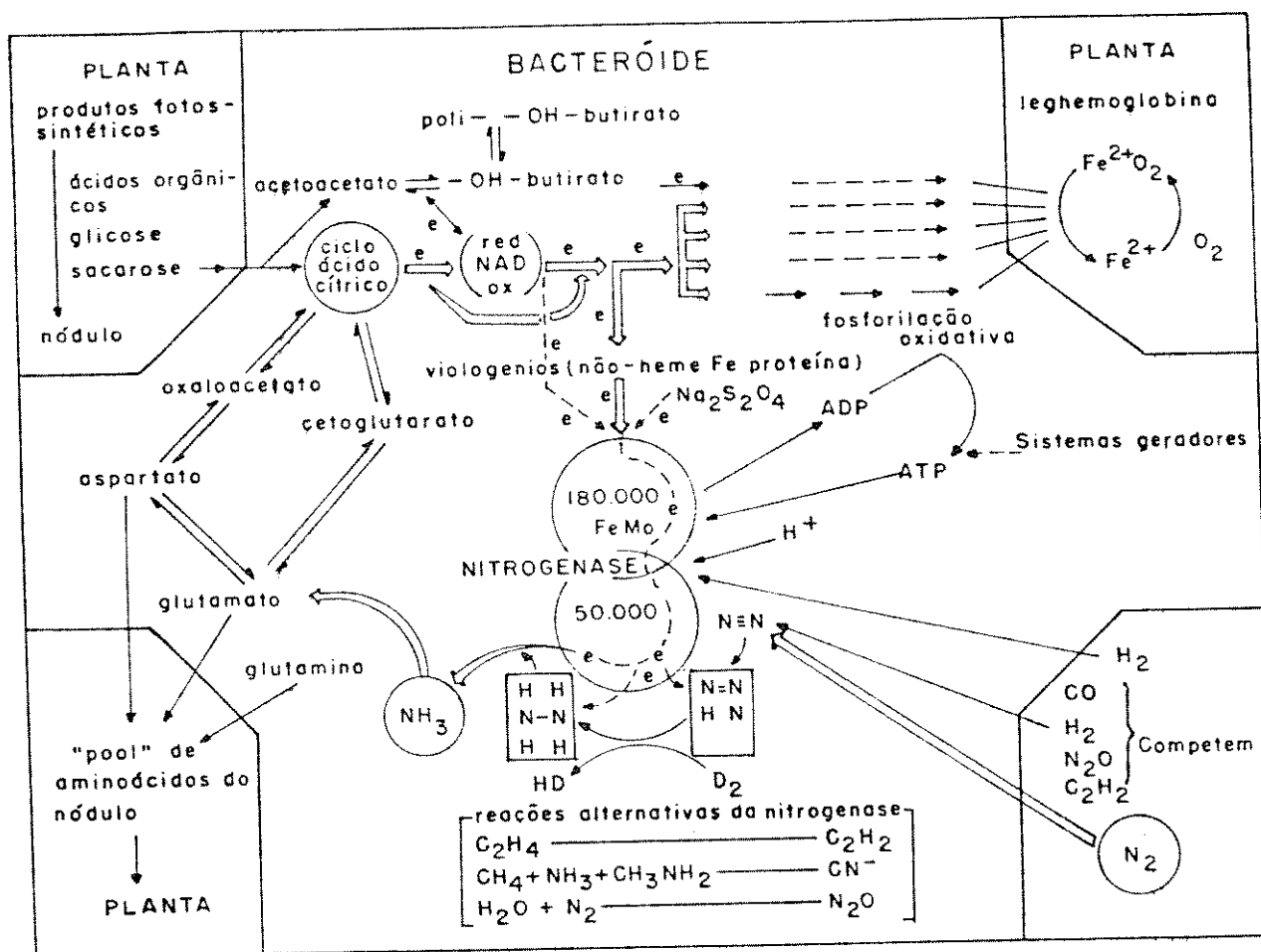


Figura 2. Reações envolvidas na fixação de nitrogênio em nódulos da soja. Adaptado de BERGERSEN (1971).

BODEAU & JAWORSKI, 1975). A degradação de proteínas das folhas para formação de sementes de soja é que acarretaria prejuízos à fotossíntese e à fixação de nitrogênio. Para BÜLOW (1978), a atividade de nitrogenase por planta de soja aumenta a partir do início do florescimento atingindo o máximo perto do final do florescimento. Ao se iniciar o enchimento de grãos a atividade começa a declinar, devido principalmente ao suprimento insuficiente de assimilados aos nódulos, durante o período de desenvolvimento dos frutos. Resultados semelhantes foram obtidos por BATAGLIA & MASCARENHAS (1977) que mostraram ser no período de florescimento a início de desenvolvimento dos grãos, a maior velocidade de absorção de nitrogênio por plantas de soja, chegando nesse intervalo a atingir aproximadamente $3 \text{ kg N.ha}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

A associação simbiótica entre leguminosas e *Rhizobium* depende para sua efetividade de vários fatores internos, como a fotossíntese, estágio de desenvolvimento da planta e externos como pH do solo, micronutrientes e outros. A produção de nitrogênio por leguminosas depende da iniciação e desenvolvimento dos nódulos, eficiência da fixação, da simbiose leguminosa - *Rhizobium*, e nutrição da leguminosa hospedeira (ANDREW, 1978) principalmente com relação ao pH do solo, cálcio, alumínio, manganês e fósforo.

Os fatores fisiológicos envolvidos na indução e controle da atividade da nitrogenase do *Rhizobium* são reconhecidos atualmente como sendo a concentração de O_2 dissolvido no meio (0,08 - 0,4%) e fatores nutricionais que se simplificam em uma fonte de carbono, fonte de nitrogênio (exceto NO_3)

e os usuais compostos inorgânicos.

PHILIPS (1980) relata que plantas de soja desenvolvidas em ambiente com ar enriquecido com CO_2 reduziram $427 \text{ kg N}_2 \cdot \text{ha}^{-1}$, atingindo 83,6% do nitrogênio total da cultura, enquanto plantas controle com níveis normais de CO_2 do ar, reduziram $76 \text{ kg N}_2 \cdot \text{ha}^{-1}$ ou seja 25,8% do nitrogênio total da cultura. Esses dados revelam ser a quantidade de fotossintato disponível o principal fator limitante no controle da taxa na qual a fixação se processa (NEYRA, 1978) e para a redução de nitrogênio atmosférico por plantas de soja em condições de campo (PHILIPS, 1980). Cerca de 32% do fotossintato total é translocado para os nódulos, onde 5% é utilizado para crescimento dos nódulos, 12% na respiração e 15% retornam para o caule através do xilema como compostos aminados gerados pela fixação de N_2 (MINCHIN & PATE, 1973). Os fotossintatos transportados para os nódulos são metabolizados rapidamente assim provendo de poder redutor e ATP necessários para a redução de N_2 a NH_4^+ e também esqueletos de carbono necessários para a formação de aminoácidos. A principal forma de carboidratos que chega aos nódulos é a sacarose, rapidamente convertida a glicose e frutose por vigorosa invertase presente nas células dos nódulos. Assim, as hexoses parecem ser o principal substrato para os bacteróides dentro das células dos nódulos (NEYRA, 1978).

Quantidades grandes de fertilizantes nitrogenados inibem a atividade da nitrogenase, mas um nível moderado de nitrogênio no solo tem pouco efeito na fixação de N_2 em soja, embora alguns autores julguem importante para crescimento ini

cial da planta. A uréia e matéria orgânica são menos prejudiciais à fixação do que fontes de nitrato e nitrogênio amoniacal (BÜLOW, 1978). DOBEREINER & ARRUDA (1967) demonstraram que a adição de pequenas doses de nitrogênio, não havendo limitação devido ao teor de cálcio, pode aumentar a nodulação. Mas a aplicação de nitrogênio mineral provoca menor participação do fixado simbioticamente no nitrogênio total da planta e não aumenta a produção como verificado por FRANCO *et al* (1978).

O primeiro composto estável da fixação de N_2 nos nódulos é a amônia (BERGERSEN, 1965) e a assimilação de amônia em sistemas fixadores de N_2 , principalmente leguminosa-rizôbio tem sido bastante estudada. A demonstração do sistema de glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) em fração de bacteróides de nódulos em diferentes leguminosas (SLOGER, 1973) tem levado à conclusão que o bacteróide é o sítio de assimilação de amônia durante a fixação de N_2 , embora outros autores achem a quantidade dessas enzimas insuficiente para justificar o nitrogênio transportado para planta (SCOTT, 1978).

O principal composto nitrogenado exportado do nódulo para as folhas de leguminosas era asparagina (PATE *et al* 1969; STREETER, 1972; SCOTT, 1978), tendo sido demonstrado mais recentemente que os principais compostos nitrogenados transportados de raízes noduladas para a planta de soja são os ureídeos alantoína e ácido alantóico (MATSUMOTO *et al*, 1977a; FUJIHARA & YAMAGUCHI, 1978; STREETER, 1979).

MATSUMOTO *et al* (1977a) mostraram também que os nódulos constituem o sítio de síntese de alantoína ao estudar plantas de soja com auxílio de $^{15}N_2$. Revelam, ainda, que a

maior parte do nitrogênio solúvel fornecido pelos nódulos às raízes seria a alantoína no estágio reprodutivo das plantas. FUJIHARA & YAMAGUCHI (1978) mostraram que o principal caminho biossintético de alantoína, em plantas de soja, era através da decomposição de bases purinas, via xantina-ácido úrico. Esses autores notaram que há, nos nódulos de soja, um sistema de degradação de bases purinas muito ativo.

A representação esquemática elaborada por RAWSTHORNE *et al* (1980), adaptada e apresentada na Figura 3, apresenta as vias de síntese de compostos nitrogenados nos nódulos e envolvidos no transporte de nitrogênio para outras partes da planta. Nesta figura considera-se que a redução de nitrogênio atmosférico se dá no bacteróide, a assimilação da amônia em tecido da planta hospedeira e o primeiro composto orgânico a incorporar o nitrogênio recém-fixado como sendo a glutamina. A partir dessa amida inicia-se a síntese dos principais compostos nitrogenados que translocam na planta, asparagina com a regeneração de glutamato que participa da síntese de bases purinas e da assimilação de mais N_2 fixado, e alantoína, produto da degradação de bases purinas.

1.6 COMPOSTOS TRANSPORTADORES DE NITROGÊNIO EM PLANTAS

Em plantas superiores há um número limitado de compostos utilizados para transporte de nitrogênio. Tem-se demonstrado que os compostos característicos de transporte de nitrogênio em plantas fixadoras de N_2 atmosférico são espécies-específicos (PATE, 1980). Assim, ureídeos são os principais compostos de exportação de nitrogênio fixado em certas

leguminosas tropicais (MATSUMOTO *et al*, 1977a e 1977b; McCLURE & ISRAEL, 1979; STREETER, 1979; LEA & MIFLIN, 1980). Asparagina e glutamina são translocados em leguminosas temperadas (PATE, 1980) sendo também as mais comuns e importantes para grande número de plantas capazes ou não de fixar nitrogênio (BAUER *et al*, 1977a e 1977b; ARRUDA, 1979; LEA & MIFLIN, 1980). Outros são de distribuição mais limitada, como a amida - metileno-glutamina encontrada em *Arachis hypogaea* (L.) (FOWDEN, 1954; WINTER *et al*, 1982), canavanina em *Canavalia* sp, derivados da amida asparagina em espécies de *Cucurbitaceae* (LEA & MIFLIN, 1980), citrulina em associação de *Alnus*-Actinomiceto e citrulina-glutamina na simbiose de *Macrozamia*-*Anabaena* (PATE, 1980). Em *Pisum* os compostos envolvidos no transporte de nitrogênio são asparagina, ácido aspártico, homoserina e glutamina, enquanto valina, leucina e isoleucina surgem com a disponibilidade de nitrogênio durante degradação de proteína em tecidos de raízes (PATE, 1980). Em espécies produtoras de ureídeos, como caupi, *Vigna unguiculata* e soja, *Glycine max*, a fixação de nitrogênio está associada com a exportação de ureídeos no xilema, entretanto plantas não noduladas subsistem com NO_3^- , exportando menos ureídeos e proporcionalmente mais amidas, especialmente asparagina (KUSHIZAKI *et al*, 1974; ISHISUKA *et al*, 1970; PATE, 1980). Nessas plantas as principais fontes de redistribuição de nitrogênio das partes vegetativas para as reprodutivas são as folhas e as paredes das vagens (PATE *et al*, 1977; EGLI *et al*, 1978).

Na figura 4, é apresentado esquema do metabolismo em nódulos de plantas que transportam amida e ureídeos (REYNOLDS

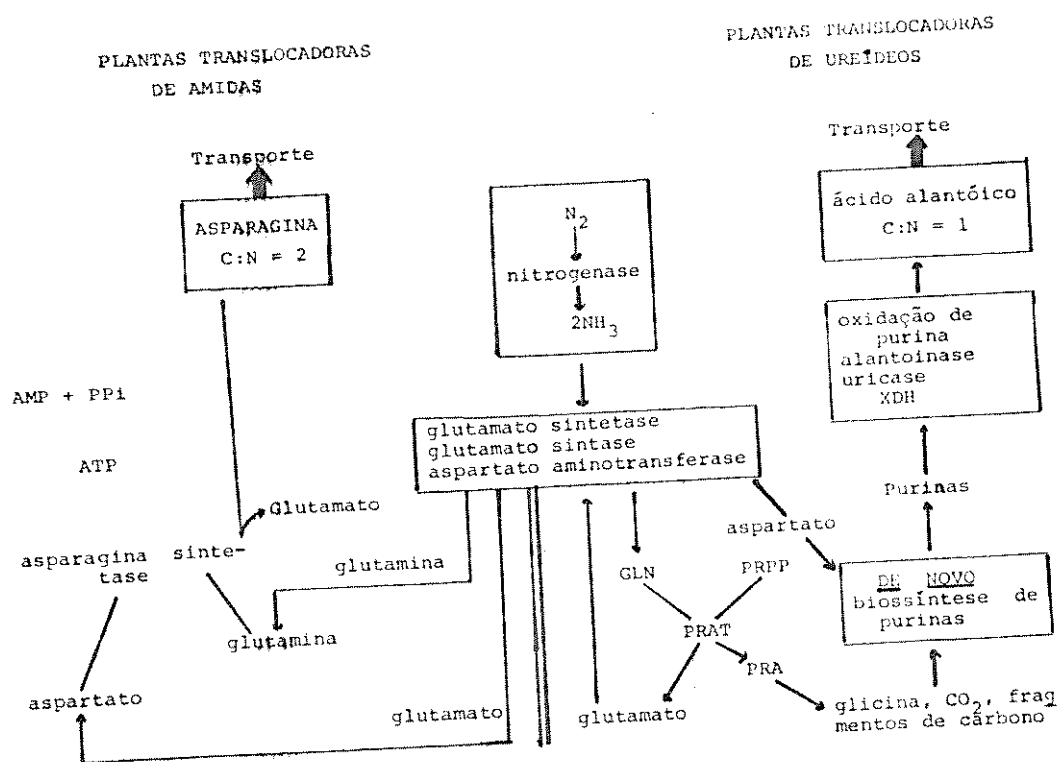


Figura 4 - Metabolismo em nódulos de plantas que transportam predominantemente amidas e ureídeos. XDH - xantina desidrogenase, PRA - fosforibosil amina, PRAT - 5 - fosforibosilpirofosfato amidotransferase, PRPP - 5-fosforibosilpirofosfato. Adaptado de REYNOLDS *et al* (1982).

et al, 1982). Como considerado por PATE (1980) e REYNOLDS *et al*, (1982), a existência de leguminosas exportando principalmente ureídeos ou amidas ou misturas desses grupos de compostos gera questões de interesse sobre o significado biológico desses padrões alternativos de assimilação de nitrogênio.

1.6.1 UREÍDEOS

Alguns derivados da ureia de interesse biológico contêm ureia e fragmentos de dois carbonos que pode ser resíduo de ácido glioxílico, glicólico ou oxálico. Este grupo de compostos quimicamente relacionados incluem membros alifáticos e cíclicos que contêm ureia no anel heterocíclico. Tais compostos são hidantoína, isolado de beterraba no final do século passado por von Lippmann; 5-hidroxihidantoína, importante em metabolismo de alguns microorganismos; hidantoína-5-ácido propionico, que está envolvido no metabolismo de histidina em mamíferos; hidantoina-ácido acético (5-carboxi-metilhidantoina), conhecido produto metabólico de bactéria; e alantoina (5-ureideohidantoina), o qual é o mais importante derivado de hidantoina no campo do metabolismo de plantas (REINBOTHE & MOTHES, 1962). Embora não seja propriamente um ureídeo, o ácido alantóico está intimamente relacionado com alantoína da qual é produto tanto de hidrólise alcalina como enzimática.

A alantoína foi isolada por Schulze & Barbieri em 1881 de caules de *Platanus orientalis* (BONNER, 1950). Na década de 1920 a 1930, Fosse e seu grupo relataram a ocorrência de alantoína e alantoinase em sementes e plântulas de *Phaseolus vulgaris*, *Acer pseudoplatanus* e outros. Na década

de 1950, Mothes estudou o envolvimento fisiológico de alantoina e ácido alantóico no metabolismo de algumas plantas. Esses autores revelaram a ocorrência de ureídeos em plantas como *ácer* (*Acer* spp) e *confrei* (*Symphytum officinale*). Nessas plantas alantoina e ácido alantóico desempenham importante papel no armazenamento e translocação de nitrogênio, sendo que na seiva de *ácer* o nitrogênio de ureídeos corresponde de 70 a 100% do nitrogênio total solúvel (REINBOTHE & MOTHES, 1962; BONNER, 1950). Em 1952, Mothes e Engelbretcht encontraram alantoina em raízes e caules de plantas das famílias *Boraginaceae*, *Platanaceae*, *Hipocastanaceae*, *Aceraceae* e *Leguminosae*, encontrando que N-alantoina total chegava a perfazer 50% do nitrogênio total das folhas e concluindo ser esse composto uma importante forma de armazenamento, desde que torna-se prontamente disponível para translocação de nitrogênio em algumas plantas (BOLLARD, 1956).

Quanto ao metabolismo de ureídeos tem sido sugeridas duas possíveis maneiras de ocorrer a síntese de alantoina em plantas. A alantoina poderia ser formada diretamente a partir de moléculas simples por condensação com ureia, ou a segunda rota, pela degradação aeróbica de purinas, um caminho mais provável do ponto de vista de bioquímica comparativa, para este caminho conhece-se muito bem a sequência de reações para degradação de bases purinas em microorganismos e tecidos animais (REINBOTHE & MOTHES, 1962). SHANTZ & STEWARD (1959) sugeriram que a biossíntese de alantoina em plantas se dava a partir de dois moles de ureia e um mol de glioxilato. Essa hipótese surgiu originalmente a partir dos resultados de Brunel

& Brunel-Capelle obtidos em 1951. Evidências foram obtidas por FREIBERG *et al* (1957), também, ao alimentar folhas de bananeira com uréia ^{14}C e encontrado que é ácido alantóico se tornou muito marcado, sugerindo a condensação direta de uréia com glioxilato. Embora essas evidências da possibilidade da primeira rota, REINBOTHE & NOTHES (1962) julgam que a principal rota para a síntese de alantoína ainda parece ser a relacionada à degradação aeróbica de purinas. LEA & MIFLIN (1980) também mostram que até o momento poucas são as evidências de que a reação de condensação direta possa ocorrer em plantas, embora não se possa descartar essa possibilidade (THOMAS & SCHRADER, 1981), pois mais estudos são necessários.

KRUPKA & TOWERS (1958) administraram glicina ^{14}C e glioxilato ^{14}C a plântulas de trigo através das raízes e a segmentos de folhas dessa planta por infiltração a vácuo, verificando que a glicina é o precursor mais direto de alantoína do que glioxilato. A taxa de conversão de glicina a glioxilato em plantas de trigo é extremamente baixa, enquanto glioxilato é rapidamente convertido a glicina (KRUPKA & TOWERS, 1959), explicando a marcação verificada em alantoína quando glioxilato ^{14}C foi fornecido a plantas de trigo, pois esse composto provavelmente participa via glicina da síntese de purinas. O fornecimento de uréia ^{14}C a planta de trigo não produziu marcação em alantoína ou ácido alantóico, embora a uréia fosse prontamente metabolizada, o que elimina a possibilidade da condensação de uréia com ácido glioxílico para formar ácido alantóico, portanto em trigo alantoína é sintetizada a partir de glicina via intermediários de purina.

BARNES (1959) demonstrou pela primeira vez a possibilidade desses ureídeos serem sintetizados através da degradação aeróbica de purinas. Quando adenina-8- ^{14}C foi administrada a folhas removidas de *Acer saccharinum* em presença de luz por período de mais de 24 horas, 94% da radioatividade do extrato etanólico estava associada com compostos bem conhecidos da degradação aeróbica de purinas em tecidos animais. Alantoína, ácido alantóico e uréia estavam altamente marcados, indicando que estes compostos são intermediários na degradação de purina nesta planta.

REINBOTHE & MOTHES (1962) dividiram em dois grupos as plantas, conforme acumulam alantoína ou ácido alantóico. Nas plantas que tem alto nível de alantoína (*Symphytum officinale*, *Platanus* sp), glicina- ^{14}C é introduzida preferencialmente em serina e alantoína, enquanto a formação de ácido alantóico a partir de alantoína é insignificante, sugerindo que a atividade da alantoinase nestas plantas é baixa. Segundo dados de TEIXEIRA (1981) raízes de *S. officinale* contêm 2% de alantoína na matéria seca, enquanto as folhas possuem teor de 1%, o que evidencia o valor desse composto no armazenamento de nitrogênio nesse vegetal.

Nas plantas que tem alto teor de ácido alantóico (*Acer negundo*, *Aesculus hippocastanum*, *Pelargonium zonale*) há o mesmo padrão de formação de alantoína exceto que alantoína é decomposta via ácido glioxílico e uréia. Em tais plantas glicina- ^{14}C é principalmente incorporada a serina, alantoína e ácido alantóico (REINBOTHE & MOTHES, 1962).

BUTLER *et al* (1961) estudando biossíntese de alan

toína em *Boraginaceae*, forneceram glicina- ^{14}C , hipoxantina-8- ^{14}C a discos de folhas e raízes esterilizadas de *Symphytum uplandicum*. Em todos os tecidos hipoxantina-8- ^{14}C foi largamente convertida a alantoína, confirmando a origem desse composto.

CHERRY & HAGEMAN (1960a e 1960b) e KEY & HANSON (1961) estudaram as purinas e derivados de purinas em *Vicia faba*, plântulas de milho e plântulas de soja, mostrando a ocorrência desses compostos nos tecidos dessas plantas, enquanto KALBERER (1965) mostrou que em folhas velhas de cafeeiro há degradação de cafeína gerando alantoína, que posteriormente é metabolizada para ácido alantóico e uréia, esta finalmente hidrolisada pela urease.

KUSHIZAKI *et al* (1964) e ISHISUKA *et al* (1970) encontraram que caules de soja nodulada no estágio reprodutivo acumulam grande quantidade de alantoína e as variedades não noduladas muito pouco. O acúmulo de ureídeos em caules aumenta com a formação de nódulos, peso e atividade (MATSUMOTO *et al*, 1977b, 1978) e diminui rapidamente quando os nódulos são removidos (MATSUMOTO *et al*, 1978). Durante a formação de fruto em soja a quantidade de ureídeos alcança o máximo no caule e então decresce rapidamente com o enchimento das sementes (MATSUMOTO *et al*, 1977a; FUJIHARA *et al*, 1977; STREETER, 1979), esse decréscimo pode ser resultado do transporte de ureídeos para frutos que são os "sinks" dominantes neste estágio, ou degradação e assimilação de ureídeos em outros compostos nitrogenados que podem ser translocados para os frutos em desenvolvimento.

DAVIES *et al* (1969) revelaram que a degradação de purinas em muitas plantas leva ao acúmulo de ureídeos, alantoína e ácido alantóico. Esses autores mostram que em certas sementes tem sido encontrada a enzima uricase, a alantoinase em muitas plantas em crescimento e a alantoicase só tem sido verificada em sementes de soja. Na figura 5 são mostrados os pontos de atuação de cada uma dessas enzimas.

NAGAI & FUNAHASHI (1961) purificaram alantoinase a partir de *Vigna mungo* e essa enzima hidrolisa alantoína a ácido alantóico quase quantitativamente. TAJIMA & YAMAMOTO (1975) estudaram as enzimas envolvidas no processo de catabolismo de purinas (xantina oxidase, uricase e alantoinase) em diferentes partes da planta de soja. Quanto às atividades das três enzimas, verificou-se que foram mais elevadas nos nódulos das raízes, indicando serem estes o principal sítio ativo de metabolismo de alantoína. A alantoinase foi detectada em todas as partes estudadas mostrando que a alantoína translocada dos nódulos pode ser metabolizada em raízes, caules e folhas. Nos nódulos, a xantina oxidase foi localizada na fração nuclear, enquanto a uricase estava principalmente restrita à fração mitocondrial e alantoinase à fração solúvel. A presença das enzimas alantoinase e alantoicase em caules de soja (TAJIMA & YAMAMOTO, 1975 e 1977) e de alantoicase em *Phaseolus* indica que caules tem a capacidade para degradar tanto alantoína como ácido alantóico, mas não se conhece qual a extensão da degradação dos ureídeos armazenados que serão assimilados em outros compostos (THOMAS & SCHRADER, 1981). As folhas de soja também apresentam a capacidade de degradar ureídeos

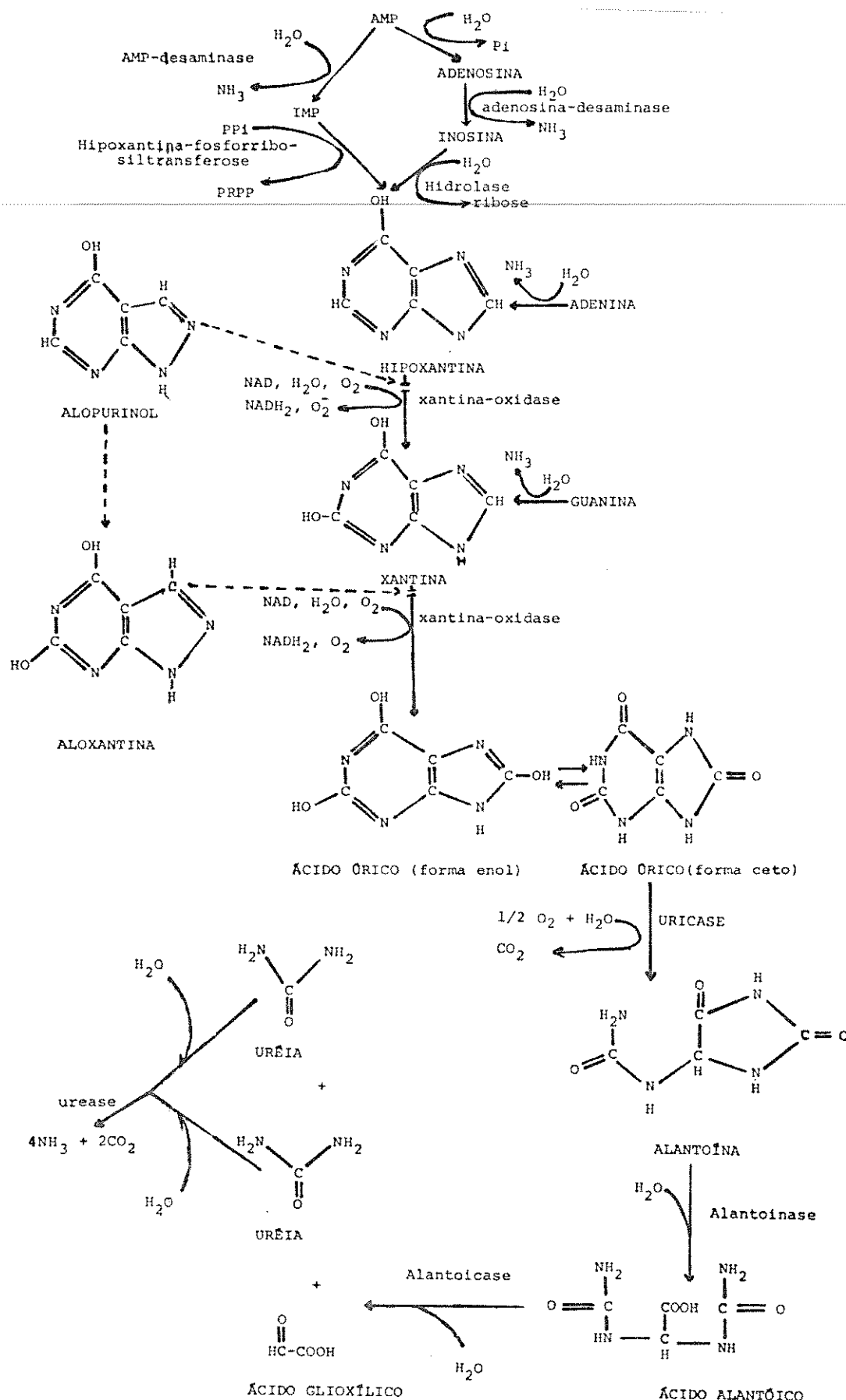
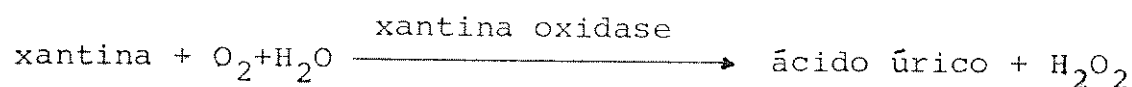
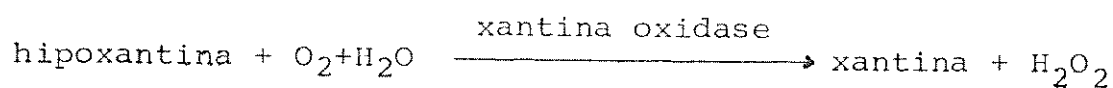


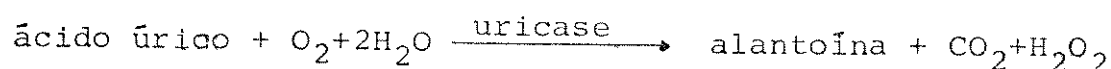
Figura 5 - Degradação de bases purinas a outros produtos nitrogenados, adaptado de LEHNINGER (1976), WHITE *et al* (1968), MAZUR & HARROW (1971) e LEA & MIFLIN (1981).

via alantoinase e alantoicase (TAJIMA & YAMAMOTO, 1975; HERRIDGE *et al* , 1978; THOMAS *et al*, 1980), encontrando-se enzimas com maior atividade em folhas de plantas não noduladas ao se comparar com noduladas (THOMAS & SCHRADER, 1981). Estes autores revelam também que os nódulos tem capacidade de degradar purinas a alantoína mas não de degradar ácido alantóico enzimaticamente, desde que alantoicase não tem sido detectada em nódulos embora esteja presente em folhas de soja.

TAJIMA & YAMAMOTO (1975) também procederam à purificação parcial da uricase a partir de nódulos e radículas , respectivamente. O pH ótimo da enzima dos nódulos foi 9,5, enquanto a da radícula foi pH 7,0. A enzima presente no nódulo não requer cofator, enquanto a da radícula mostrou absoluta necessidade de substância de baixo peso molecular facilmente separável da apoproteína. Portanto a uricase nos nódulos difere quanto a propriedades químicas daquela da planta hospedeira. Culturas de células de *Rhizobium japonicum* não produzem uricase, portanto a indução de uricase e formação de alantoína nos nódulos parece ser uma característica específica da simbiose. A xantina oxidase, uma enzima flavina, cataliza a oxidação de hipoxantina e xantina (WHITE *et al*, 1968):



A uricase, uma cobre-proteína, está envolvida na oxidação de ácido úrico:



MATSUMOTO *et al* (1977b) através da incorporação de ^{15}N em alantoína, plantas de soja alimentadas com $^{15}\text{N}_2$, revelaram que os ureídeos marcados estavam em maior quantidade nos nódulos do que nas raízes, confirmando que os nódulos produzem alantoína, assim como foi obtido por MATSUMOTO *et al* (1977a) e FUJIHARA & YAMAGUCHI (1978). Esses autores encontraram também que a concentração de ^{15}N em alantoína foi ligeiramente maior do que em ácido alantóico, sugerindo que alantoína se decompõe a ácido alantóico.

MATSUMOTO *et al* (1977a) e THOMAS & SCHRADER (1981) estudaram a distribuição e alterações no conteúdo de alantoína e ácido alantóico durante o desenvolvimento de plantas de soja noduladas e não noduladas, verificando que o teor de alantoína por caules, raízes e nódulos separadamente de plantas de soja foi baixo no estágio vegetativo, mas começa a crescer gradualmente com início do florescimento, alcançando o máximo durante o desenvolvimento do fruto, estágio verde, decrescendo rapidamente a seguir. MATSUMOTO *et al* (1977a) mostraram, também que a concentração de alantoína em frutos jovens de soja foi maior que qualquer órgão no mesmo estágio, e o nitrogênio de alantoína atingiu a metade do nitrogênio solúvel, enquanto FUJIHARA *et al* (1977) encontraram valores de até 70% do nitrogênio solúvel como provenientes desses compostos. THOMAS & SCHRADER (1981) julgam que a melhor maneira de expressar a quantidade de ureídeos, principalmente na seiva, é como porcentagem de nitrogênio total da seiva. Tem sido relatados valores que variam de 10% em *Pisum* a 99% em *Acer*.

A concentração de alantoína em sementes, nos está-

gios iniciais do desenvolvimento, é baixa e corresponde a cerca de 15% do teor em frutos de soja de mesmo estágio de desenvolvimento (REINBOTHE & MOTHE, 1962; MATSUMOTO *et al*; 1977a). A alantoína pode segundo esses autores estar voltada para a síntese de proteína nas vagens e sementes, e portanto tendo envolvimento importante na formação de sementes em plantas de soja.

Em *Phaseolus vulgaris*, não nodulado, os ureídeos são a principal forma de nitrogênio reduzido na seiva do xilema de plantas crescendo com fornecimento de nitrato, amônia ou nitrato de amônia (THOMAS & SCHRADER, 1981) e a adição de alopurinol às raízes resulta em grande decréscimo na concentração de ureídeos na seiva do xilema sem afetar a concentração de outros compostos de nitrogênio reduzido ou nitrato. Esses resultados são consistentes com a origem de ureídeos via degradação de purina nas raízes. Os mesmos autores encontraram que plantas alimentadas com sais de amônia contêm mais N-ureídeos na seiva do xilema e em todos os órgãos da planta exceto raízes, quando comparado com plantas que receberam nitrato, sugerindo que ureídeos podem ser produzidos em resposta a toxicidade de amônia nas raízes e transportados para outras partes da planta. WOO *et al* (1981) estudando a síntese "in vitro" de ureídeos em sistema livre de células de nódulos de caupi, mostraram que aspartato, nitrato, nitrito e amônia não tem efeito significativo sobre a síntese de ureídeos, mas glutamina estimula a síntese de ureídeos totais.

A amônia tem sido considerada a principal forma de fixação de N_2 por plantas noduladas, embora fornecendo $^{15}N_2$ às

plantas o nível de marcação desse composto é menor que a de aminoácidos e amidas (APRISON *et al*, 1954; BERGERSEN, 1965; KENNEDY, 1966). Dados concordantes foram obtidos por MATSUMOTO *et al* (1977b) que consideram como provável razão do baixo excesso de nitrogênio marcado em amônia como sendo a existência de mais do que um "pool" interno de amônia saturada com excesso de ^{15}N com somente um ligado diretamente à formação de aminoácidos. THOMAS & SCHRADER (1981) revelam que utilizando ^{15}N após somente quatro minutos detecta-se nitrogênio marcado em ureídeos nas raízes noduladas de soja, o que indica a síntese rápida de ureídeos a partir de produtos iniciais da fixação de nitrogênio atmosférico: amônia e glutamina. Mostram também que pouco ^{15}N de nitrato marcado foi incorporado a ureídeos quando comparado à quantidade de $^{15}\text{N}_2$, o que é boa evidência que a síntese de ureídeos tem lugar nos nódulos a partir de N_2 de fixação recente.

Estudo realizado por FUJIHARA & YAMAGUCHI (1978) sobre o efeito de alopurinol, 4-hidroxipirazolo(3,4-d) pirimidina, sobre o metabolismo de alantoína em plantas de soja, mostrou que esse composto inibe fortemente o acúmulo de alantoína, ácido alantóico e uréia em caule de plântulas e cotilédones de soja, embora não afetasse o desenvolvimento das plântulas. O aumento do teor de ureídeos durante a germinação (MATSUMOTO *et al*, 1977b) não é essencial ao crescimento inicial de plantas de soja. FUJIHARA & YAMAGUCHI (1978) concluíram que sementes de soja em germinação e nódulos possuem sistema muito ativo de decomposição de bases purinas e que alantoína e ácido alantóico são formados pela quebra dessas purinas via

xantina e provavelmente ácido úrico, e também que não há síntese *de novo* de bases purinas para serem decompostas a ureídeos, verificado através da utilização de azaserina que é antagonico à glutamina. Porém, SCHUBERT (1981) propõe que o nitrogênio de fixação recente é utilizado na síntese *de novo* de purinas que são na sequência catabolizadas para a produção de ureídeos.

HERRIDGE *et al* (1978) estudaram ureídeos na economia de nitrogênio de *Vigna unguiculata* (L) Walp., e mostraram que tanto quanto em soja, nessa planta também esses compostos desempenham importante papel no armazenamento e translocação de nitrogênio. Revelam ainda que a enzima allantoinase é detectável em folhas, vagens e sementes de *V. unguiculata*, e que a atividade de uricase é muito baixa. Os níveis de allantoinase em extratos de vagens decresce com a idade do fruto mas a atividade dessa enzima cresce intensamente nas sementes durante as últimas semanas de maturação.

HERRIDGE *et al* (1978) sugerem que o significativo nível de glutamato sintase e glutamina sintetase em nódulos de plantas de caupi aumenta a possibilidade que a amônia formada na fixação de nitrogênio pelos bacteróides possa ser incorporada pelo citoplasma do hospedeiro de maneira semelhante ao mecanismo proposto (MIFLIN & LEA, 1977) para espécies que utilizam amidas como principal transportador de nitrogênio. A glutamina e aminoácidos produzidos podem então servir como substrato de nitrogênio para síntese de ureídeos a partir de uréias ou purinas.

Resultados obtidos no International Institute of

Tropical Agriculture, da Nigéria, tem mostrado que o teor de alantoína em folhas novas e totalmente expandidas de soja pode servir para identificação de plantas que estejam fixando N_2 (GAMBLE, 1978), já que o teor de alantoína nessas folhas era duas vezes maior quando provenientes de plantas noduladas.

TEIXEIRA *et al* (1981) verificaram o mesmo para plantas de amendoim, mostrando que plantas noduladas que receberam adubação nitrogenada em cobertura tiveram redução de 50% do teor de alantoína nas folhas novas e totalmente expandidas em relação às sementes noduladas.

STREETER (1979) reconsiderou seus dados anteriores (STREETER, 1972a e 1972b) que mostravam a asparagina como a principal forma de nitrogênio translocada de raízes para caules ao encontrar alantoína e ácido alantóico em níveis mais elevados do que a asparagina, sendo estas as principais formas de nitrogênio transportadas de raízes noduladas para caules de plantas de soja. Durante o desenvolvimento de vagens e sementes o N-ureídeo perfaz a 2,3, 37,7 e 15,8% do nitrogênio total de folhas, ramos e pecíolos e frutos, respectivamente (STREETER, 1979). Esse autor também mostrou que a relação entre alantoína e ácido alantóico era de 60:40 em folhas, caules e frutos, sugerindo que a maior parte do ureídeo translocado era na forma de alantoína, pois também em exudato de nódulo é muito mais elevado o teor desse composto do que o de ácido alantóico. HERRIDGE *et al* (1978) e THOMAS & SCHRADER (1981), mostraram a predominância de ácido alantóico na seiva do xilema em soja, caupi e *Phaseolus*.

Como os frutos de soja contêm grandes quantidades de ureídeos predominantemente nas vagens (MATSUMOTO *et al*,

1977a) e porque os frutos de maneira geral tem uma taxa de transpiração relativamente baixa, parece que eles recebem a maior parte de seu nitrogênio através do floema, sendo os ureídeos transportados como tal diretamente para os frutos via floema a partir de "pools" existentes em folhas e caules (THOMAS & SCHRADER, 1981). A quantidade de ureídeos em frutos de soja alcança o máximo 1 a 2 semanas antes do máximo encontrado nas sementes, e as vagens contêm geralmente quatro vezes mais ureídeos que as sementes (MATSUMOTO *et al*, 1977a). A quantidade de ureídeos nas sementes aumenta somente após o teor desses compostos nas vagens terem alcançado o máximo. Entretanto, a quantidade em vagens decresce rapidamente, enquanto a das sementes alcança um pico e decresce com a maturação do fruto (MATSUMOTO *et al*, 1977a; THOMAS *et al*; 1980).

Embora a concentração de ureídeos em sementes seja mais baixa do que nas vagens, a atividade de alantoinase é maior nas sementes (HERRIDGE *et al*, 1978). Isto sugere que os ureídeos são primeiramente concentrados nas vagens e então degradados a outros compostos como aminoácidos e amidas ou transportados diretamente para as sementes onde são rapidamente degradados e presumivelmente assimilados a aminoácidos e proteínas (THOMAS & SCHRADER, 1981). O tempo que decorre entre os picos no teor de ureídeos de vagens e sementes é similar ao de nitrogênio total em *Phaseolus* (OLIKER *et al*, 1978), sugerindo que em soja e *Phaseolus* as vagens e sementes agem como "sinks" separados e possivelmente competidores. A alta atividade de alantoinase nas sementes em desenvolvimento suporta a sugestão que ureídeos podem ser degradados rapidamen-

te em sementes após translocação a partir da vagem (FUJIHARA *et al*, 1977).

Não é conhecido, ainda, se os ureídeos atingem as sementes diretamente via tecido vascular (floema) ou se precisam inicialmente entrar nas células da parede das vagens antes de atingirem as sementes. É possível que as vagens ajam como um poderoso "sink" e maior que as sementes no início do desenvolvimento do fruto, porém com o crescimento das sementes estas tornam-se o "sink" predominante, explicando o padrão de acúmulo de ureídeos em tecidos do fruto.

Embora se conheça que os ureídeos são degradados a glioxilato e uréia e se acredite que a uréia seja metabolizada via urease em amônia, sendo esta incorporada em aminoácidos e posteriormente proteínas (THOMAS & SCHRADER, 1981) pouco se sabe a respeito da assimilação de ureídeos em plantas superiores. Na figura 6, é apresentada uma sequência de reações, adaptada de THOMAS & SCHRADER (1981), que indica os passos metabólicos para assimilação de ureídeos, baseando-se em resultados obtidos para microorganismos. Porém, essas reações não foram demonstradas em plantas superiores, embora o composto oxamato produto da metabolização de ácido oxalúrico (figura 6) tenha sido encontrado juntamente com alantoína em beterraba (THOMAS & SCHRADER, 1981).

A maior vantagem da translocação de nitrogênio através de ureídeos é devido à economia de carbono pela planta, já que a relação C:N é 1, enquanto para asparagina e glutamina é de 2 e 2,5, respectivamente. Além disso, alantoína e ácido alantônico tem baixa solubilidade quando comparada às das

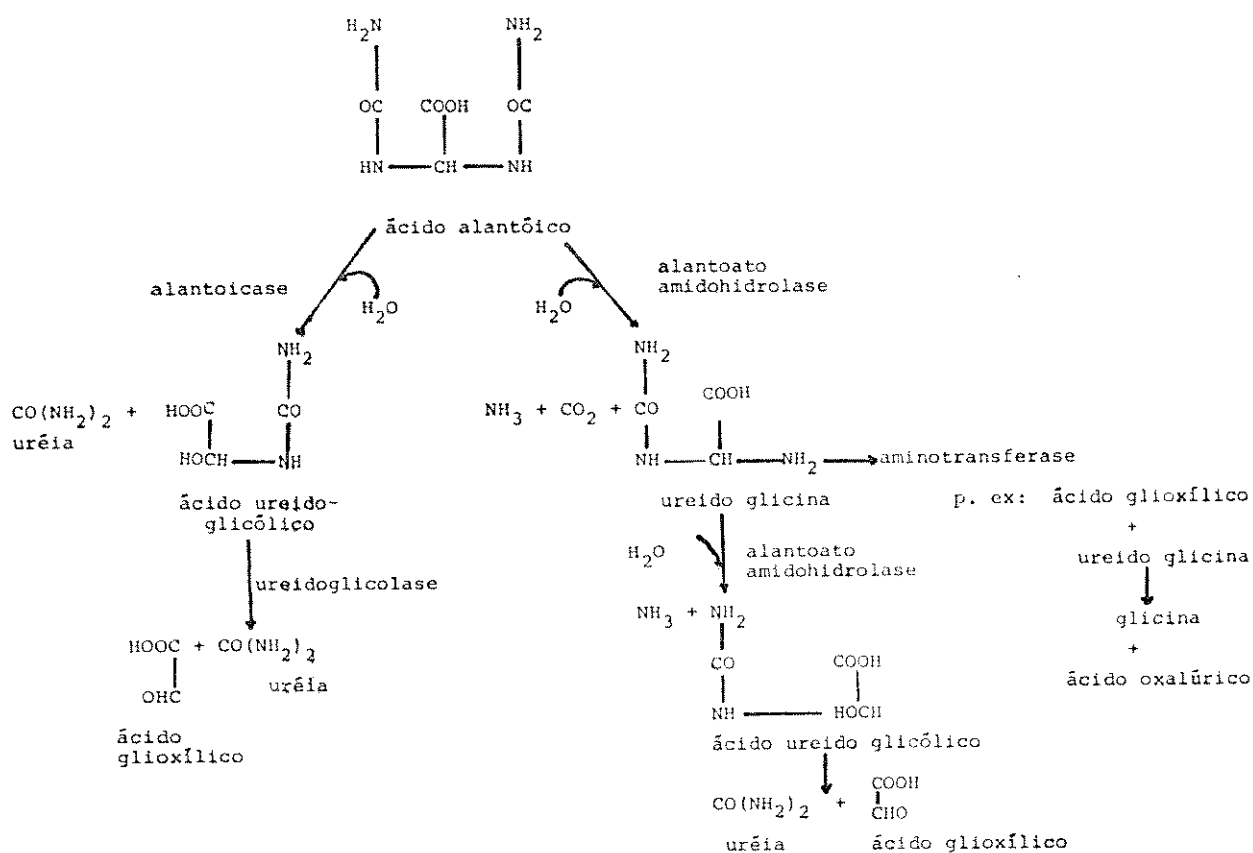


Figura 6 - Via metabólica para assimilação de ácido alantônico, demonstrada em microorganismos. Adaptado de THOMAS & SCHRADER (1981).

amidas asparagina e glutamina, o que pode ser considerado benéfico como compostos armazenadores de nitrogênio, mas desvantajoso se a baixa solubilidade limitar a translocação de nitrogênio e então a produção da cultura (THOMAS & SCHRADER, 1981), o que não foi devidamente verificado.

1.6.2 AMINOÁCIDOS

A amônia proveniente da redução de nitrato, N_2 ou diretamente de NH_4^+ adquiridos pelas raízes, entra no metabolismo principalmente de aminoácidos. As principais vias para assimilação de nitrogênio na forma de amônia em plantas superiores são através da: 1) desidrogenase glutâmica (GDH) que cataliza a reação reversível de aminação redutiva do ácido cetoglutarico, seguida normalmente da participação da glutamina sintetase para síntese de glutamina a partir do ácido glutâmico existente; 2) Glutamina sintetase-glutamato sintase (GS-GOGAT), mediando a transferência redutiva do grupo N-amídico de glutamina para o ácido α -cetoglutarico produzindo duas moléculas de glutamato. Formado, o glutamato sofre ação de aminotransferases dando origem a outros aminoácidos (RYAN & FOTTRELL, 1974; RHODES *et al*, 1976; BOLAND *et al*, 1982). Na figura 7 são apresentadas as sequências metabólicas para síntese de aminoácidos em plantas.

A via GS-GOGAT é preferencial para a introdução de N-amoniacal em aminoácidos, em plantas superiores, principalmente quando o suprimento de amônia é baixo. A outra via, GDH, ocorre simultaneamente a GS-GOGAT e desempenha papel importante e predominante quando as plantas são mantidas em ex-

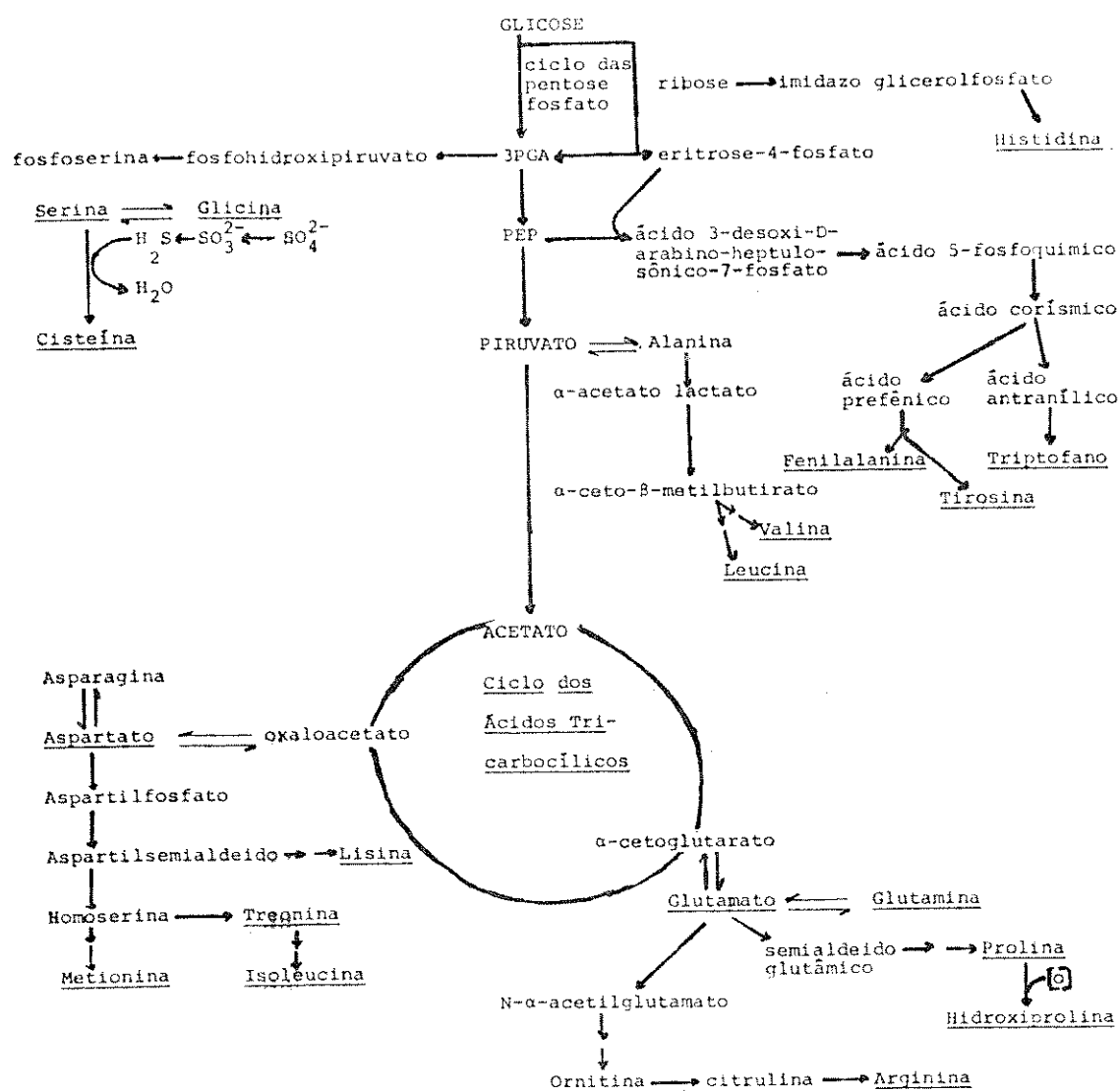


Figura 7 - Sequências metabólicas para síntese de aminoácidos em plantas (COHEN, 1967; DAVIES *et al*, 1969; CONN & STUMPF, 1975).

cesso de NH_3 (RHODES *et al*, 1976). Estes autores verificaram, também, que a glutamina, mais do que a amônia, exerce controle negativo sobre a glutamina sintetase (GS) e positivo sobre a desidrogenase glutâmica (GDH) e que as alterações na taxa dessas enzimas em resposta ao reservatório interno de glutamina pode regular a direção do fluxo de amônia para aminoácidos através das duas rotas alternativas de assimilação.

Durante grande parte da vida da planta, as folhas em desenvolvimento constituem a principal região de demanda de nitrogênio transportado a partir das raízes. O nitrogênio fornecido para as folhas consiste de nitrato junto com uma proporção variada de compostos orgânicos nitrogenados, dependendo das espécies e condições. As amidas glutamina (Gln) e asparagina (Asn) são predominantes, normalmente, como formas de transporte e armazenamento de nitrogênio. Essas amidas são sintetizadas nas raízes ou nódulos e translocadas para a parte aérea (OGREN & RINNE, 1973).

A avaliação dos compostos nitrogenados solúveis em raízes de plântulas de arroz alimentadas com $^{15}\text{NH}_4^+$ ou $^{15}\text{NO}_3^-$ mostrou que a incorporação se deu mais rapidamente em glutamina, seguida de ácido glutâmico e então por ácido aspártico e alanina (BAUER *et al*, 1977a). A glutamina é a chave na doação de nitrogênio para numerosos compostos, sendo considerada um redistribuidor de nitrogênio do grupo amida para aminoácidos através do sistema da glutamato sintase (MIFLIN & LEA, 1976). A alanina pode ser sintetizada através da incorporação direta de amônia ou pode resultar de transaminação a partir de asparagina (BAUER *et al*, 1977a e 1977b), sendo o

principal aminoácido responsável pela união entre os reservatórios de aminoácidos nas células. O que contém aminoácidos provenientes de carboidratos metabolizados e diretamente envolvidos na síntese proteica e o que contém aminoácidos derivados da degradação proteica e que sofrerão transformações antes de serem utilizados na síntese de proteínas (BIDWELL *et al*, 1964).

Detalhado trabalho de KATO & KITADA (1979) mostra que no início do desenvolvimento de plantas de soja os cotilédones fornecem nitrogênio para as folhas primárias, raízes e caule até o oitavo dia, depois disso principalmente às folhas trifoliadas, primeira e segunda. A redistribuição de nitrogênio proveniente dos cotilédones a partir das folhas primárias inicia-se no 14º dia após a germinação quando seu nitrogênio total ainda está aumentando. O influxo de nitrogênio é invariavelmente acompanhado pela síntese simultânea de proteínas nas folhas e de maneira recíproca o efluxo pela simultânea quebra de proteínas nas folhas. A translocação de nitrogênio na planta se dá tanto pelo xilema como floema. PATE *et al*, (1981) verificaram que em *Lupinus albus* o xilema transporta 40% e o floema 60% dos compostos aminados para as partes apicais do caule e ramos laterais. Para essa espécie a transferência de nitrogênio reduzido para o floema foi demonstrado fornecendo $^{15}\text{NO}_3^-$ a caules e recuperando amidas e aminoácidos marcados com ^{15}N no exudato do floema (PATE *et al*, 1975). Esses autores mostraram que a elevação do fornecimento de nitrato às raízes levou ao aumento do nível de aminoácidos no xilema e floema, mas não alterou marcadamente o balanço entre os

aminoácidos individualmente. Em *Spartium junceum* (L.) os principais compostos aminados marcados no exudato do floema após fornecimento de $^{14}\text{CO}_2$ foram serina, asparagina e glutamina (PATE *et al*, 1975). A grande distribuição de ^{14}C entre aminoácidos livres ou ligados de sementes sugere a ocorrência nos frutos de amplo metabolismo de solutos provenientes do floema. As amidas asparagina (Asn) e glutamina (Gln) juntas perfazem 60% da fração amino, em base molar, de exudato do floema de frutos de *Lupinus albus* (L.), sendo serina (Ser), ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), lisina (Lys) e treonina (Thr) os outros aminoácidos mais comuns (SHARKEY & PATE, 1976). Esses autores verificaram, também, que a composição em aminoácidos sofria flutuações diárias, ou seja a quantidade em miligrama de aminoácidos por mililitro de exudato seguia ritmo periódico semelhante à alternância dia-noite.

Em *Lupinus albus* (L.) o xilema transporta um espectro de solutos nitrogenados muito similar ao de floema, e o balanço de aminoácidos nesses canais varia pouco durante o desenvolvimento dos frutos. A baixa relação C/N, peso/peso, dos fluídos do xilema reflete o alto teor de amida presente (PATE *et al*, 1977). A amida asparagina é o principal composto aminado solúvel em plantas de *Lupinus albus*, 55 a 70% do N do exudato do xilema e 40 a 60% do floema, exceto em raízes velhas e noduladas, nas quais glutamina (Gln) predomina. Os outros aminoácidos importantes são Val, Gln, Ileu, Asp e α -Abu (PATE *et al*, 1981; REYNOLDS *et al*, 1982). PATE *et al* (1977) verificaram, também, a alta eficiência na mobilização, 80%, de nitrogênio das vagens para as sementes durante a matu-

ração do fruto. Através do xilema é fornecido 60% de água, 11% do nitrogênio e 2% do carbono necessário ao fruto, enquanto o floema, principal meio de transporte de solutos orgânicos, supre esse órgão com 98% do carbono, 89% do nitrogênio e 40% da água necessários (PATE *et al*, 1977). Desde que a sacarose transporta 90% do carbono do floema e asparagina e glutamina de 75 a 85% do nitrogênio do xilema e floema, estes três compostos tem papel preponderante na nutrição de frutos e sementes de *Lupinus albus*, especialmente quando as reservas das sementes estão sendo elaboradas (PATE *et al*, 1980). Com base nesse fornecimento, verificou-se que durante o período de desenvolvimento o fruto importa 1.756mg de sacarose e 384mg de amidas e aminoácidos e que a partir desses materiais acumulam-se nas sementes 412mg de proteína, 132mg de óleo e 110mg de carboidratos solúveis em ácido perclórico. Por esses dados PATE *et al* (1977) estimaram que os frutos de *Lupinus albus* (L.) apresentam uma eficiência de conversão, de importados orgânicos em reservas alimentícias das sementes, de 31% em peso.

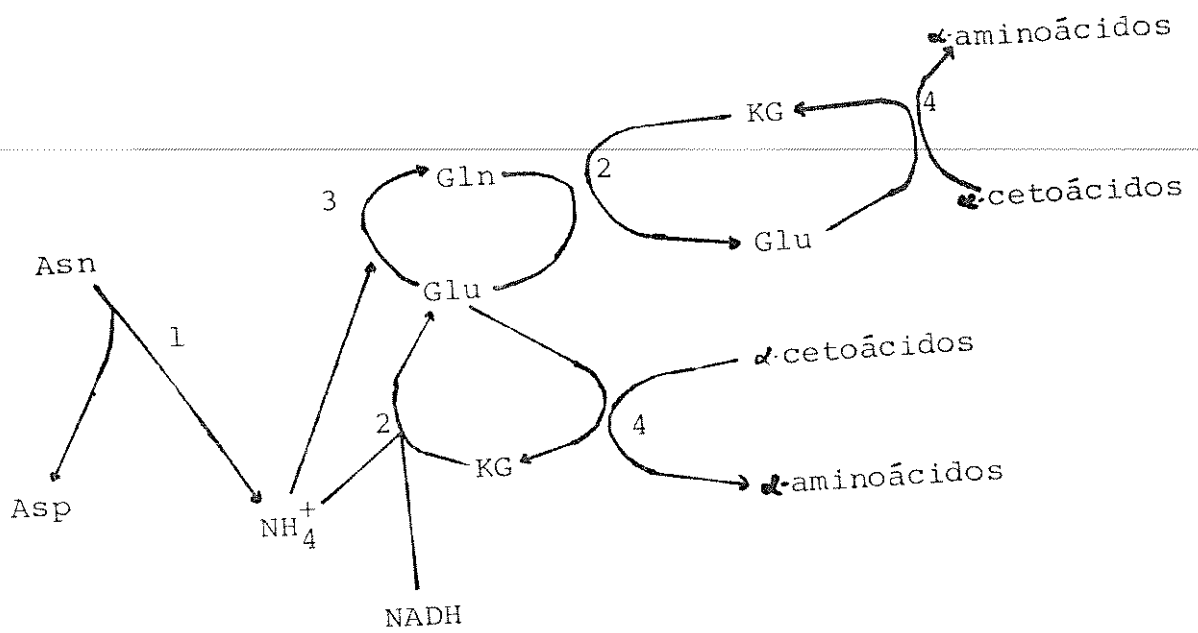
Do nitrogênio translocado para os frutos *L.albus*, 7% é fornecido pelos reservatórios de aminoácidos livres, Asn, Gln e Ala, das partes vegetativas principalmente caules e raízes noduladas, 50% através da mobilização de outras formas de nitrogênio das partes não reprodutivas e 43% provenientes da fixação de N₂ durante o desenvolvimento dos frutos (PATE *et al*, 1981). Verificaram, também, que do nitrogênio atmosférico fixado e exportado pelos nódulos, 56% era como Asn e 29% como Gln. Aparentemente, em folhas senescentes ainda ligadas às

plantas, a glutamina e asparagina são transportadas no floema deixando a folha em direção aos frutos em desenvolvimento (LEA & MIFLIN, 1980).

Para soja, foi verificada a ausência de nitrato em exudato do caule, enquanto nitrato foi mais elevado nos estágios de crescimento do que nos imediatamente anteriores ao florescimento. Durante os estágios que seguiram ao florescimento, a concentração em aminoácidos no exudato foi muitas vezes maior que a de nitrato. Esses dados evidenciam que plantas de soja são dependentes da assimilação de nitratos antes do florescimento, mas fortemente dependente de amônia proveniente da fixação de nitrogênio atmosférico desde o florescimento até a maturação dos frutos (STREETER, 1972a e 1972b). Esse pesquisador verificou que a asparagina foi o composto aminado predominante no exudato, tendo N-asparagina representado 61% de N-aminoácidos totais solúveis. Em relação ao desenvolvimento do fruto verificou-se que no exudato do caule a concentração de Asn é baixa durante o estágio de desenvolvimento da vagem, aumentando grandemente durante o crescimento das sementes, para decrescer a seguir, porém mantendo nível mais elevado do que inicialmente verificado. Os principais aminoácidos presentes em exudato de caule durante o desenvolvimento das plantas (STREETER, 1972a) são Asn, 53 a 73%; Asp, 4 a 16%; His, 4 a 6%; Gln, 2 a 10%; Arg, 2 a 7%; Lys, 2 a 4%; Val, 1 a 2%; Glu, 0,3 a 2%; serina, glicina, alanina, metionina, isoleucina, treonina, leucina, tirosina, fenilalanina e ácido γ -aminobutírico e traços de prolina nas últimas coletas de exudato. Os aminoácidos serina e glicina

se apresentam em teor relativamente elevado nos nódulos e raízes de soja e feijão, devido à produção de ácido alantóico através de síntese *de novo* nessas regiões e plantas (REYNOLDS *et al*, 1982).

Em *L. albus* foi verificado que durante o período de 8 semanas para a maturação das sementes, 80% da asparagina translocada para os frutos foi metabolizada. Isso permitiu ampla síntese *de novo* de aminoácidos nas sementes, ou seja resultou em 50% dos aminoácidos presentes nos grãos no final da maturação (ATKINS *et al*, 1975). A metabolização de asparagina nas sementes é iniciada a partir da ação da enzima asparaginase. A atividade dessa enzima é dependente da presença de K^+ no meio, como verificou SODEK *et al*, (1980) ao estudá-la em cotilédones e testa de semente de ervilha (*Pisum sativum* L.). Esses autores mostraram que até 21 dias após o florescimento não se detectava atividade de asparagina nessas partes das sementes, mas a atividade verificada a partir de então foi suficiente para fornecer o nitrogênio necessário para o aumento do teor de proteína das sementes durante a maturação. A amônia liberada pela asparaginase é reassimilada via glutamina sintetase-glutamato-sintase antes da incorporação na proteína da semente (LEA & MIFLIN, 1980; PATE *et al*, 1981) como apresentado no esquema a seguir:



1 asparaginase; 2 glutamato sintase; 3 glutamina sintetase; 4 transaminases.

A síntese de proteínas a partir de aminoácidos livres presentes nos grãos é dependente de um mecanismo de controle provavelmente ligado a mRNA específicos, em leguminosas (CROCOMO, 1977, 1979) e cereais (ARRUDA *et al*, 1978). Estas mostraram, ao estudar sementes de milho em desenvolvimento, haver também, dependência do genótipo das plantas.

2. OBJETIVOS

São necessárias novas informações a cerca da translocação de compostos aminados em leguminosas. Principalmente, em soja inoculada onde foram detectados recentemente outros compostos transportadores de nitrogênio além dos aminoácidos conhecidos como tal.

Neste estudo buscou-se verificar os principais compostos transportadores de nitrogênio da planta para as vagens e grãos em desenvolvimento, em plantas inoculadas com es tirpes selecionadas de *Rhizobium japonicum* e desenvolvidas em condições de campo.

Para isso, foram avaliados pedúnculo, vagens e grãos de soja cv Santa Rosa, durante o período de desenvolvimento dos frutos, com relação a:

1. Peso seco para estabelecer curvas de acúmulo de matéria seca em grãos e vagens.
2. Lipídios e carboidratos nos grãos para verificar o acúmulo desses compostos nos cotilédones.
3. Nitrogênio total, proteico, dos grãos para es

tudo do acúmulo de proteína nos cotilédones.

4. Fracionamento de proteínas dos cotilédones para informar a cerca da síntese proteica durante o desenvolvimento dos grãos.

5. Composição em ureídeos e aminoácidos da fração de nitrogênio não proteico de pedúnculo e vagens, para identificação de compostos nitrogenados translocados da planta para os grãos.

6. Composição em ureídeos e aminoácidos da fração de nitrogênio não proteico de grãos para verificar os compostos nitrogenados metabolizados ou incorporados diretamente às proteínas dos cotilédones.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL E EXPERIMENTAÇÃO DE CAMPO

3.1.1 DESCRIÇÃO DO MATERIAL

Neste estudo foram utilizadas plantas de soja, cultivar Santa Rosa, que é desde a década de 1960 a mais plantada em todo o Brasil.

O cultivar Santa Rosa foi selecionada por S. Miya-saka e L.F. Williams em 1958 no Instituto Agrônomo, Campinas, e descende do cruzamento entre La 41-1219 e D 49-772, que eram linhagens provenientes do sul do Estados Unidos. Esse cultivar em 1963, então denominado L-326, foi multiplicado comercialmente no Município de Santa Rosa, Rio Grande do Sul, e daí recebeu o nome dessa Localidade (MIRANDA *et al*, 1977).

O cv. Santa Rosa apresenta grande estabilidade produtiva, comportando-se de maneira satisfatória nas mais diversas condições de cultivo. Segundo MIRANDA *et al* (1977), esse cultivar apresenta tipo de crescimento determinado, ciclo

completo em torno de 130 dias e altura de aproximadamente 80cm. A produção média de 'Santa Rosa' é estimada em 2 400 kg/ha.

3.1.2 CULTIVO DO MATERIAL

O cultivar Santa Rosa foi plantado nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80 em campo de multiplicação de sementes do Centro Experimental de Campinas, Instituto Agronômico.

Utilizou-se área de 1 ha de solo Latossolo Roxo, que recebeu a aplicação a lanço de adubação com KCl e superfosfato simples nas quantidades de 50 kg/ha de K_2O e 150 kg/ha de P_2O_5 .

As sementes utilizadas foram inoculadas com estirpes de *Rhizobium japonicum*, obtidas pela Seção de Microbiologia do Solo do Instituto Agronômico.

O espaçamento entre linhas de plantio foi de 70cm e a densidade de 20 plantas por metro linear. Os dois anos agrícolas se apresentaram diferentes quanto à precipitação pluviométrica e temperatura média, influenciando o desenvolvimento das plantas, principalmente quanto ao período de desenvolvimento de frutos.

Nas figuras 8 e 9 são apresentados os dados diários de temperatura média e precipitação pluviométrica de janeiro a maio, para os anos de 1979 e 1980, indicando-se, também, os eventos principais no desenvolvimento de frutos e as amostragens.

No primeiro ano a floração das plantas de

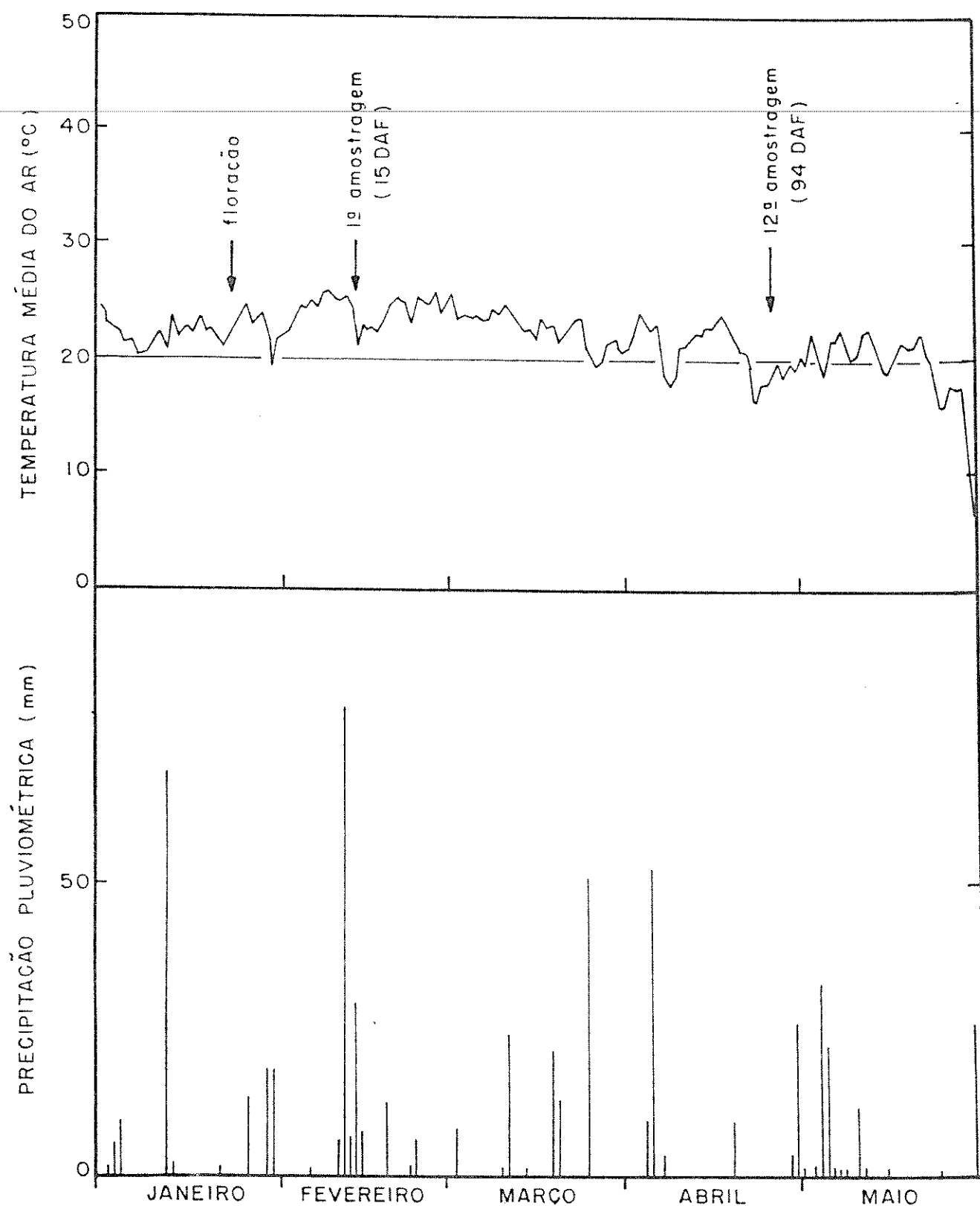


Figura 8. Temperatura média e precipitação pluviométrica , diárias, durante o período de desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa, ano agrícola de 1978/79.

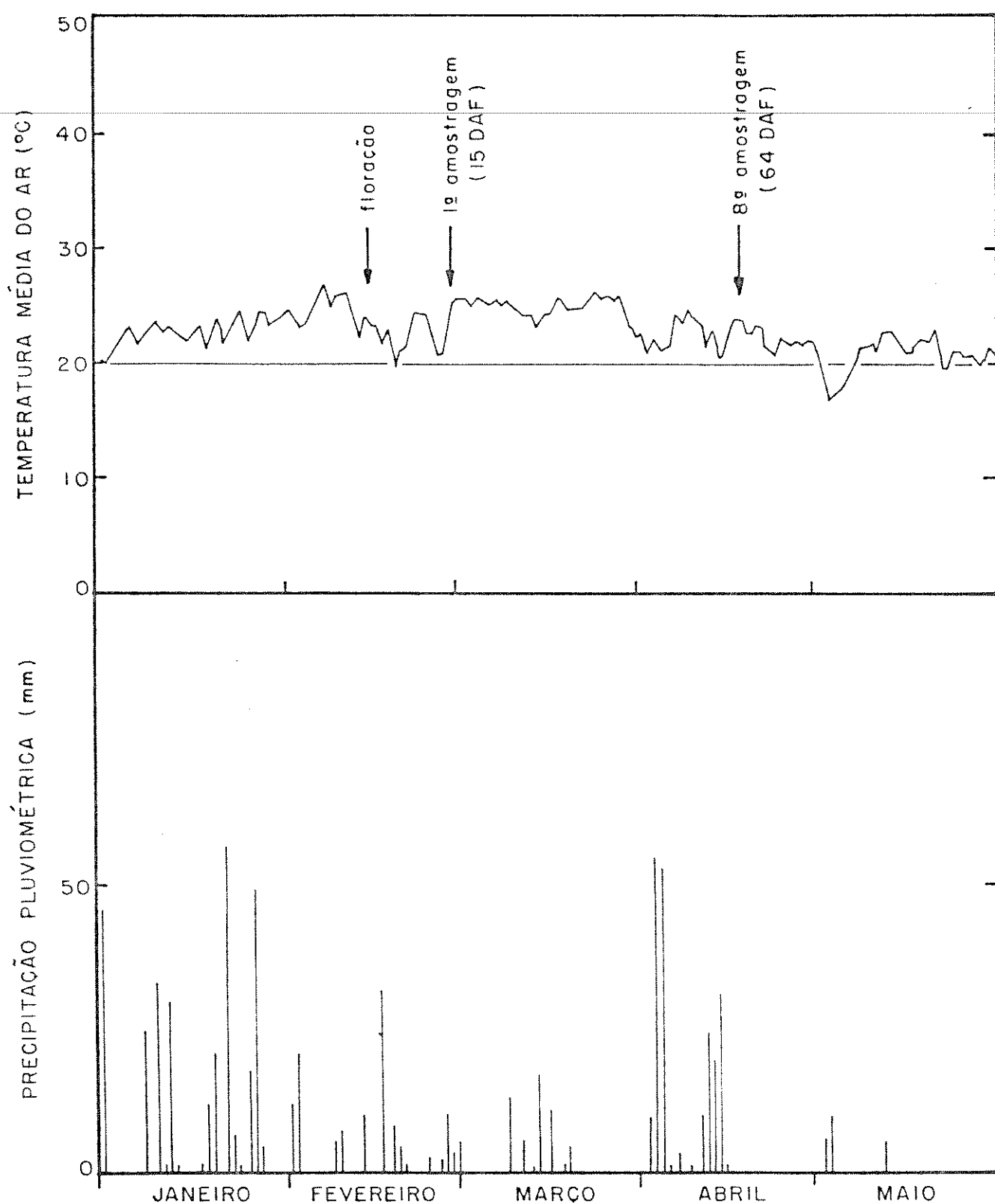


Figura 9. Temperatura média e precipitação pluviométrica , diárias, durante o período de desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa, ano agrícola de 1979/80.

'Santa Rosa' ocorreu em 22.01.1979 e para 1980, ocorreu em 13.02.1980.

3.2 TÉCNICA DE AMOSTRAGEM

3.2.1 ESCOLHA DA POSIÇÃO DOS FRUTOS NA PLANTA PARA AMOSTRAGEM

A planta de soja apresenta frutos distribuídos em todo o seu perfil. Para a escolha de que parte da planta tomar as amostras em função de informações de trabalhos (COLLINS & CARTER, 1956; BRIM *et al*, 1967) que revelam ocorrer diferenças na composição dos grãos devido à sua posição de desenvolvimento, foram obtidos dados referentes à composição química de grãos no ponto de maturação de frutos inseridos no ápice, centro e base de plantas de 'Santa Rosa', cultivadas no ano agrícola de 1978/79 desenvolvidas nas mesmas condições que as utilizadas neste trabalho.

Os dados obtidos revelaram que para o cultivar Santa Rosa os teores de óleo e açúcares solúveis não variam (Tabela 1) enquanto os teores de polissacarídeos apresentaram maior variabilidade.

O teor de proteína foi igual para grãos de frutos amostrados no ápice e centro das plantas e menor para grãos da base. Não se considerou a posição do grão no fruto pois como revelam COLLINS & CARTER (1956), essa variação é muito pequena em relação à posição dos frutos na planta.

Em função dos dados obtidos e devido à maior facilidade de identificação de frutos de mesmo estágio de desen

Tabela 1 - Variação dos teores de proteína, óleo, açúcares solúveis e polissacarídeos em grãos de soja cv Santa Rosa em função da posição dos frutos na planta.

Compostos (1)	Posição dos frutos nas plantas			DMS (2)
	Ápice	Centro	Base	
Proteína	39,35	38,62	34,79	1,14
Óleo	22,52	23,07	22,64	1,19
Açúcares solúveis	12,21	12,28	13,15	1,02
Polissacarídeos	10,77	13,96	12,22	2,61

(1) Dados expressos em %/M.S.; média de três repetições.

(2) DMS obtido pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

volvimento verificado pelo tamanho de frutos e grãos, cor dos frutos, optou-se pela retirada de amostras de pedúnculo e frutos inseridos no ápice e centro das plantas, onde é maior o número de frutos, devendo-se levar em consideração as variações de composição reveladas ao se comparar resultados.

3.2.2 COLETA DE AMOSTRAS

Para a realização deste trabalho foram coletadas amostras de pedúnculos e frutos de soja a partir do 15º dia após a floração (DAF) e semanalmente até o ponto de colheita dos grãos. A amostragem sempre foi realizada no período da manhã e foram coletados pedúnculos e frutos inseridos no ápice e centro das plantas. Essas amostras foram tomadas ao acaso, percorrendo-se a parte central do campo de plantio, tomando-se cerca de 150 frutos e os pedúnculos correspondentes em cada amostragem. Do material coletado foram tomadas duas subamostras para análise.

Após cada amostragem o material coletado era levado imediatamente ao laboratório para preparo e armazenamento.

3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANALISES

3.3.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras no laboratório eram pesadas para avaliar o peso verde. Os frutos foram abertos para separação de vagem e grãos e seus pesos frescos determinados.

Uma parte do material de cada amostragem de pedúnculos, frutos, vagens e grãos foi utilizada para avaliação

do peso e teor de água presentes em cada uma dessas partes.

O material não utilizado foi armazenado em congelador a -15°C para conservação até a realização das análises.

3.3.2 PREPARO DE EXTRATOS PARA ANÁLISE

3.3.2.1 EXTRAÇÃO DE UREÍDEOS E AMINOÁCIDOS LIVRES

A extração de aminoácidos livres e ureídeos de grãos, vagens e pedúnculos foi efetuada com álcool etílico 75%, a frio, macerando o material em almofariz. O extrato alcoólico obtido foi evaporado redissolvendo os compostos extraídos com água destilada, quando para a análise de ureídeos e nitrogênio solúvel e tampão de acetato pH 3,1 quando para análise de aminoácidos.

Pesou-se 1g das amostras, colocando-se 5ml de etanol 75%, homogeneizando em almofariz e filtrando-se a seguir. O extrato foi evaporado em chapa aquecida. Quando os extratos foram armazenados adicionaram-se algumas gotas de clorofórmio e foram mantidos em congelador a -15°C .

3.4 ANÁLISES QUÍMICAS

3.4.1 MATÉRIA SECA

Para a obtenção de dados sobre o acúmulo de matéria seca das partes amostradas procedeu-se à secagem delas em estufa com circulação de ar forçada, à temperatura de 55°C por 6 dias, como sugerido por YAZDI-SAMADI *et al* (1977).

3.4.2 ÓLEO E ÁCIDOS GRAXOS

O óleo nos grãos, durante o período de desenvolvimento destes, foi extraído com solvente orgânico, hexano, a quente, utilizando extratores soxhlet por 8 horas e avaliação gravimétrica (AOAC, 1970). Os ácidos graxos presentes no óleo, foram determinados por cromatografia de gás usando coluna com a fase líquida DEGS 10%, após esterificação com metanol- H_2SO_4 descrita por HARTMAN & LAGO (1973).

3.4.3 CARBOIDRATOS

Foram avaliados os teores de açúcares solúveis e polissacarídeos nos grãos provenientes de todas as amostras. A extração de açúcares solúveis foi efetuada com álcool etílico 70% (v/v) e a de polissacarídeos com HClO_4 52% (v/v) no resíduo da extração alcóolica (TEIXEIRA *et al*, 1979), tendo esses compostos sido determinados por colorimetria através da reação com fenol- H_2SO_4 (DUBOIS *et al*, 1956).

A marcha analítica foi a descrita a seguir:

a) extração dos açúcares solúveis, da amostra moída, com álcool etílico 70% (v/v), seguida de centrifugação;

b) o sobrenadante foi evaporado em banho-maria, adicionou-se água, filtrou-se e uma alíquota dessa solução foi retirada;

c) à alíquota tomada adicionou-se solução de fenol 5% (p/v) e ácido sulfúrico concentrado. Deixou-se esfriar em repouso e leu-se a 490nm em espectrofotômetro, tendo soluções de glicose como padrão;

d) o resíduo livre de açúcares solúveis, recebeu a adição de HClO_4 52% (v/v) e após período de 30 minutos sob agitação e 60 minutos em repouso, tomou-se uma alíquota para a reação com fenol e ácido sulfúrico e posterior leitura em espectrofotômetro a 490nm. A solução padrão utilizada foi de amido solúvel de batata.

3.4.4 NITROGÊNIO TOTAL

Determinou-se o teor de nitrogênio total em grãos, nas frações proteicas e nos extratos de pedúnculos, vagens e grãos, obtidos como descrito em 3.3.2.1.

A análise foi efetuada através da digestão do material com H_2SO_4 concentrado utilizando como catalizadores mistura de HgO e K_2SO_4 , seguida da adição de H_2O_2 (BATAGLIA *et al*, 1978). O extrato obtido nessa digestão foi destilado em sistema micro kjeldahl, sendo o destilado usado para titulação com ácido sulfúrico diluído.

3.4.5 FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS

Efetuuou-se o fracionamento de proteínas de grãos amostrados nas colheitas correspondentes a 29, 52, 74 e 94 dias após a floração (DAF).

O fracionamento obedeceu ao esquema apresentado na figura 10 onde se vê que os grãos foram moídos e homogeneizados para extração das proteínas com tampão de fosfato pH 7,6 0,5M de NaCl, em almofariz na primeira extração, e nas duas subseqüentes a extração foi efetuada em tubos de centrí-

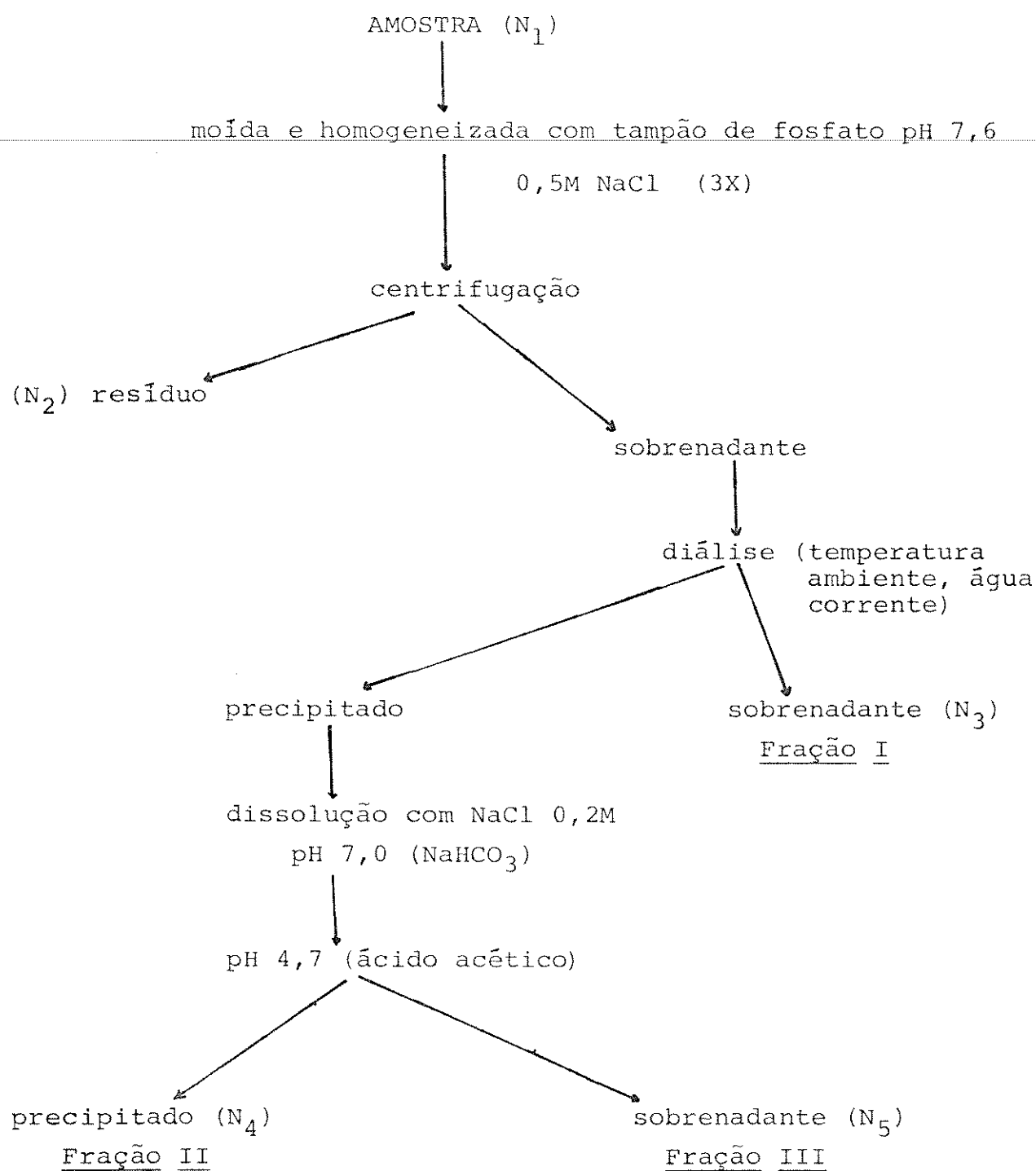


Figura 10. Marcha esquemática para extração de proteínas em grão de soja. (N_i) - determinações de nitrogênio.

fuga.

Após a centrifugação, no resíduo determinou-se o teor de nitrogênio para avaliação da extração efetuada. O sobrenadante foi dialisado à temperatura ambiente, com água destilada corrente por 10 horas. Após a diálise centrifugou-se. O sobrenadante teve o teor de nitrogênio determinado e constituiu-se a fração I e o precipitado foi redissolvido com solução de NaCl 0,2M, ajustando para pH 7,0 com solução de NaHCO₃. Após a dissolução das proteínas alterou-se o pH da solução com ácido para pH 4,7. Atingindo esse pH ocorreu a precipitação de uma parte da proteína (fração II) na qual foi determinado o teor de nitrogênio e a que ficou em solução (fração III) onde também determinou-se o teor de nitrogênio.

O tampão de fosfato pH 7,6 foi obtido pela mistura de solução Na₂HPO₄ 1/15M e solução de KH₂PO₄ 1/15M. A essa mistura foi adicionado NaCl para valor final 0,5M e mercaptoetanol para concentração final de 14μm. O pH final verificado foi de 7,59.

A técnica utilizada baseia-se principalmente nas relatadas por WOLF & BRIGGS (1956), HILL & BREIDENBACH (1974a e 1974b) e OCHIAI-YANAGI *et al*, (1978).

3.4.6 UREÍDEOS

3.4.6.1 UREÍDEOS TOTAIS

Para a determinação de ureídeos em pedúnculos, vagens e grãos do extrato descrito em 3.3.2.1, através de metodologia baseada em YOUNG & CONWAY (1942) e STREETER (1979), des

crita a seguir.

Tirou-se uma alíquota do extrato contendo 0,05 a 1 mg de ureídeos (alantoína + ácido alantóico) e transferiu-se para balão volumétrico de 50ml, completando-se o volume a seguir.

Pipetaram-se 5ml desse balão para tubo de cultura, 25ml, adicionando-se 1 ml de NaOH 0,5N. O tubo foi aquecido em banho-maria e mantido por 7 minutos em ebulição. O mesmo foi feito para alíquotas de soluções padrão de alantoína para concentrações de 3,16 µg/ml a 15,8 µg/ml.

Após a remoção do banho-maria o tubo foi imerso em água a $\pm 20^{\circ}\text{C}$. Adicionou-se então 1 ml de HCl 0,5N e mais algumas gotas para acidez em torno de 0,02N.

Em todos os tubos, amostra e padrão, colocou-se 1 ml de solução de cloridrato de fenilhidrazina 0,33%. Agitou-se, colocando-os, a seguir, em banho-maria à ebulição por exatamente 2 minutos.

Após o que foram imediatamente imersos em banho de álcool etílico-água em congelador a -10°C , por 3 minutos.

Em seguida adicionaram-se 3ml de HCl concentrado e colocando-se novamente no banho a -10°C . Adicionou-se, a seguir, em cada tubo 1 ml de solução de ferricianeto de potássio 1,67%, homogeneizando bem.

Após 30 minutos completou-se o volume dos tubos com água destilada e leu-se a seguir em espectrofotômetro Bausch-Lomb Spectronic 20 no comprimento de onda de 525nm.

As reações envolvidas na determinação de ureídeos totais (alantoína + ácido alantóico) estão indicadas na figura 11.

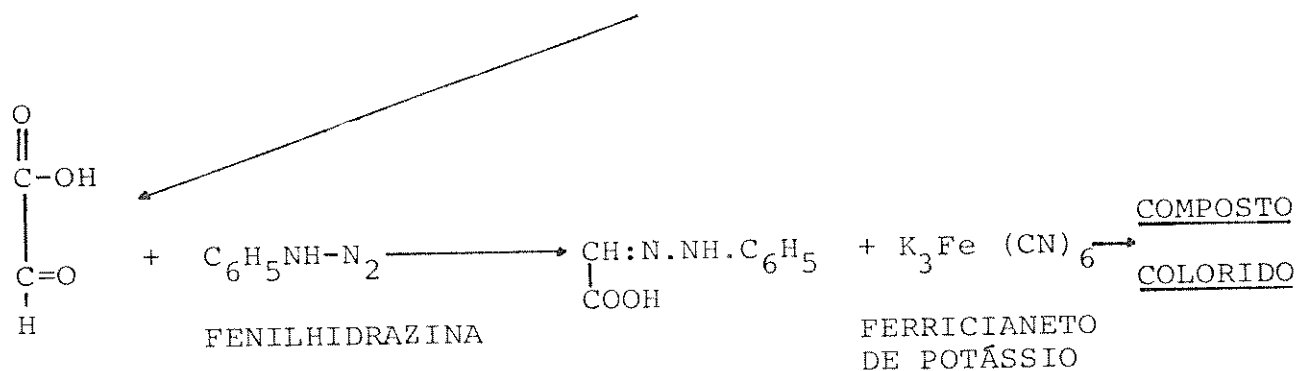
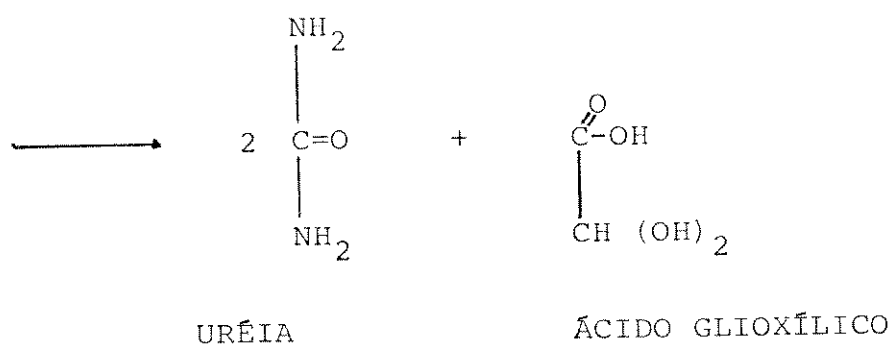
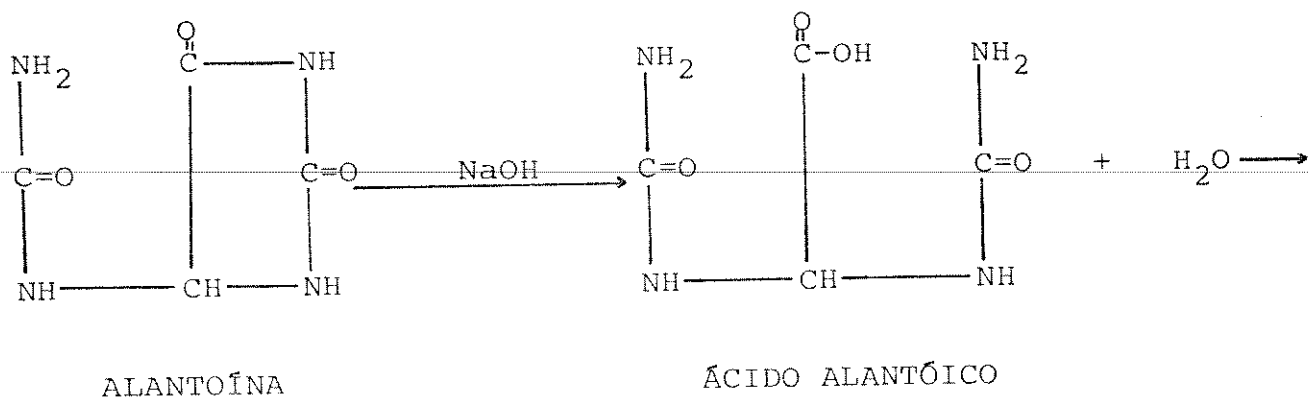


Figura 11. Reações envolvidas na determinação de ureídeos, conforme YOUNG & CONWAY (1942)

3.4.6.2 ÁCIDO ALANTÓICO

Para análise do teor de ácido alantóico em pedúnculos, vagens e grãos utilizou-se a mesma marcha analítica descrita em 3.4.6.1, porém sem o tratamento inicial de extrato com NaOH 0,5N, que é utilizado para transformação por hidrólise de alantoína em ácido alantóico. Dessa forma pode-se avaliar o teor de ácido alantóico nas amostras.

3.4.6.3 ALANTOÍNA

O teor de alantoína foi avaliado por diferença entre os teores de ureídeos totais (3.4.6.1) e ácido alantóico (3.4.6.2).

3.4.7 ANÁLISES DE AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos livres presentes nos extratos de pedúnculos, vagens e grãos, como obtido em 3.3.2.1 foram analisados quantitativa e qualitativamente através de análise em analisador de aminoácidos Hitachi-Perkin-Elmer modelo KLA-3B que utiliza o princípio descrito por SPACKMAN *et al* (1958), porém, com resina e tampões para troca com ligantes (PERKIN-ELMER, 1969 e 1971), utilizando zinco como metal complexante de aminoácidos. Injetou-se cerca de 20/ μ g de N de cada extrato e amostra.

Foi determinada, também, a composição dos grãos em aminoácidos proteicos, utilizando hidrólise das amostras em tubo de cultura sob atmosfera de nitrogênio gasoso por 20 horas a 105-110°C em estufa com circulação de ar forçada.

da, na presença de HCl 6N. Após hidrólise filtrou-se e evaporou-se o ácido, lavando-se com álcool etílico 75% (BLACKBURN, 1968) e finalmente levantando os aminoácidos em tampão de acetato pH 3,1, para posterior avaliação da composição em analisador de aminoácidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ACÚMULO DE MATÉRIA SECA, ÓLEO, ÁCIDOS GRAXOS, PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE SOJA

O desenvolvimento de frutos de soja, assim como de muitos frutos, resulta dos seguintes eventos principais: entrada de compostos translocados através do floema, recebimento de água e solutos conduzidos pelo xilema como resultado da transpiração e fixação pelo fruto de CO_2 proveniente da atmosfera ou do espaço gasoso decorrente da respiração das sementes, conforme PATE *et al* (1977).

O crescimento dos frutos verifica-se em três fases distintas, a primeira com a expansão das vagens e crescimento pequeno das sementes, a segunda onde além do crescimento da vagem há rápido crescimento das sementes e a terceira quando há deposição com intensidade maior de compostos de reserva nas sementes e inicia-se a desidratação do fruto, como pode-se verificar nas Tabelas 2 a 9 e figuras 12 a 17.

Porém, em função do ano agrícola as fases de crescimento tiveram duração diferentes. Assim, no ano de 1978/79 que apresentou maior precipitação pluviométrica e menor temperatura média durante o desenvolvimento dos frutos, esse foi mais lento que no ano agrícola de 1979/80.

A tabela 2 e figura 12, apresentam a quantidade de matéria verde por órgão, fruto, vagem e grão, durante o desenvolvimento dos frutos nos dois anos agrícolas estudados. Por esses dados vê-se que no ano de 1978/79, o maior valor acumulado de matéria verde de fruto e vagem ocorreu aos 58 dias após a floração (DAF) e o grão aos 65 DAF. Para o ano de 1979/80, isso ocorreu aos 43 DAF para fruto, vagem e grãos.

As tabelas 3 e 4 e figura 13, mostram os teores e a quantidade de água determinada por órgão durante o período de desenvolvimento do fruto nos dois anos agrícolas. Esses dados revelam que a partir de 65 DAF e 49 DAF, para 1978/79 e 1979/80, respectivamente, os frutos, vagens e grãos começaram a sofrer desidratação atingindo nessa fase também a sua maturação fisiológica, com apresentação de amarelecimento de vagens e grãos, que é um dos critérios utilizados por MARCOS FILHO (1980) para identificação da maturação fisiológica de soja.

Pelas tabelas 5 e 6 e figura 14, são apresentados os teores e quantidade de matéria seca por órgão em frutos, vagens e grãos. Para o ano de 1978/79, o cultivar Santa Rosa apresentou uma taxa inicial de acúmulo de matéria seca no grão de 2,28mg/dia entre 22 e 44 DAF, tendo essa taxa no

Tabela 2 - Quantidade de matéria fresca por órgão, fruto, vagem e grão, durante o desenvolvimento dos frutos de soja, cv. Santa Rosa, nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80.

DAF	Fruto	Vagem	Grão
mg/órgão			
<u>Ano Agrícola 1978/79</u>			
15	167,90	-	-
22	340,20	253,90	17,90
29	454,40	339,80	81,90
36	552,30	368,50	99,90
44	692,20	372,40	184,50
52	1010,50	445,30	286,20
58	1165,00	422,50	367,80
65	1104,20	376,80	404,90
74	496,10	142,70	208,00
81	533,50	184,80	228,20
85	369,50	118,90	195,60
94	521,30	137,90	224,40
<u>Ano Agrícola 1979/80</u>			
15	278,43	348,88	16,82
22	494,38	372,68	76,12
29	722,40	372,15	147,21
36	875,72	308,72	242,25
43	1251,45	442,11	347,78
49	1127,60	278,45	314,83
57	477,32	113,65	157,32
64	447,66	116,46	153,62

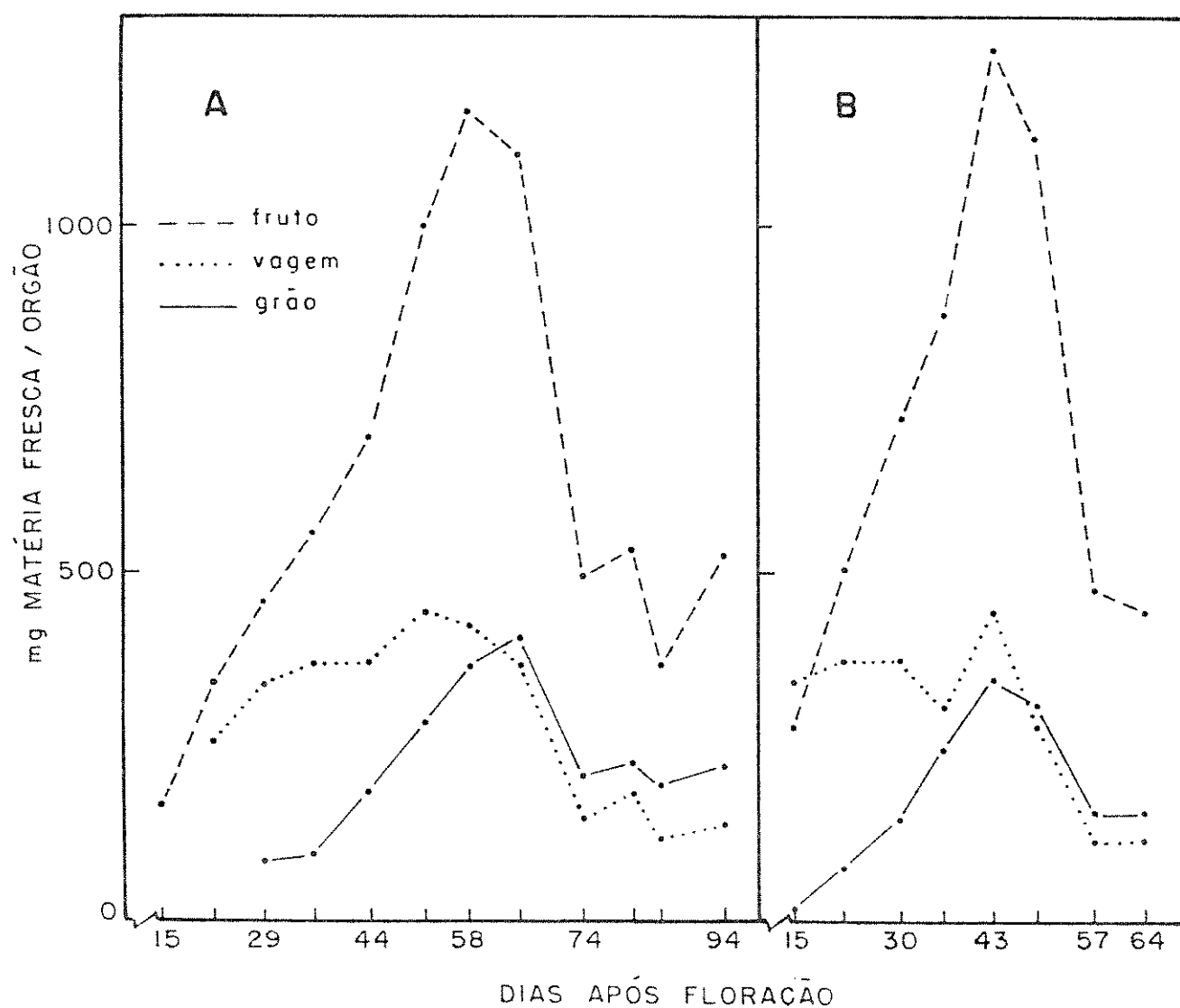


Figura 12. Quantidade de matéria fresca por órgão, fruto, vagem e grão durante o desenvolvimento dos frutos de soja cv Santa Rosa nos anos agrícolas de 1978/79 (A) e 1979/80 (B).

Tabela 3 - Teor de água em frutos, vagens e grãos de soja cv Santa Rosa, durante o período de desenvolvimento dos frutos nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80

DAF	Fruto	Vagem	Grão
%			
<u>Ano Agrícola 1978/79</u>			
15	83,14	-	-
22	82,42	82,46	84,75
29	79,79	78,12	81,71
36	80,61	76,57	71,35
44	70,55	68,83	71,37
52	68,64	76,47	61,50
58	66,90	69,78	63,48
65	63,59	69,80	55,48
74	31,62	31,32	28,18
81	6,40	15,92	9,09
85	11,59	4,58	7,40
94	8,62	8,27	8,26
<u>Ano Agrícola 1979/80</u>			
15	80,50	92,52	84,18
22	74,80	74,89	77,02
29	73,90	75,09	71,63
36	67,45	70,99	65,71
43	62,73	72,65	58,53
49	59,25	58,60	53,40
57	13,54	14,25	12,69
64	8,92	8,11	8,50

Tabela 4 - Quantidade de água por órgão, vagem, fruto e grão, durante o desenvolvimento dos frutos de soja cv. Santa Rosa nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80.

DAF	Fruto	Vagem	Grão
mg água/órgão			
<u>Ano Agrícola 1978/79</u>			
15	139,60	-	-
22	280,40	209,40	15,2
29	363,40	265,50	66,90
36	445,20	282,20	71,30
44	488,30	256,30	131,70
52	693,60	340,50	176,00
58	779,40	294,80	233,50
65	702,20	263,00	224,60
74	156,90	44,70	58,60
81	34,10	29,40	20,70
85	42,80	5,40	14,50
94	44,90	11,40	18,50
<u>Ano Agrícola 1979/80</u>			
15	224,17	323,76	14,16
22	374,77	279,12	58,63
29	523,91	279,45	105,45
36	580,70	218,90	159,19
43	794,99	321,21	203,53
49	668,09	163,17	168,13
57	64,64	16,18	19,96
64	39,94	9,44	13,08

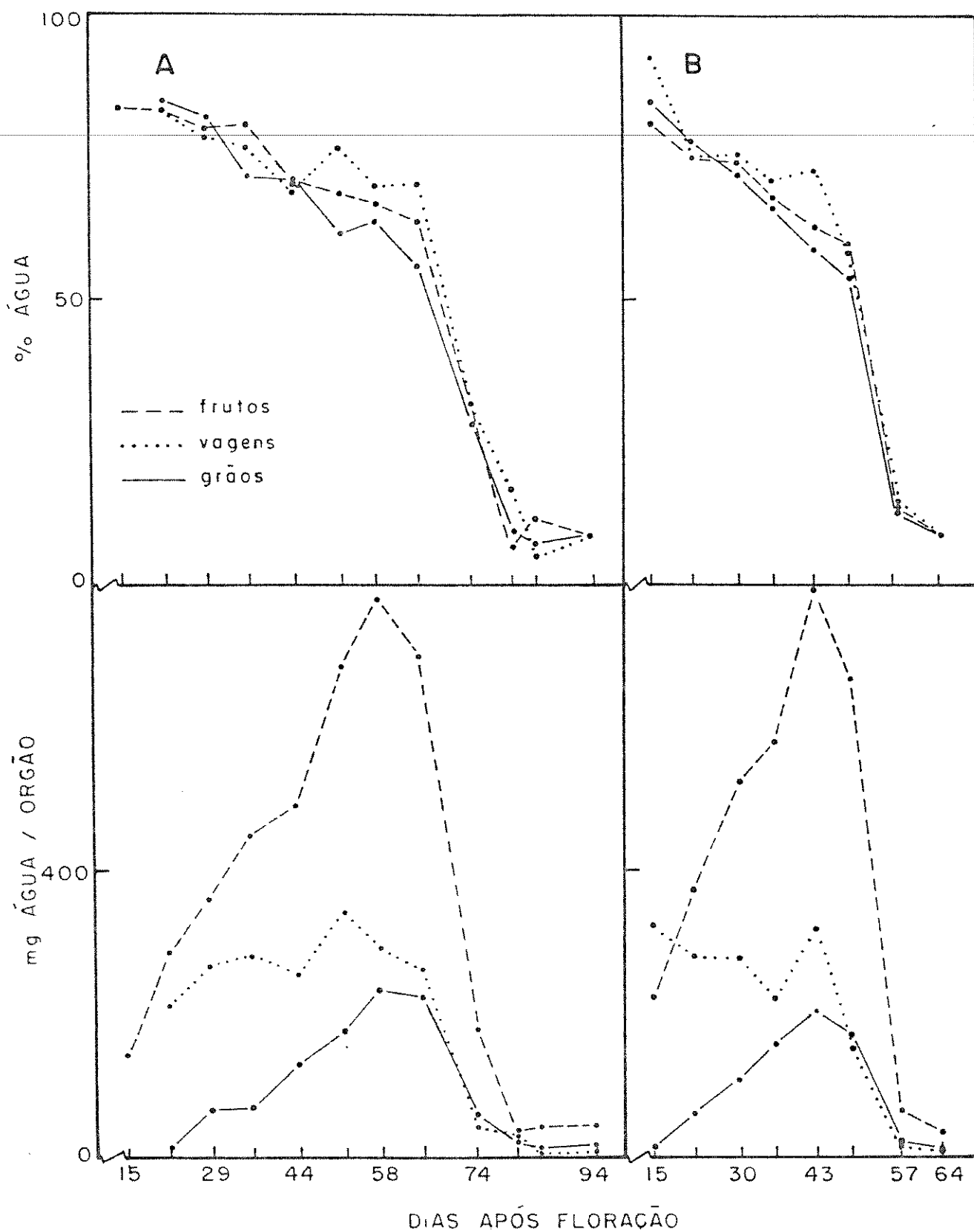


Figura 13. Quantidade de água em frutos, vagens e grãos de soja cv Santa Rosa, durante o período de desenvolvimento dos frutos nos anos agrícolas de 1978/79 (A) e 1979/80 (B).

Tabela 5 - Teor de matéria seca em frutos, vagens e grãos de soja cv. Santa Rosa, durante o período de desenvolvimento dos frutos nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80.

DAF	Fruto	Vagem	Grão
		%	
<u>Ano Agrícola 1978/79</u>			
15	16,86	-	-
22	17,58	17,54	15,25
29	20,03	21,88	18,29
36	19,39	23,43	28,65
44	29,45	31,17	28,63
52	31,36	23,53	38,50
58	33,10	30,22	36,52
65	36,41	30,20	44,52
74	68,38	68,68	71,82
81	93,60	84,08	90,91
85	88,41	95,42	92,60
94	91,38	91,73	91,74
<u>Ano Agrícola 1979/80</u>			
15	19,50	7,49	15,82
22	25,19	25,11	22,98
29	26,09	24,91	28,37
36	32,55	29,09	34,29
43	37,27	27,35	41,47
49	40,75	41,40	46,59
57	86,46	85,75	87,31
64	91,08	91,89	91,50

Tabela 6 - Quantidade em matéria seca por órgão, fruto, vagem e grão, durante o desenvolvimento dos frutos de soja cv. Santa Rosa, nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80.

DAF	Fruto	Vagem	Grão
mg/órgão			
<u>Ano Agrícola 1978/79</u>			
15	28,30	-	-
22	59,80	44,50	2,70
29	91,00	74,30	15,00
36	107,10	86,30	28,60
44	203,90	116,10	52,80
52	316,90	104,80	110,20
58	385,60	127,70	134,30
65	402,00	113,80	180,30
74	339,20	98,00	149,40
81	499,40	155,40	207,50
85	326,70	113,50	181,10
94	476,40	126,50	205,90
<u>Ano Agrícola 1979/80</u>			
15	54,26	25,12	2,66
22	119,61	93,56	17,49
29	198,49	92,70	41,76
36	295,02	89,82	83,06
43	456,46	120,90	144,25
49	459,51	115,28	146,70
57	412,68	97,47	137,36
64	407,72	107,72	140,54

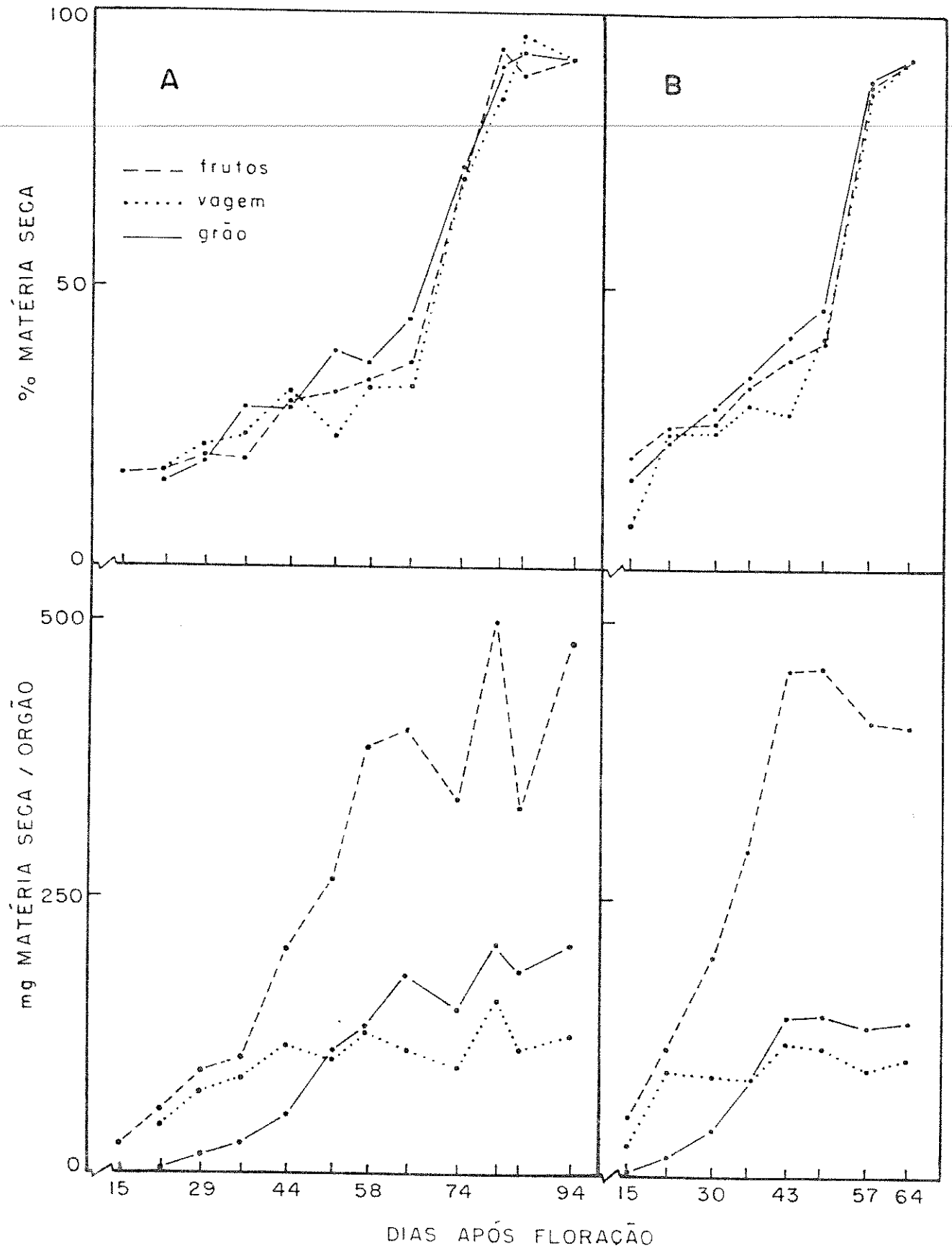


Figura 14. Quantidade de matéria seca por órgão, fruto, vagem e grão, durante o desenvolvimento dos frutos de soja cv Santa Rosa, nos anos agrícolas de 1978/79 (A) e 1979/80 (B).

período subsequente de 44 a 65 DAF, sido de 6,07 mg/dia, o que representa um aumento substancial de acúmulo, atingindo o maior acúmulo de matéria seca aos 81 DAF com 207,5 mg/grão, a taxa no período de 65 a 81 DAF foi de somente 1,70 mg/dia.

No fruto, no período de 22 a 44 DAF a taxa de acúmulo de matéria seca foi de 6,55 mg/dia, no período de 44 a 65 DAF de 9,43 mg/dia e no período de 65 a 81 DAF de 6,09 mg/dia, atingindo 499,40 mg/fruto, maior acúmulo de matéria seca, aos 81 DAF. Os frutos de soja neste ano apresentaram em média dois grãos.

No ano de 1979/80, Tabela 5 e 6 e Figura 14, o cultivar Santa Rosa apresentou no período de 15 a 29 DAF uma taxa de acúmulo de matéria seca de 2,79 mg/dia e no período de 29 a 43 DAF esta taxa foi de 7,32 mg/dia, dos 43 aos 49 DAF de 0,41 mg/dia, apresentando um acúmulo de matéria seca menor que em 1978/79, sendo a maturação fisiológica do grão aos 49 DAF e o peso de 146,70 mg/grão.

No fruto, período de 15 a 29 DAF, a taxa de acúmulo de matéria seca foi de 10,30 mg/dia, de 29 a 43 DAF esta taxa foi de 18,43 mg/dia e dos 43 aos 49 DAF de 0,51 mg/dia, atingindo aos 49 DAF, o maior acúmulo de matéria seca com 459,51 mg/fruto. O menor acúmulo de matéria seca em 1979/80 pode ser devido às condições climáticas do ano, onde a temperatura média diária foi maior e o total de precipitação foi menor quando comparados a 1978/79. Isso porque segundo HOWELL & CARTTER (1958) em condições de maior temperatura pode ocorrer perda de peso da semente pela maior conversão de açúcares a óleo e do aumento da respiração. Pois na fase de acúmulo

de componentes do grão, esses autores verificaram em soja alto quociente respiratório assim como alta taxa de assimilação de oxigênio, revelando a conversão de açúcares a compostos com menor número de átomos de oxigênio por átomo de carbono, como por exemplo óleo. Além disso, pode ter havido uma condição menos favorável de translocação de compostos da planta para o fruto, pois como verificou WENT (1956) para plantas de tomate, há uma correlação inversa entre temperaturas acima de 20°C e translocação, mostrando que temperaturas mais elevadas não são tão boas como as menores para translocação de compostos para as sementes.

As Tabelas 7, 8 e 9 e as Figuras 15, 16 e 17, apresentam os resultados referentes à composição química dos grãos durante o desenvolvimento dos frutos nos dois anos agrícolas estudados.

Os dados referentes a proteína foram obtidos pela multiplicação do teor de nitrogênio total por 6,25, embora sabidamente no início do desenvolvimento dos grãos há alto teor de nitrogênio não proteico (KROBER & GIBBONS, 1962).

Pelas Tabelas 7 e 9 e Figura 15, vê-se que a quantidade acumulada de proteína nos grãos foi maior naqueles desenvolvidos durante o ano de 1978/79. Para o acúmulo de óleo verificou-se que o teor final dos grãos praticamente não variou nos dois anos de estudo. Em 1978/79, o acúmulo de óleo nos grãos se deu mais lentamente, atingindo o maior valor aos 81 daf com 21,77% de óleo, ao contrário, em 1979/80 verificou-se alta taxa de acúmulo de óleo nos grãos, que atingiu o

Tabela 7 - Variação da composição química durante o desenvolvimento de grãos de soja cv. Santa Rosa, nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80.

DAF	Proteína ⁽¹⁾	Óleo	Açúcares solúveis	Polissacarídeos
% / ms				
<u>Ano Agrícola 1978/79</u>				
15	-	-	-	-
22	52,06	-	-	-
29	45,82	11,16	3,76	25,62
36	23,11	12,43	5,64	24,08
44	31,22	14,33	3,99	26,29
52	36,52	15,79	6,03	21,50
58	42,77	15,88	6,33	21,20
65	40,43	16,89	11,38	17,59
74	49,94	19,77	17,86	13,14
81	41,46	21,77	19,00	12,90
85	41,24	20,64	20,47	14,79
94	42,85	21,13	20,12	14,06
<u>Ano Agrícola 1979/80</u>				
15	43,37	3,67	9,16	32,57
22	42,69	9,94	8,67	35,82
30	37,00	14,89	8,01	20,60
36	37,19	21,95	10,26	25,00
43	33,06	22,64	18,29	25,24
49	39,06	21,92	19,94	20,84
57	40,62	22,31	20,23	20,51
64	41,31	21,55	19,02	19,69

(¹) Nitrogênio total x 6,25

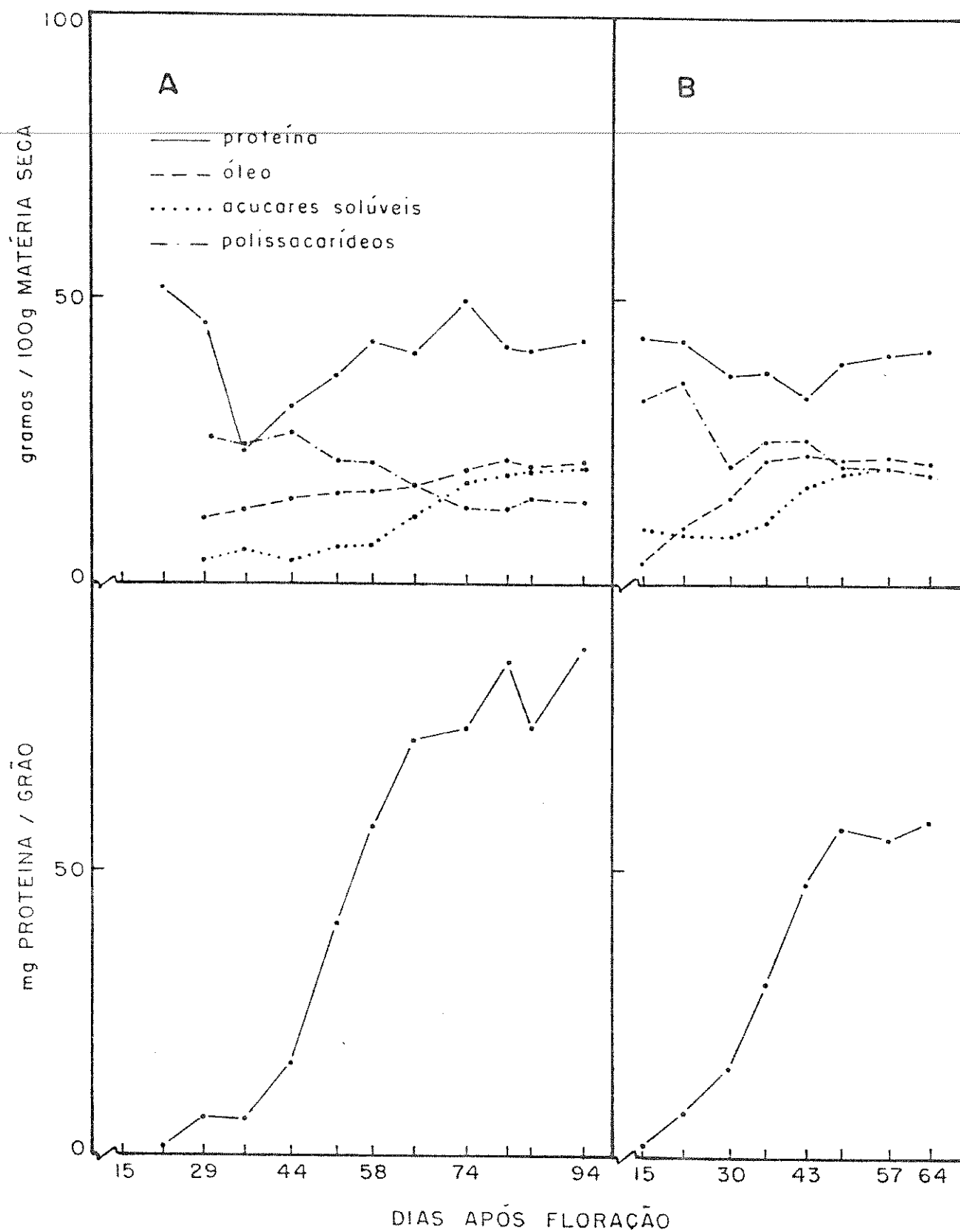


Figura 15. Variação na composição química e acúmulo de proteína (%N.6,25) por grão durante o desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa nos anos agrícolas de 1978/79 (A) e 1979/80 (B).

valor máximo de 22,64% aos 43 DAF (Tabelas 7 e 8, Figura 17).

A temperatura média observada no período de desenvolvimento dos grãos nos dois anos estudados mostrou que 1979/80 ocorreram temperaturas mais altas que em 1978/79, porém não suficientes para esclarecer as diferenças ocorridas no período de acúmulo de óleo pelos grãos. No período aproximado de 20 a 40 dias antes da maturação dos grãos é que se verificaram os maiores acréscimos no teor de óleo, e é exatamente nesse período onde pode-se perceber melhor a ação das condições climáticas influenciando o acúmulo daquele componente.

As condições climáticas de 1979/80, Figuras 8 e 9, mostraram menor intensidade de chuvas, (50,8mm de altura) e maior temperatura média (25°C) do que as observadas em 1978/79 que foram de 152,0mm e 22,2°C, respectivamente. A curva de acúmulo de óleo em 1979/80 mostra que a velocidade de acúmulo foi muito intensa, indicando que temperaturas mais elevadas e menor precipitação pluviométrica são capazes de aumentar a velocidade de deposição de óleo nas sementes em desenvolvimento quando ocorrem no período de aproximadamente 20 a 40 dias antes da maturação. Esse fato também foi verificado por HOWELL & CARTTER (1953), que revelaram que grãos de soja colhidos no período de 4 a 6 semanas antes da maturação apresentaram alto quociente respiratório (taxa de CO₂ eliminado para O₂ consumido) e alta assimilação de oxigênio, que coincidem com a máxima intensidade de síntese de óleo. Esses autores, encontraram no período citado alta correlação entre o teor de óleo nos grãos e temperatura, indicando que o efeito primário da temperatura é sobre o estabelecimento do sistema

Tabela 8 - Quantidade de proteína, óleo, açúcares solúveis e polissacarídeos por grão de soja cv Santa Rosa durante o desenvolvimento dos frutos, nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80.

DAF	Proteína ⁽¹⁾	Óleo	Açúcares solúveis	Polissacarídeos
mg/grão				
<u>Ano Agrícola 1978/79</u>				
15	-	-	-	-
22	1,40	-	-	-
29	6,87	1,67	0,56	3,84
36	6,60	3,55	1,61	6,88
44	16,48	7,56	2,10	13,88
52	40,24	17,40	6,64	23,69
58	57,44	21,32	8,50	28,47
65	72,89	30,45	20,51	31,71
74	74,61	29,53	26,68	19,63
81	86,02	45,17	39,42	26,77
85	74,68	37,37	37,07	26,78
94	88,22	43,50	41,42	28,94
<u>Ano Agrícola 1979/80</u>				
15	1,15	0,09	0,24	0,86
22	7,46	1,73	1,51	6,26
30	15,45	6,21	3,34	8,60
36	30,89	18,23	8,52	20,76
43	47,68	32,65	26,38	36,40
49	57,30	32,15	29,25	30,57
57	55,79	30,64	27,78	28,17
64	58,05	30,28	26,73	27,67

(¹) Nitrogênio total . 6,25.

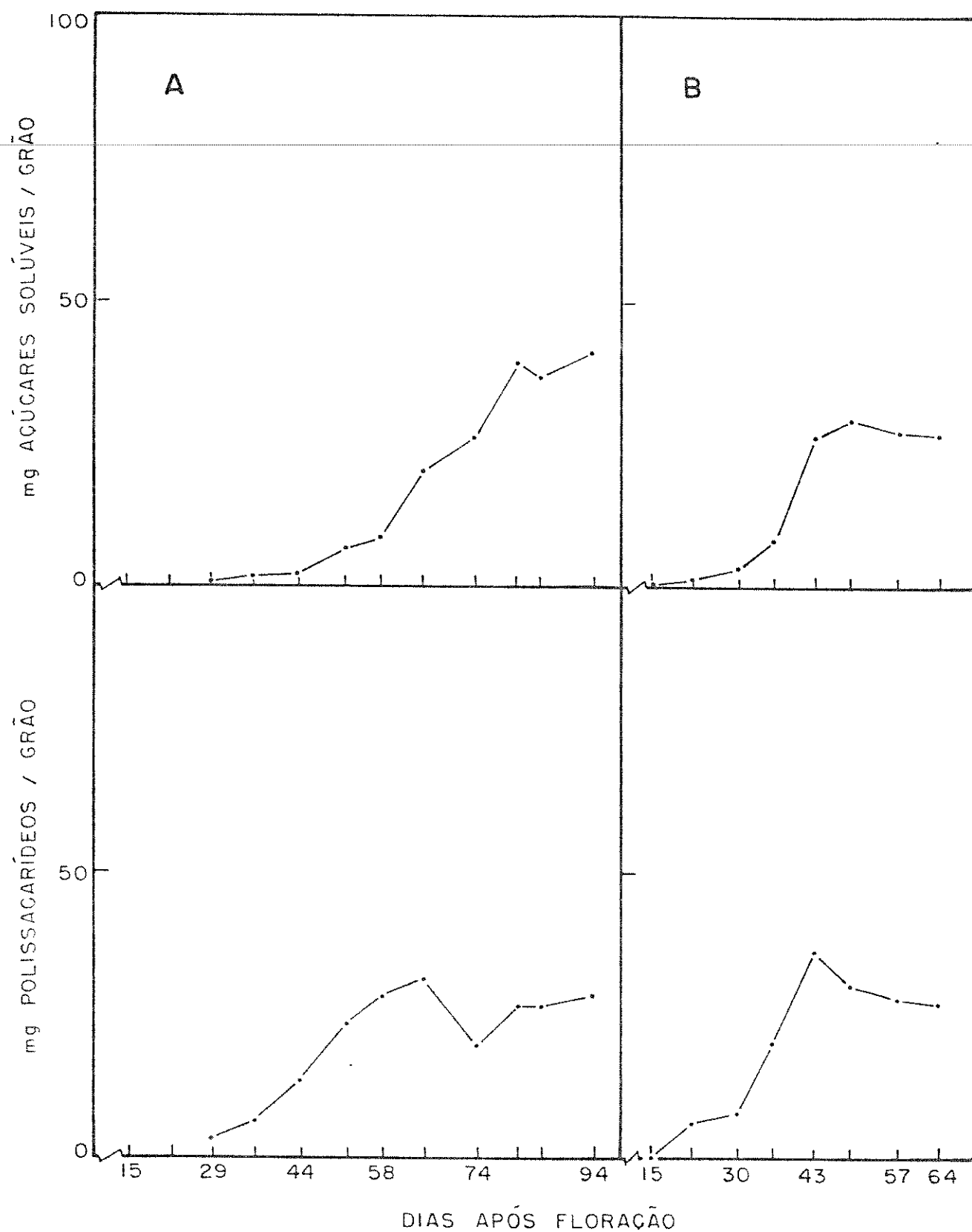


Figura 16. Quantidade de açúcares solúveis e polissacarídeos acumulada por grão durante o desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa nos anos agrícolas de 1978/79 (A) e 1979/80 (B).

metabólico para conversão de açúcares a óleo. SALLANS (1964) também mostrou que baixa precipitação e temperaturas altas, levou a menor produtividade obtendo-se grãos com relação diferente de proteína e óleo.

Durante o desenvolvimento dos frutos de soja cv Santa Rosa nos dois anos agrícolas foram verificadas também alterações na composição do óleo como pode ser verificado na Tabela 9 e Figura 17.

Independente do ano de cultivo, verificou-se decréscimo nos teores de ácidos graxos palmítico, esteárico, oleico e linolênico e aumento do teor de ácido linoleico no óleo. O ácido linoleico apresentou correlação positiva com o teor de óleo nos grãos, sendo os coeficientes de 0,80 e 0,98 para os anos de 1978/79 e 1979/80 respectivamente, significativos a nível de 1% pelo teste t. Os resultados mostram, também, que o teor total de ácidos graxos saturados, palmítico e esteárico, diminuiu durante o período de desenvolvimento do grão, enquanto o de insaturados, oleico, linoleico e linolênico aumentou, provocando correlação negativa entre o teor de óleo e o de ácidos graxos saturados. Esses dados podem ser evidência da síntese de ácidos graxos insaturados a partir dos correspondentes saturados, como sugerem DUTTON & MOUNTS (1966), INKPEN & QUACKENBUSH (1969) e RUBEL *et al* (1972).

Pela Tabela 9, observa-se ainda que no ano de 1978/79 os teores dos ácidos linoleico e linolênico foram superiores e o oleico inferior aos encontrados para o óleo extraído de grãos obtidos em 1979/80. Esses dados provavelmente são resultantes da influência da maior precipitação pluviou

Tabela 9 - Variação na composição do óleo durante o desenvolvimento de grãos de soja cv Santa Rosa, nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80

DAF	% Ácidos graxos/óleo						Total	
	Mirístico	Palmitico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolênico	Saturado	Insaturado
<u>Ano Agrícola 1978/79</u>								
29	0,07	14,73	4,22	15,77	52,81	12,41	19,02	80,98
36	0,23	12,81	3,62	24,74	49,46	9,14	16,66	83,34
44	0,31	12,87	4,37	24,98	48,81	8,66	17,55	85,45
52	0,47	10,64	3,42	21,94	56,11	7,42	14,53	85,47
58	0,36	10,65	3,84	22,86	55,26	7,06	14,85	85,15
65	0,21	11,76	3,52	21,69	56,90	5,91	15,49	85,51
74	0,47	10,84	3,62	22,11	56,21	6,74	14,93	85,07
81	0,28	9,42	2,90	19,75	61,46	6,19	12,60	87,40
85	0,23	10,63	3,23	19,46	58,58	7,67	14,09	85,39
94	0,41	10,78	3,42	22,51	56,04	6,84	14,61	85,39
<u>Ano Agrícola 1979/80</u>								
15	2,02	26,14	9,74	13,19	28,81	20,10	37,90	62,10
22	1,01	20,47	5,68	31,54	34,71	6,60	27,16	72,84
30	0,14	14,04	3,92	28,66	46,30	6,94	18,10	81,90
36	0,15	12,70	3,79	27,79	50,45	5,11	16,64	83,36
43	0,05	12,04	3,37	26,44	52,52	5,58	15,46	84,54
49	0,08	12,02	3,42	24,47	54,01	6,01	15,52	84,48
57	0,44	10,93	3,54	25,04	53,92	6,12	14,91	85,09
64	0,07	11,30	3,59	25,27	53,81	5,96	14,96	85,04

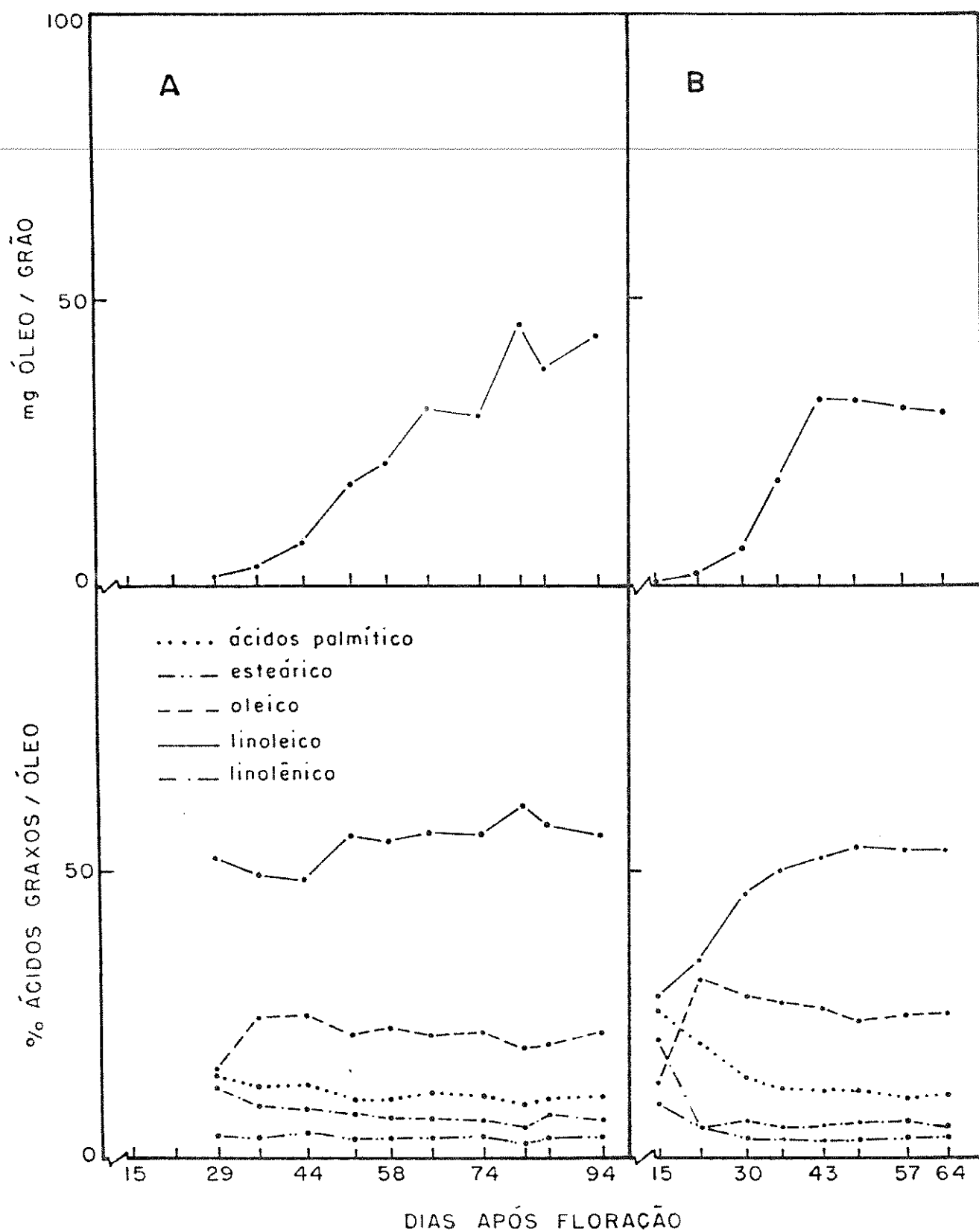


Figura 17. Quantidade de óleo acumulada por grão e variação na composição do óleo durante o desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa nos anos agrícolas de 1978/79 (A) e 1979/80 (B).

métrica que ocorreu no primeiro ano de estudo, já que segundo CHU & SHELDON (1979) quando plantas de soja foram cultivadas em solo irrigado verificou-se sempre aumento dos ácidos linoleico e linolênico e decréscimo de oleico.

As Tabelas 7 e 8 e a Figura 16 apresentam dados referentes ao teor de carboidratos nos grãos de soja durante o desenvolvimento dos frutos. Os açúcares solúveis determinados são principalmente compostos de sacarose, rafinose e estaquiose, que perfazem cerca de 99% dessa fração, conforme encontrado por HYMOWITZ *et al* (1972). A quantidade de açúcares solúveis por grão foi maior no material desenvolvido em 1978/79 do que no outro ano estudado.

Os polissacarídeos presentes em grãos de soja e que foram determinados constituem-se principalmente de polissacarídeos acídicos, arabinanas e arabinogalactanas (SMITH & CIRCLE, 1980), além de amido frequentemente detectado em grãos imaturos e que não está presente no grão após maturação (YAZDI-SAMADI *et al*, 1977). Assim como os outros componentes dos grãos de soja, os carboidratos também apresentaram diferentes curvas de acúmulo em função das condições do meio que diferiram nos dois anos agrícolas estudados.

4.2 ACÚMULO DE NITROGÊNIO TOTAL EM VAGENS E GRÃOS

A concentração de nitrogênio total em frutos e grãos praticamente não sofreu variações durante o período de desenvolvimento de frutos, embora haja diferença quando anos agrícolas são comparados, como mostram os dados apresentados

nas Tabelas 10 e 11. Por esses dados verifica-se que nas paredes dos frutos, vagens, a concentração de nitrogênio sofre drástica redução na maturação (Tabela 11), evidenciando a translocação de compostos nitrogenados para os grãos.

Pelo exame das Tabelas 10 e 11 vê-se que embora mais lentamente, os grãos de plantas cultivadas em 1978/79 acumularam maior quantidade de nitrogênio, 14,11mg N/grão, enquanto os provenientes de plantas desenvolvidas em 1979/80 atingiram a 9,29mg N/grão.

Analisando os dados da Tabela 11, pode-se verificar que a partir da 4a. semana de desenvolvimento do fruto (30 DAF) as vagens deixam de acumular nitrogênio carreando este para os grãos. Na maturação apenas 17,09% de nitrogênio acumulado permanece nas vagens, ou seja, 82,91% translocou-se para os grãos. Portanto, para o cultivar Santa Rosa, ano 1979/80, o fruto supriu a 14,16% das necessidades em nitrogênio dos grãos. A partir dos dados obtidos representaram-se, Figura 18, os fluxos de nitrogênio para o fruto e grãos e da vagem para os grãos. Estes dados são semelhantes aos encontrados por PATE *et al* (1977) quando estudaram *Lupinus albus*.

O fornecimento de nitrogênio para os grãos a partir de vagens se dá pela mobilização de compostos solúveis armazenados e hidrólise de proteínas desse órgão. A quantidade de nitrogênio total solúvel por órgão, vagem e grão, durante o período de desenvolvimento de frutos é apresentada na Tabela 10. Esses resultados evidenciam que a partir da 5a. semana (36 DAF) os grãos passam a apresentar mais nitrogênio solúvel, passando a ser a região de consumo preferencial em rela-

Tabela 10 - Quantidade de nitrogênio total acumulada em grãos e nitrogênio solúvel ($\mu\text{g}/\text{Órgão}$) em vagens e grãos durante o período de desenvolvimento dos frutos, ano agrícola 1978/79.

DAF	Nitrogênio total		Nitrogênio solúvel	
	% N/m.s.	mg N/grão	Vagem	Grão
			—µg N—	
22	8,32	0,23	457,02	46,54
29	7,33	1,10	747,56	65,52
36	3,70	1,06	700,15	159,84
44	4,99	2,64	782,04	202,95
52	5,84	6,44	623,42	228,96
58	6,84	9,19	507,00	257,46
65	6,47	11,66	37,68	242,94
74	7,99	11,94	28,54	124,80
81	6,63	13,76	36,96	91,28
85	6,60	11,95	11,89	136,92
94	6,86	14,11	41,37	134,64

Tabela 11 - Quantidade de nitrogênio total na matéria seca e por órgão, fruto, vagem e grãos de um fruto, durante o desenvolvimento de frutos de soja 'Santa Rosa', ano agrícola 1979/80.

DAF	Fruto		Vagem		Grão	
	% N/m.s.	mg.N (¹)	% N/m.s.	mg.N (¹)	% N/m.s.	mg.N (^{1, 2})
15	4,00	2,17	-	1,80	6,94	0,37
22	3,68	4,40	3,44	3,21	6,83	2,39
30	3,81	7,56	3,22	2,98	5,92	4,94
36	4,13	12,18	2,27	2,04	5,95	9,88
43	4,68	21,36	1,16	1,40	5,29	15,26
49	4,84	22,24	1,01	1,16	6,25	18,34
57	4,95	20,43	0,96	0,94	6,50	17,86
64	4,63	18,88	0,52	0,56	6,61	18,58

(¹) mg N/Órgão

(²) dois grãos (grãos de um fruto)

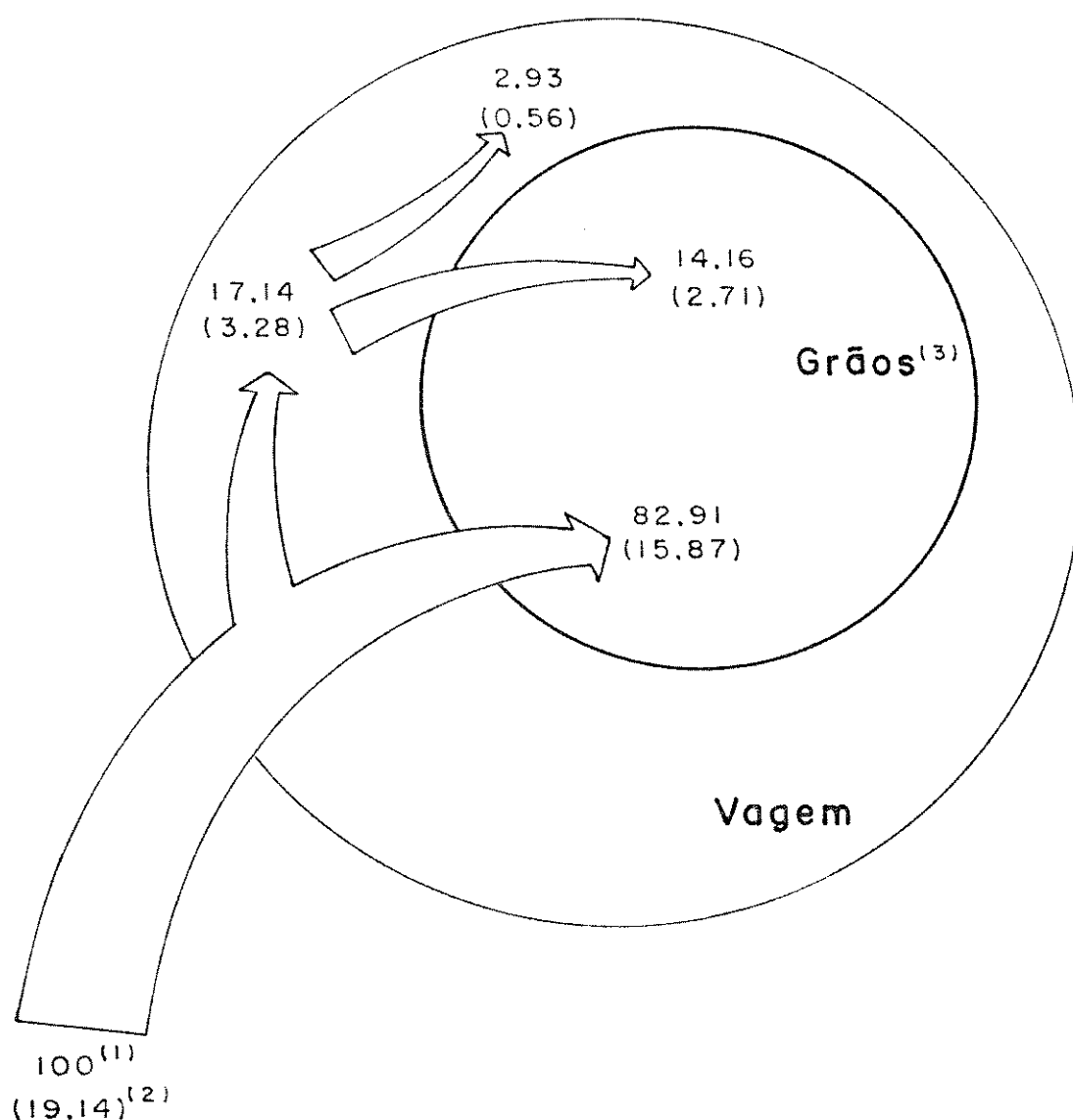


Figura 18. Fluxos de nitrogênio da planta para a vagem e grãos e da vagem para os grãos durante o desenvolvimento de frutos de soja, ano agrícola 1979/80.

(¹) distribuição percentual do nitrogênio recebido pelo fruto.

(²) mg N nas partes do fruto.

(³) consideram-se dois grãos por fruto.

ção à vagem que tem diminuída a quantidade de nitrogênio solúvel, este representado por aminoácidos e ureídeos.

A partir dos resultados obtidos para soja cv Santa Rosa, neste estudo, verifica-se que 85,84% das necessidades de nitrogênio dos grãos provêm diretamente de outras partes da planta, principalmente folhas, não se acumulando nas vagens, embora circulasse por esse órgão. Atribui-se às folhas esse papel desde que as folhas e as paredes das vagens são as principais fontes de redistribuição de nitrogênio das partes vegetativas para as reprodutivas de plantas de soja como verificado por EGLI *et al* (1978).

Comparando os dados de nitrogênio total em mg N/grão com os de nitrogênio solúvel em μ g/grão (Tabela 10) vê-se que nas primeiras semanas de desenvolvimento do fruto, os grãos apresentaram relativamente alta quantidade de compostos nitrogenados não proteicos, o que diminui principalmente a partir da 7a. semana (52 DAF) em 1978/79, quando deve-se intensificar a deposição de substâncias de reserva (PATE *et al*, 1977), proteínas. Aos 22 DAF o nitrogênio solúvel correspondeu a 22,24% do nitrogênio total dos grãos, decrescendo rapidamente até valor 0,95% aos 94 DAF. Também para grãos de soja, KROBER & GIBBONS (1962), BILS & HOWELL (1963) e RUBEL (1970) verificaram a mesma tendência encontrada neste trabalho.

4.3 FRAÇÕES PROTEICAS NOS COTILÉDONES DE GRÃOS DE SOJA

Na Tabela 12 são apresentados os dados da distribuição de nitrogênio em frações proteicas isoladas durante o

Tabela 12 - Quantidade de nitrogênio por fração proteica e resíduo na matéria fresca e seca de grãos durante o desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa, 1978/79.

DAF	Frações proteicas										Extração ⁽³⁾ %			
	I (1)		II		III		Resíduo		N Total					
	N/mf %	N/ms %	Extração ⁽²⁾ %	N/mf %	N/ms %	Extração %	N/mf %	N/ms %	%/mf	%/ms				
29	0,18	0,98	22,22	0,52	2,84	64,19	0,11	0,60	13,58	0,37	2,02	1,34	7,33	72,39
52	0,44	1,14	28,75	0,97	2,52	63,39	0,12	0,31	7,84	0,42	1,09	2,25	5,84	81,33
74	0,97	1,35	21,46	3,06	4,26	67,69	0,49	0,68	10,84	0,43	0,60	5,74	7,99	92,51
94	0,75	0,82	16,89	3,27	3,56	73,64	0,42	0,46	9,45	0,71	0,77	6,29	6,86	88,71

(1) Frações proteicas: I - Solúvel após diálise; II - precipitada em pH 4,7;

III - solúvel em pH 4,7

(2) % do total de nitrogênio em cada época.

(3) % do nitrogênio extraído em cada época

desenvolvimento de grãos de soja. Verifica-se que no início de desenvolvimento (29 DAF) a eficiência de extração de proteína em tampão fosfato, pH 7,6, foi menor, 72,39%, do que em grãos com 94 DAF, 88,71%. Provavelmente, isso ocorre como reflexo da maior quantidade de proteína organelar não extraível em células jovens como também considerou HILL & BREIDENBACH (1974b). As proteínas precipitadas em pH 4,7, fração II, predominam durante o desenvolvimento dos grãos, 63,39 a 73,64%; seguidas das solúveis após diálise do extrato proteico bruto, fração I, 16,89 a 28,75%; e as solúveis em pH 4,7, fração III, foram as menores, 7,84 a 13,58%. Houve uma tendência das frações proteicas I e III diminuírem com a maturação dos grãos, quando se verifica a distribuição porcentual das frações, enquanto a fração II teve sua participação sempre crescente atingindo a 73,64% do nitrogênio totalizado pelas três frações avaliadas. Esse valor é semelhante ao valor obtido por FUKUSHIMA (1969), 77,5%, que utilizou a precipitação isoelétrica a pH 4,5 para separar as proteínas de grãos de soja. Esse autor também encontrou que 8,75% das proteínas permaneciam solúveis a esse pH, o que também é semelhante ao que se verificou no presente trabalho, 9,45%.

As frações III e II distintas pela características de solubilizar ou não a pH 4,7, seriam do tipo vicilina (DERBYSHIRE *et al*, 1976), 7 S α , β glicinina (THANH & SHIBASAKI, 1976) ou γ , β -conglucina (CATSIMPOOLAS, 1969) e do tipo legumina, 11 S glicinina ou glicinina (CATSIMPOOLAS, 1969; DERBYSHIRE *et al*, 1976; THANH & SHIBASAKI, 1976), respectivamente, descritas para soja ou sementes de outras leguminosas. Neste

estudo, porém, preferiu-se não dar nomes particulares a essas frações, já que não se determinou a pureza das mesmas. Por outro lado, a nomenclatura para proteínas de soja apresenta grande dificuldade de ser aplicada, pois como considerou WOLF (1980) falta um sistema de aceitação geral.

HILL & BREIDENBACH (1974b) verificaram que nos estágios iniciais de desenvolvimento de grãos de soja predominava a fração proteica 2,2 S que decrescia através da maturação, sendo as frações 7,5 S e 11,8 S sintetizadas mais tardiamente. Entre essas não se detectou diferença no início de síntese, ao contrário do verificado entre as proteínas componentes da fração 7 S. Há de se considerar, entretanto, que as frações 7 S e 11 S encontradas no início do desenvolvimento dos grãos não são as mesmas, embora com coeficiente de sedimentação igual, presentes nos grãos nos estágios finais da maturação (OCHIAI-YANAGI *et al*, 1978), já que apresentam características imunoeletroforéticas diferentes.

Os dados obtidos, Tabela 13, não mostraram diferença no início de síntese e acúmulo entre as frações isoladas. Porém, aos 29 DAF a fração II já predominava, crescendo em taxa elevada até 52 DAF quando a síntese e acúmulo se intensificaram e assim permanecendo até 74 DAF. A fração I teve taxa de síntese e acúmulo praticamente inalterada entre 29 e 74 DAF sendo mais elevada que a fração III. Esta apresentou acúmulo mais intenso entre 52 e 74 DAF.

Quando se verificam os dados revelados em 4.1, Tabela 8 e Figura 15, vê-se que o período principal de acúmulo de proteína nos grãos foi de 44 a 65 DAF, o que se aproxima

Tabela 13 - Quantidade de nitrogênio nas frações proteicas por grão (mg N/fração proteica.grão) de soja 'Santa Rosa', 1978/79.

DAF	mg N nas frações proteicas ^(1,2)			Resíduo	N Total
	I	II	III	mg N	mg
29	0,15	0,43	0,09	0,30	1,10
52	1,26	2,78	0,34	1,20	6,44
74	2,02	6,36	1,02	0,89	11,94
94	1,68	7,34	0,94	1,59	14,12

(¹) Frações proteicas: I - Solúvel após diálise;

II - Precipitado em pH 4,7;

III - Solúvel em pH 4,7.

(²) mg nitrogênio por grão em cada fração proteica e resíduo.

do verificado para a principal fração proteica isolada, fração II, e do obtido para soja cv Santa Rosa por SILVA *et al* (1981).

As diferentes taxas de deposição das diversas proteínas em grãos de soja durante o período de maturação provocam variação quantitativa nos aminoácidos aí presentes, como verificaram DERBYSHIRE *et al* (1976), YAZDI-SAMADI *et al* (1977), WOLF (1980) e SMITH & CIRCLE (1980), até a composição final observada em grãos maduros. Na Tabela 14 é apresentada a composição em aminoácidos de grãos de soja com 94 DAF, ou seja no final do período de maturação para o ensaio realizado em 1978/79. De maneira geral os dados são concordantes com os relatados por SGARBIERI (1980) para o mesmo cultivar e por SMITH & CIRCLE (1980) para outros cultivares. Como na maioria das leguminosas o teor de lisina é elevado, o que é de grande importância na complementação de proteínas de cereais, normalmente pobres nesse aminoácido (SGARBIERI, 1980).

Comparando-se os teores dos aminoácidos essenciais presentes nas proteínas de grãos de soja com os de proteína de ovo tomada como padrão (SMITH & CIRCLE, 1980) verifica-se que os aminoácidos limitantes do valor biológico daquelas proteínas são os sulfurados, metionina e cistina, que apresentam teores baixos. A metionina é limitante por ser essencial, enquanto a cistina embora não essencial, é de importância na alimentação animal por sua síntese se dar a partir de metionina, tornando-a mais escassa (CARELLI *et al*, 1981).

Tabela 14 - Composição em aminoácidos de grãos maduros de soja cv Santa Rosa.

Aminoácidos	mg aminoácido/16mg N
Lisina (¹)	6,54
Histidina	2,72
Arginina	9,61
Ácido aspártico	11,33
Treonina (¹)	4,06
Serina	5,57
Ácido glutâmico	18,08
Prolina	4,20
Glicina	4,21
Alanina	4,18
Cistina (²)	0,79
Valina (¹)	5,33
Metionina (^{1,2})	1,29
Isoleucina (¹)	4,74
Leucina (¹)	6,67
Tirosina	3,35
Fenilalanina (¹)	4,45
Amônia	2,61

(¹) Aminoácido essencial

(²) Aminoácido que sofre perda por oxidação durante hidrólise ácida.

4.4 COMPOSIÇÃO DA FRAÇÃO NITROGÊNIO SOLÚVEL EM PEDÚNCULO, VAGENS E GRAOS

A translocação de compostos nitrogenados da planta para os frutos se dá através do xilema e floema, este contribuindo com cerca de 90% do nitrogênio que chega às sementes (PATE *et al*, 1977). Durante os estágios iniciais de desenvolvimento do fruto há acúmulo de nitrogênio nas vagens desde que ocorre excesso em relação às necessidades para a produção de matéria seca no fruto. Porém, essas reservas são rapidamente metabolizadas e utilizadas tão logo o grão inicie o processo de deposição de proteínas de reserva. Na Tabela 15, são apresentadas as quantidades de nitrogênio total solúvel por órgão durante o desenvolvimento de frutos de soja.

Pode-se verificar que no pedúnculo há maior quantidade de N até 29 DAF, indicando transferência mais elevada de nitrogênio para os frutos nas primeiras semanas após o florescimento, decrescendo então até 52 DAF e mais intensamente a partir de então até a maturação do fruto. Deve-se ressaltar que nas últimas semanas, após 81 DAF, o nitrogênio verificado nos pedúnculos não corresponde a compostos sendo translocados pois os grãos se encontram após processo de desidratação não mais incorporando matéria seca (Tabelas 3, 5) e mesmo o sistema de translocação dessas partes da planta já deveria estar comprometido.

Na vagem o acúmulo de N solúvel atinge os maiores valores no período de 29 a 44 DAF, decrescendo a partir de então. A mobilização de compostos aminados das vagens é

Tabela 15 - Quantidade de nitrogênio total solúvel ($\mu\text{g}/\text{órgão}$) em pedúnculo, vagens e grãos durante o período de desenvolvimento dos frutos, 1978/79.

DAF	Pedúnculo	Vagem	Grão
	$\mu\text{g N}$		
22	117,00	457,02	46,54
29	142,14	747,56	65,52
36	40,70	700,15	159,84
44	55,51	782,04	202,95
52	66,77	643,42	228,96
58	21,24	507,00	257,46
65	26,19	37,68	242,94
74	20,24	28,54	124,80
81	23,20	36,96	91,28
85	13,80	11,89	136,92
94	17,76	41,37	134,64

verificada principalmente entre 52 e 65 DAF (Tabela 15) que é o período principal de deposição de proteínas de reserva (Tabelas 10 e 13). Nos grãos a quantidade de nitrogênio solúvel atingiu seu maior valor aos 58 DAF, sendo entre 44 a 65 DAF o período em que mais N solúvel estava presente. Portanto, o acúmulo de nitrogênio nos grãos iniciou-se após cessar o das vagens, à semelhança do verificado por MATSUMOTO *et al* (1977a) em soja e OLIKER *et al* (1978) em feijão. A variação na quantidade de nitrogênio solúvel nessas partes da planta, pedúnculo, vagem e grãos, durante o desenvolvimento dos frutos está representada, também, através da Figura 19.

Para plantas de soja, o nitrogênio solúvel presente nos pedúnculos é composto de aminoácidos e ureídeos (MATSUMOTO *et al* 1977a, 1977b; STREETER, 1979), nas vagens há predominância de ureídeos (FUJIHARA *et al*, 1977; MATSUMOTO *et al* 1977b; HERRIDGE *et al*, 1978; STREETER, 1979) e nos grãos, de aminoácidos (MIFLIN & LEA, 1976; STREETER, 1979; THOMAS & SCHRADER, 1981).

4.4.1 AMINOÁCIDOS

Na Tabela 16 são apresentados os vários aminoácidos livres presentes no pedúnculo e portanto sendo translocados para os frutos. A amida asparagina é predominante desde que em média representa 60%, base molar, dos aminoácidos livres detectados (Figura 20). Por esses dados verifica-se que asparagina tem participação aumentada após 52 DAF chegando a representar aproximadamente 80% dos aminoácidos aos 74 DAF. Essa amida é o principal transportador de nitrogênio em legu-

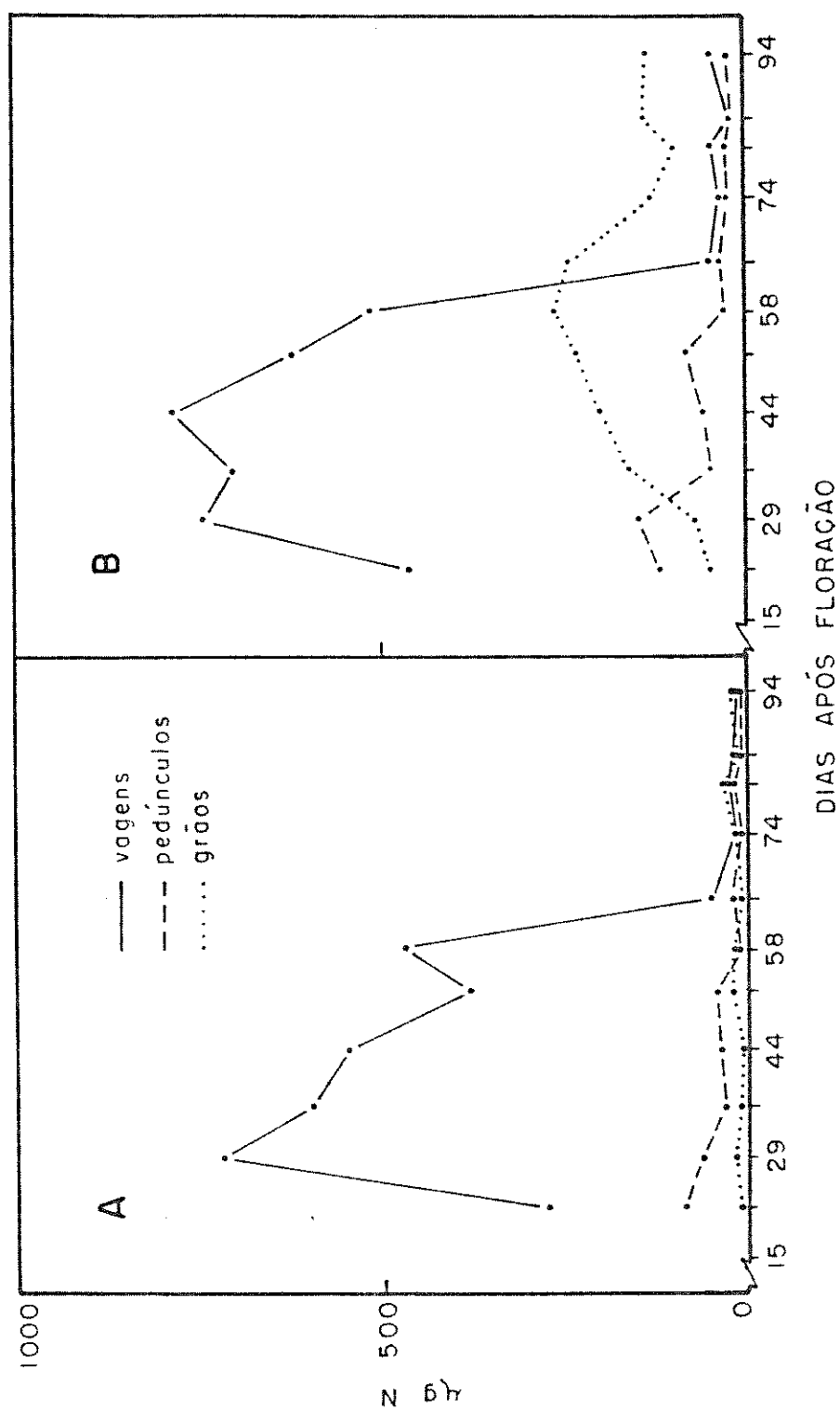


Figura 19. Variação na quantidade de nitrogênio de ureídeos (A) e nitrogênio solúvel de pedúnculos, vagens e grãos durante o desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa.

Tabela 16 - Composição em aminoácidos livres e amônia (mol %) da fração nitrogênio solúvel de pedúnculos durante o desenvolvimento de frutos de soja.

Aminoácidos ⁽¹⁾	Dias após o florescimento (DAF)							
	22	29	36	44	52	58	65	74
Lys	0,55	0,30	0,34	0,10	-(²)	-	-	-
His	10,97	5,21	5,23	14,24	10,57	10,61	5,22	2,88
NH ₃	12,50	7,96	4,29	11,76	11,34	10,21	11,84	11,43
Asp	-	11,89	12,29	7,30	11,13	4,00	2,30	-
Thr	6,21	4,00	11,20	-	-	8,51	9,61	-
Ser	9,69	2,63	3,12	1,15	2,64	1,85	0,46	0,44
Glu	-	2,14	1,12	0,89	0,72	1,01	-	-
Gly	-	0,22	0,73	0,45	-	0,24	0,42	1,08
Ala	-	2,80	4,41	2,09	1,68	5,59	8,57	3,15
Val	-	2,00	2,28	1,15	1,85	0,88	-	0,08
Ile	1,20	2,91	0,34	1,76	-	-	-	0,50
Leu	0,81	0,29	0,39	0,49	-	-	-	0,46
Tyr	0,52	0,35	0,28	0,07	-	-	-	-
Phe	0,69	0,60	2,22	0,31	-	-	-	-
Asn	56,42	56,33	51,55	57,34	59,87	56,88	61,58	79,98
Gln	0,44	0,37	0,30	0,56	0,20	-	-	-

(¹) Utilizam-se para os aminoácidos abreviaturas segundo PATE *et al* (1975).

(²) Ausência do composto nas amostras analisadas.

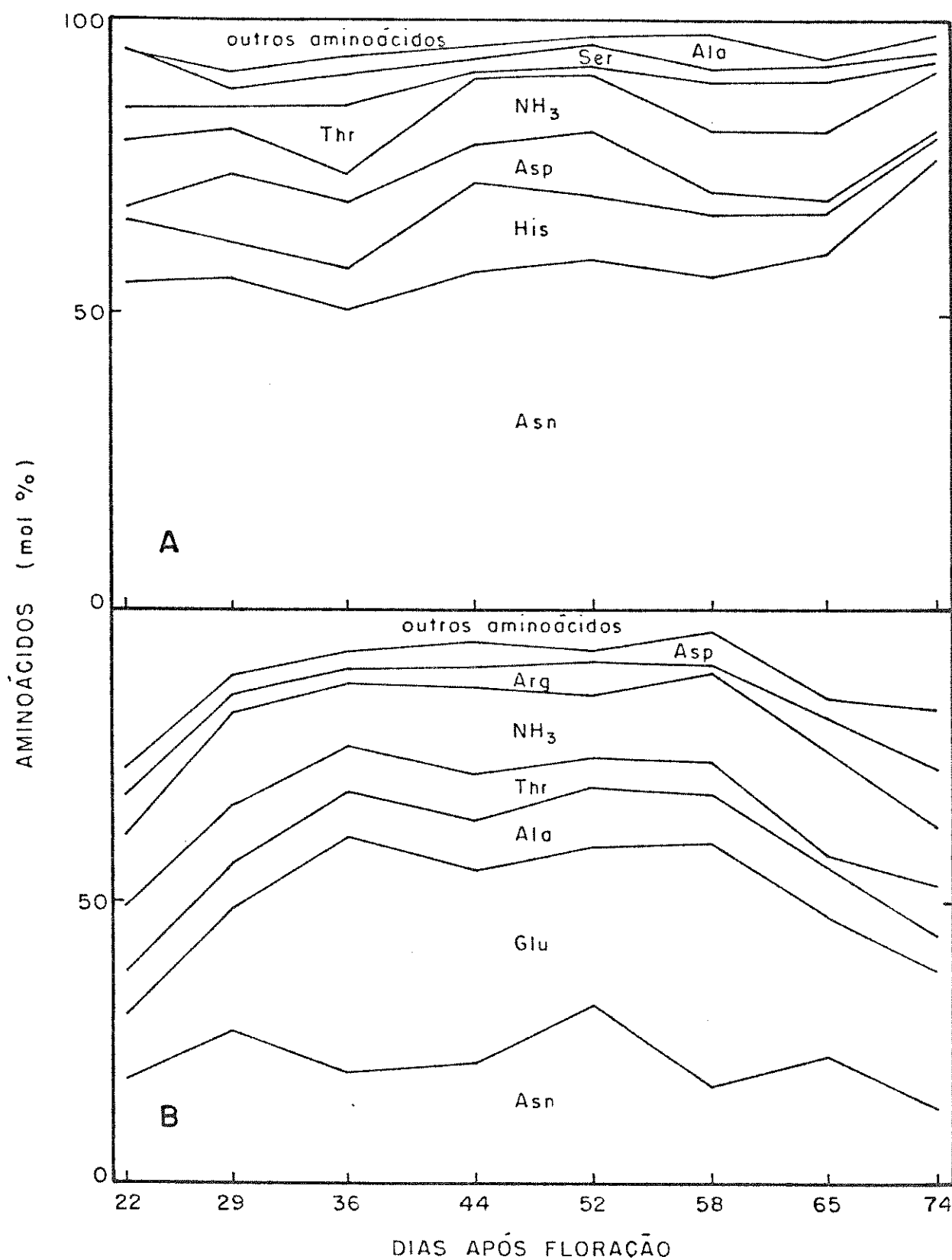


Figura 20. Variação na composição em aminoácidos e amônia da fração nitrogênio solúvel em pedúnculos (A) e grãos (B) durante o desenvolvimento dos frutos. A concentração de cada aminoácido é representada pela área entre curvas.

minosas que fixam nitrogênio biologicamente e não produzem ureídeos. Entretanto, nas que há predominância de ureídeos, essa amida ainda assim é o principal composto dentre os aminoácidos como evidenciado neste trabalho e nos de PATE *et al* (1969), STREETER (1972a) e SCOTT *et al* (1978).

Dos aminoácidos translocados, presentes no pedúnculo, deve-se destacar a participação relativamente elevada de histidina (Tabela 16, Figura 20), o que não tem sido relatado para outras leguminosas. Essa presença mais significativa poderia decorrer do fato da biossíntese de histidina estar estreitamente relacionada com o metabolismo de purinas. Havendo em ambos os caminhos biossintéticos a participação de PRPP (ribosilpirofosfato-5-fosfato) e também no da histidina haver formação de precursor de purinas através de rompimento do anel purínico da ATP (trifosfato de adenosina) que é participante da biossíntese desse aminoácido (COHEN, 1967; DAVIES *et al*, 1969; LENINGHER, 1976). A razão proposta é suportada pela elevação da biossíntese de purinas nos nódulos (MATSUMOTO *et al* 1977a, 1977b) durante o enchimento de grãos de soja, que degradadas dão origem a alantoína e ácido alantóico, os principais transportadores de nitrogênio nestas plantas durante o estágio reprodutivo.

Os outros aminoácidos principais foram ácido aspártico, treonina, serina e alanina que representaram em média e base molar, 23% dos aminoácidos translocados para os frutos (Tabela 16, Figura 19).

Nos grãos o nitrogênio solúvel é composto principalmente por aminoácidos livres (90%). A composição da fra-

ção aminoácidos livre é apresentada na Tabela 17 e Figura 20. Esses dados mostram ácido glutâmico (27%), asparagina (20%) , alanina (8%), treonina (7%), arginina e histidina (5,5%), áci do aspártico (4%) como os principais aminoácidos livres presentes nos grãos durante o desenvolvimento de frutos de soja. Os valores percentuais indicados são médias do período de 22 a 74 DAF.

A composição em aminoácidos encontrada nos grãos resulta da ampla metabolização de ureídeos e aminoácidos translocados para esses órgãos, como refletida na tabela 14.

Em relação aos aminoácidos translocados (Figura 20) há diminuição do teor de asparagina, histidina, ácido aspártico e serina, elevação do teor de ácido glutâmico e alanina, síntese de novos aminoácidos como arginina não presente dentre os translocados (Tabelas 16 e 17).

Como verificou PATE (1980) a síntese de arginina resulta a redistribuição de nitrogênio principalmente a partir de amidas. Em grãos de soja, portanto, de asparagina. Ácido glutâmico e alanina são importantes participantes nas interconversões entre aminoácidos antes de serem incorporados às proteínas de reserva (BIDWELL *et al*, 1964; MIFLIN & LEA, 1976; BAUER *et al*, 1977a, 1977b), o que é compatível com o aumento verificado para esses dois aminoácidos neste trabalho.

4.4.2 UREÍDEOS

Na Tabela 18 são apresentadas as quantidades de ureídeos e nitrogênio de ureídeos no sistema pedúnculo-fruto durante o desenvolvimento de frutos de soja.

Tabela 17 - Composição em aminoácidos livres e amônia (mol %) da fração nitrogênio solúvel de grãos durante o desenvolvimento de frutos de soja.

Aminoácidos ⁽¹⁾	Dias após o florescimento (DAF)							
	22	29	36	44	52	58	65	74
Lys	0,51	0,79	0,80	0,42	0,37	0,43	0,19	0,15
His	7,22	4,66	-(2)	-	-	-	7,07	3,18
NH ₃	10,70	15,87	11,09	15,42	10,54	16,41	16,74	10,58
Arg	8,36	2,77	3,31	4,64	5,89	1,70	7,22	9,97
Asp	4,31	2,94	2,51	3,43	1,68	5,34	2,59	11,18
Thr	11,76	10,73	6,43	6,96	4,30	4,31	1,44	7,92
Ser	3,74	1,54	2,75	2,32	1,38	2,67	1,53	1,21
Glu	9,09	21,06	40,89	33,20	26,61	41,67	23,55	23,57
Gly	2,44	0,66	2,56	1,82	1,24	0,57	0,53	0,72
Ala	6,90	6,35	8,51	8,48	10,78	8,29	9,07	5,13
Val	7,24	2,61	1,57	0,13	1,11	0,47	0,89	2,27
Ile	6,30	1,14	-	2,22	2,47	1,60	6,13	2,92
Leu	1,74	0,35	-	0,22	0,56	0,53	1,41	2,08
Tyr	0,53	-	-	0,06	0,11	-	-	0,39
Phe	0,57	1,10	-	0,06	0,09	-	0,34	3,02
Asn	18,59	26,88	19,57	20,62	30,32	16,00	21,30	10,88
Gln	tr(3)	tr	tr	tr	2,54	-	-	-

(¹) Utilizam-se para os aminoácidos abreviaturas segundo PATE *et al* (1975)

(²) Ausência do composto nas amostras analisadas

(³) Traços.

Tabela 18 - Quantidade de ureídeos e N-ureídeos em pedúnculo, vagem e grãos durante o desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa, 1978/79.

DAF	Pedúnculo			Vagem			Grão		
	$\mu\text{g}/100\text{mg}$	$\mu\text{g}/\text{Órgão}$	$\mu\text{g N}^{(1)}$	$\mu\text{g}/100\text{mg}$	$\mu\text{g}/\text{Órgão}$	$\mu\text{g N}$	$\mu\text{g}/100\text{mg}$	$\mu\text{g}/\text{Órgão}$	$\mu\text{g N}$
22	389,03	218,49	77,39	318,42	778,61	275,78	118,33	21,12	7,48
29	299,03	174,67	61,87	609,79	2.025,11	717,29	10,48	35,54	12,59
36	174,91	70,10	24,83	463,57	1.685,19	596,89	15,09	14,90	5,28
44	202,73	85,60	30,32	425,51	1.545,01	547,24	13,30	12,35	4,37
52	180,00	107,40	38,04	250,79	1.100,87	389,93	12,12	32,83	11,63
58	45,27	25,60	9,06	318,42	1.316,09	466,16	13,00	34,71	12,29
65	77,76	43,71	15,48	32,85	120,01	42,51	7,21	27,74	9,82
74	29,03	20,43	7,24	23,15	32,71	11,58	15,09	31,07	11,00
81	70,85	40,49	14,34	29,51	53,94	19,11	26,54	59,97	21,24
85	24,24	14,74	5,22	38,06	44,80	15,87	15,56	29,22	10,35
94	25,70	12,20	4,32	21,64	29,54	10,46	16,73	37,16	13,16

⁽¹⁾ μg de N-ureídeos/Órgão

Comparando-se as Tabelas 15 e 18 verifica-se que no pedúnculo o nitrogênio contido em ureídeos representava, em média, cerca de 53% do N total solúvel translocado. Na vagem o N-ureídeos acumulado consistiu, em média, de 72% do nitrogênio total solúvel e nos grãos representava aproximadamente 8%, para o período de 22 a 74 DAF (Figura 19).

Portanto, em concordância com o verificado por outros autores (MATSUMOTO *et al*, 1977a, 1977b; FUJIHARA & YAMAGUCHI, 1978; STREETER, 1979; REYNOLDS *et al*, 1982) em plantas de soja inoculadas com *Rhizobium* e portanto fixando N₂ atmosférico, os principais compostos translocados de nitrogênio são os ureídeos, alantoína e ácido alantóico, pelo menos quando os frutos estão se desenvolvendo (Tabela 18, Figura 19).

Nos pedúnculos o valor mais elevado de ureídeos ocorreu aos 22 DAF decrescendo a partir de então. Nas vagens o valor máximo de acúmulo de ureídeos ocorreu aos 29 DAF, decrescendo de maneira gradativa até 58 DAF e então mais fortemente até a maturação dos grãos. O decréscimo assinalado corresponde à translocação desses compostos para os grãos onde são metabolizados.

Na Tabela 19 são apresentadas as quantidades de ureídeos separadamente como alantoína e ácido alantóico em pedúnculos, vagens e grãos durante o desenvolvimento de frutos de soja.

Tomando como referência a média dos valores no período de 22 a 81 DAF, temos que o ácido alantóico correspondeu a 51,49 e 60% dos ureídeos totais presentes em pedúnculo,

Tabela 19 - Quantidade dos ureídeos ácido alantóico e alantóina em pedúnculo, vagem e grão durante o desenvolvimento de frutos de soja cv Santa Rosa, 1978/79.

DAF	Pedúnculo		Vagem		Grão				
	Ureídeos ⁽¹⁾ Ac.alantóico Alantoína		Ureídeos Ac.alantóico Alantoína		Ureídeos Ac.Alantóico Alantoína				
			µg/100mg						
22	389,03	159,50	229,53	318,42	125,44	192,98	118,33	21,88	96,45
36	174,91	69,21	105,70	463,57	195,37	268,20	15,09	13,59	1,50
52	180,00	93,60	86,40	250,79	164,83	85,96	12,02	10,61	1,51
65	77,76	38,97	38,79	32,85	14,48	18,37	7,21	4,10	3,11
81	70,85	53,12	17,73	29,51	16,06	13,45	26,54	12,40	14,14

⁽¹⁾ Ureídeos totais expressos como alantóina.

vagem e grãos, respectivamente. No pedúnculo até 36 DAF houve predominância de alantoína e a partir de então de ácido alantóico.

A enzima alantoinase responsável pela transformação de alantoína em ácido alantóico está presente e ativa em várias partes das plantas como folhas, caules, etc. (TAJIMA & YAMAMOTO, 1975; HERRIDGE *et al* , 1978; THOMAS *et al* , 1980; THOMAS & SCHRADER, 1981). Isto justifica os dados obtidos onde há ligeira predominância de ácido alantóico sobre alantoína no pedúnculo. STREETER (1979) mostrou a participação maior de alantoína (60:40) quando do transporte de nitrogênio para os frutos de soja, entretanto, THOMAS & SCHRADER (1981) e REYNOLDS *et al* (1982) mostraram ácido alantóico como o principal componente dos ureídeos totais transportados. Os dados da Tabela 18, no entanto, e de maneira geral refletem um equilíbrio entre esses dois compostos nos pedúnculos e frutos.

Os dados apresentados nas Tabelas 18 e 19 sugerem que os ureídeos, alantoína e ácido alantóico, recebidos pelos frutos acumulam-se nas vagens onde são transferidos para as sementes sem sofrerem transformações significativas. Isto é evidenciado pelo valor de ácido alantóico nas vagens, em média 49% dos ureídeos totais. Porém, a baixa concentração de ureídeos (8%) e a predominância de ácido alantóico (60% dos ureídeos) nos grãos refletem a rápida degradação de ureídeos recebidos a partir das vagens, o que também, tem sido relatado por outros autores (FUJIHARA *et al* , 1977; THOMAS & SCHRADER, 1981). Essa metabolização decorre inicialmente, da alta atividade de alantoinase nos grãos (FUJIHARA *et al* , 1977; HERRIDGE

et al, 1978), além da presença de alantoicase e urease que são responsáveis pela degradação de ácido alantóico a glioxilato e uréia e desta a amônia, respectivamente (THOMAS & SCHRADER, 1981). A amônia resultante é incorporada a ácidos orgânicos e aminoácidos e amidas que posteriormente farão parte de proteínas diretamente ou após outras transformações.

4.4.3 BALANÇO DE DISTRIBUIÇÃO DE COMPOSTOS AMINADOS EM FRUTOS DE SOJA

A partir dos dados apresentados nas Tabelas 15 a 19 e Figuras 19 e 20 foi possível avaliar a provável contribuição dos compostos envolvidos no transporte de nitrogênio para satisfazer as necessidades dos frutos e grãos de soja. Para tanto, foram utilizadas as médias de concentração de alantoína, ácido alantóico, asparagina, histidina e demais aminoácidos nos pedúnculos, vagens e grãos durante o período de 22 a 74 DAF.

Como resultado elaborou-se o esquema apresentado na Figura 21, onde são mostrados os fluxos de nitrogênio da planta para o fruto e grãos e da vagem para os grãos durante o seu desenvolvimento. Nesta figura são indicadas as fontes de nitrogênio e a participação relativa das mesmas para cada 100 unidades de nitrogênio recebidas pelos frutos.

Assim, 53% do nitrogênio solúvel recebido pelo fruto é proveniente de ureídeos, sendo 26% através de alantoína e 27% de ácido alantóico. Esses compostos acumulam-se nas vagens antes de serem transferidos gradativamente para os grãos. Essa translocação, cerca de 52% do nitrogênio solúvel

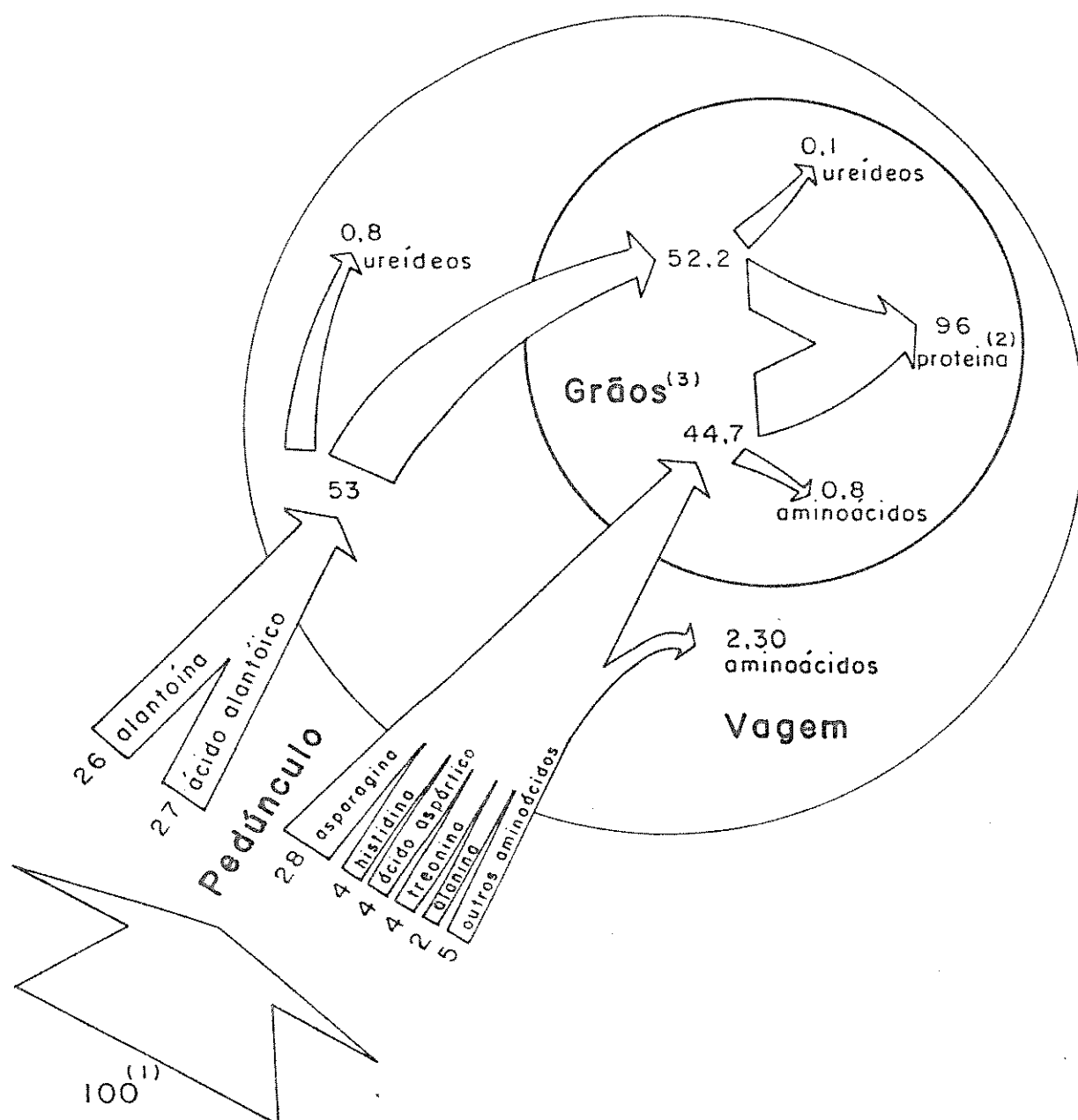


Figura 21. Fluxos de nitrogênio da planta para o fruto e grãos e da vagem para os grãos durante o desenvolvimento de frutos de soja, indicando a possível contribuição de cada composto envolvido no transporte de nitrogênio.

(1) Distribuição percentual do nitrogênio recebido pelo fruto.

(2) Substância predominante.

(3) Consideram-se dois grãos por fruto.

total, se dá principalmente no período em que os grãos intensificam a deposição de proteínas de reserva. Aproximadamente 0,8% do nitrogênio permanece nas vagens após maturação dos grãos como ureídeos.

O restante do nitrogênio, 47%, provém de vários aminoácidos, com destaque para a amida asparagina, 28%, histidina, ácido aspártico e treonina, 4% cada e alanina 2% do nitrogênio total recebido durante o desenvolvimento do fruto. Os aminoácidos são transportados diretamente para os grãos, conforme evidencia a baixa participação relativa dos mesmos no total de nitrogênio solúvel das vagens. Cerca de 2,3% de nitrogênio permanece como aminoácidos nas vagens após maturação dos grãos. No esquema apresentado na Figura 21 essa quantidade de N-aminoácidos é considerada como parte do fluxo de aminoácidos para os frutos, porém, poderia ser resultante de metabolização de ureídeos nas vagens desde que, embora menos efetivo, o sistema enzimático necessário para tanto está presente.

Esses valores indicam que asparagina, alantoína e ácido alantóico contribuem individualmente com quantidades semelhantes de nitrogênio, e juntos perfazem a 80% de todo o nitrogênio translocado para o fruto.

Nos grãos os ureídeos são degradados via alantoinase-alantoicase-urease liberando amônia que é incorporada a ácidos orgânicos e aminoácidos. Esses novos aminoácidos irão somar aos translocados diretamente para os grãos constituindo um total de 96% do nitrogênio transportado para os frutos, ficando prontamente ou após outras transformações disponíveis

para a síntese proteica. Na maturação dos grãos, 0,1 e 0,8% do nitrogênio recebido pelo fruto permanece como ureídeos e aminoácidos livres, respectivamente.

Embora resultante de interpretação de dados diferentes, nitrogênio total, o balanço da distribuição de nitrogênio nos frutos de soja apresentado na Figura 18 é concordante, de maneira geral, com o proposto nessa discussão (Figura 21).

5. DISCUSSÃO GERAL

Os dados apresentados revelam marcante influência das condições do meio, precipitação pluvial e temperatura que variaram nos dois anos do estudo, sobre o ritmo de desenvolvimento de frutos e grãos de soja como mostrado nas Figuras 12 a 14 e Tabelas 2 a 6 e por vários autores (COLLINS & HOWELL, 1957; COLLINS & SEDGWICK, 1959; MAINI & BAINS, 1965; TEIXEIRA *et al* 1979a, 1979b; TANGO *et al* 1974a, 1974b, 1974c, 1974d). Como reflexo dessa influência o peso seco final, médio, de grãos obtidos em 1978/79 foi 46,50% maior que os de 1979/80. Porém, a taxa de acúmulo de matéria seca em se considerando todo o período de enchimento dos grãos não diferiu, sendo de 2,19mg de matéria seca.dia⁻¹ para os dois anos agrícolas. No principal período de acúmulo de matéria seca nos grãos a taxa verificada foi de 6,07 e 7,32mg de matéria seca.dia⁻¹ para 1978/79, 44-65 DAF e 1979/80, 29-43 DAF, respectivamente. Nesses períodos de 21 e 14 dias foram acumulados , aproximadamente, 64, 53, 44 e 62% das substâncias de reserva

proteína, óleo, açúcares solúveis e polissarídeos para o ano de 1978/79 e 56, 87, 86 e 76% dessas substâncias, respectivamente, no ano de 1979/80. Esses dados evidenciam que o aumento na quantidade de matéria seca dos grãos nesse período é devido, em grande parte, ao acúmulo das principais substâncias de reserva, proteína e óleo, nos cotilédones, o que foi verificado também por BILS & HOWELL (1963), RUBEL *et al* (1972) e YAZDI-SAMADI *et al* (1977). Mesmo após o início da desidratação dos grãos prossegue a deposição de substâncias de reserva, Figuras 15 a 17 e Tabelas 7 e 9, à semelhança do relatado por RACKIS (1979).

A composição do óleo, sensível às condições do meio (SALLANS, 1964; CHU & SELDON, 1979; TEIXEIRA *et al* 1982), variou mostrando acréscimo de ácidos linoleico e linolênico e decréscimo de oleico associado a maior disponibilidade de água no ano agrícola de 1978/79, além de decréscimo de ácidos graxos saturados e consequente elevação dos insaturados durante o desenvolvimento dos grãos como reflexo da síntese destes a partir dos correspondentes saturados (DUTTON & MOUNTS, 1966; INKPEN & QUACKENBUSH, 1969 e RUBEL *et al*, 1972).

A síntese e deposição mais intensa de proteína, Tabelas 9, 11, 13 e 15, é representada pelo acúmulo principalmente de proteínas passíveis de precipitação a pH 4,7 (Fração II), que são do tipo legumina ou seja 11 S glicinina (CATSIM POOLAS, 1969; DERBYSHIRE *et al*, 1976; THANH & SHIBASAKI, 1976; FUKUSHIMA, 1969). Essa fração proteica representou, em média, 69% das proteínas de reserva, sendo detectada desde as fases iniciais do desenvolvimento dos grãos. No ano de

1978/79 os grãos apresentaram na maturação 66% a mais de nitrogênio total do que os obtidos em 1979/80. Estes resultados refletem a correlação positiva entre peso de grãos e conteúdo proteico verificado anteriormente (TEIXEIRA *et al*, 1982).

O nitrogênio necessário para a síntese proteica nos grãos é transferido a partir da planta na forma principalmente de alantoína, ácido alantóico e asparagina (Tabelas 15 a 19, Figuras 19 a 21). Esses compostos translocam-se diretamente para os grãos (asparagina) ou são acumulados inicialmente nas vagens (alantoína e ácido alantóico). Durante o período de enchimento dos grãos a participação relativa de ureídeos e aminoácidos na translocação de nitrogênio sofre alterações. Assim, verifica-se (Tabelas 15 a 17 e Figuras 19 e 20) tendência de aumento na participação de asparagina no translocado com conseqüente decréscimo, e de maneira acentuada, de ureídeos. Este decréscimo é devido em parte, à deficiência na translocação de carboidratos para os nódulos das plantas em razão da competição entre raízes e frutos (BÜLOW, 1978), o que provoca o declínio da atividade de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (NEYRA, 1978; PHILIPS, 1980) e portanto, da síntese de ureídeos a partir de nitrogênio recém-fixado (SCHUBERT, 1981).

Os teores médios de ureídeos e asparagina presentes em pedúnculo e grãos, Tabelas 16 a 18, sugerem que aproximadamente 67% da asparagina e 98% dos ureídeos recebidos pelos grãos são metabolizados dando origem a aminoácidos necessários para a síntese proteica. Essa ampla metaboliza-

ção de ureídeos e asparagina já tem sido relatada para soja e *Lupinus* (ATKINS *et al* 1975; FUJIHARA *et al*, 1977; THOMAS & SCHRADER, 1981).

As Figuras 18 e 21 sumarizam e sugerem a possível contribuição dos compostos aminados no transporte e redistribuição de nitrogênio no sistema fruto de plantas de soja, a partir dos dados obtidos para o cultivar Santa Rosa cultivada em condições de campo e inoculada com *Rhizobium japonicum* para assegurar a fixação biológica de nitrogênio atmosférico. Nestas representações destaca-se a alta eficiência de redistribuição de nitrogênio das vagens para os grãos, 83%, contribuindo para que aproximadamente 96% do nitrogênio recebido pelo fruto seja acumulado como proteína nos grãos, como também verificou PATE *et al* (1977) para *Lupinus*. Alantóina, ácido alantóico e asparagina transportam 80% do nitrogênio necessário ao desenvolvimento dos grãos, sendo portanto, os principais compostos transportadores de nitrogênio a partir de plantas de soja.

Do nitrogênio recebido pelo grão, neste estudo, ao menos 52,2% é resultante da fixação biológica de nitrogênio. Isto porque esse total refere-se a ureídeos que resultam da degradação de purinas (MATSUMOTO *et al* 1977a, 1977b; FUJIHARA *et al*, 1978) cuja síntese incorpora nitrogênio recém fixado (SCHUBERT, 1981).

6. CONCLUSÕES

As condições do meio exerceram influência significativa sobre o acúmulo e a composição da matéria seca de grãos de soja cv. Santa Rosa. Precipitação pluvial elevada e temperaturas médias menores estiveram associadas à maior deposição de matéria seca e proteína e à mais lenta de óleo nos grãos.

Os principais compostos translocadores de nitrogênio da planta para os frutos e grãos foram alantoína, ácido alantóico e asparagina, responsáveis por 80% do nitrogênio translocado. A vagem contribuiu com cerca de 15% enquanto as outras partes da planta contribuíram com 85% do nitrogênio acumulado nos grãos.

Os ureídeos, alantoína e ácido alantóico, acumularam-se nas vagens, reservatório temporário de nitrogênio, sendo gradativamente translocados para os grãos.

Nos grãos 98% dos ureídeos e 67% da asparagina foram metabolizados permitindo que 96% do nitrogênio translocado para os frutos fosse acumulado como proteínas nos grãos.

As principais proteínas de reserva foram do tipo legumina, com ponto isoelétrico em pH 4,7.

A fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico pela planta, através da síntese e translocação de ureídeos, foi responsável pelo menos por 52% do nitrogênio acumulado nos grãos.

7. RESUMO

A dinâmica de acúmulo de substâncias de reserva nos grãos e os compostos responsáveis pelo transporte de nitrogênio para os frutos de soja *Glycine max* (L.) Merrill 'Santa Rosa' em desenvolvimento foram avaliados em plantas cultivadas em campo de aumento no Centro Experimental de Campinas, Instituto Agrônômico, nos anos agrícolas de 1978/79 e 1979/80.

Coletaram-se semanalmente pedúnculos e frutos a partir de 15 dias após a floração (DAF) até a maturação dos grãos, determinando-se nesse material os teores de matéria seca, óleo, ácidos graxos, proteínas, carboidratos, ureídeos - alantoína e ácido alantóico - e aminoácidos livres.

Os resultados mostraram maior acúmulo de matéria seca, proteína e polissacarídeos no período de 44 a 65 DAF e de óleo entre 44 - 81 DAF para 1978/79 e de matéria seca, óleo, açúcares solúveis e polissacarídeos de 30 a 43 DAF e de proteína de 30 a 49 DAF em 1979/80. Houve influência positiva de temperatura e negativa da precipitação pluvial na

taxa de acúmulo de óleo nos grãos. Os ácidos graxos saturados, ao contrário dos insaturados, decresceram durante o desenvolvimento dos grãos.

Os principais compostos responsáveis pela translocação de nitrogênio das plantas de soja para os frutos foram os ureídeos. Estimou-se que esses compostos contribuem com 53% do nitrogênio translocado, 26% através de alantoína e 27% de ácido alantóico. Esses compostos são acumulados nas vagens antes de serem transportados e metabolizados nos grãos. Amidas e aminoácidos são responsáveis pelo transporte do restante do nitrogênio necessário ao desenvolvimento dos grãos, sendo 28% através de asparagina e 14% de histidina, ácido aspártico, treonina e alanina. Dessa forma, alantoína, ácido alantóico e asparagina são responsáveis por 80% do nitrogênio translocado para os frutos.

Nos grãos os aminoácidos livres resultantes da metabolização de ureídeos e aminoácidos translocados são constituídos principalmente por ácido glutâmico, 27%, ácido aspártico, 20%, alanina, 8% e treonina, 7%. Esses aminoácidos são utilizados diretamente ou após transformações na síntese de proteínas de reserva nos grãos. Estas são compostas, predominantemente, por proteínas com ponto isoelétrico em pH 4,7 (69%) e representaram $14,11\text{mg N.grão}^{-1}$ e $9,29\text{mg N.grão}^{-1}$ nos dois anos agrícolas. A vagem contribuiu com cerca de 15% do total de nitrogênio acumulado nos grãos, enquanto as outras partes da planta contribuíram com 85% do nitrogênio dos grãos.

8. SUMMARY

The accumulation of seed storage reserves and the forms of nitrogen transport from the plants to the developing fruits were studied in soybeans *Glycine max* (L.) Merrill. The experiment was conducted with the cultivar Santa Rosa growing in multiplication plots at the Experimental Station of Campinas during the 1978/79 and 1979/80 cropping seasons. The first peduncle and fruits samples were taken 15 days after flowering (DAF) and then at 7 day intervals up to maturity. The samples were analysed for dry matter, oil, fatty acids, proteins, carbohydrates, ureides (allantoin and allantoic acid) and free aminoacids.

The highest dry matter, protein and polysaccharides accumulation occurred between 44 and 65 DAF and oil between 44 and 81 DAF in 1978/79. In 1979/80, the highest dry matter, oil, total sugars and polysaccharides accumulation occurred from 30 up to 43 DAF, and protein from 30 up to 49 DAF. The rate of seed oil accumulation was very

influenced by climate. It decreased in rainy periods and increased at high temperatures. A decreased in saturated as opposed to unsaturated fatty acid contents was observed during seed development.

Ureide-N was the predominant form of N translocation from soybean plants to the fruits. It accounted for about 53% of the total nitrogen translocated, half of which as allantoin and half as allantoic acid. Pods accumulated large quantities of ureide-N at early stages of seed formation, afterward it rapidly declined because of retranslocation to the seeds.

Amino acids contributed with 47% of the total nitrogen translocated to the seed: 28% as asparagine and 14% as histidine, aspartic acid, threonine and alanine.

In the seeds, ureides and aminoacids resulting from the metabolism of transported ureides and aminoacids were composed mainly by glutamic acid (27%), aspartic acid (20%), alanine (8%) and threonine (7%). These aminoacids were utilized for the synthesis of storage proteins, specially those with an isoelectric point at pH 4,7. Pods contributed with about 15% of total nitrogen accumulated in the seeds, while other parts of the plant accounted for 85% of seed nitrogen.

9. ABREVIATURAS

Ala	Alamina
γ - Abu	γ -Amino butírico
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
DAF	Dias após floração
DMS	Diferença mínima significativa
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
m.f.	Matéria fresca
m.s.	Matéria seca
Phe	Fenilalanina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
Val	Valina

10. BIBLIOGRAFIA

- ANDREW, C.S. 1978. Legumes and acid soils. In: J. Döbereiner, R.H. Burris, A. Hollaender, A.A. Franco, C.A. Neyra e D.B. Scott (eds.), Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics, V. 10, Plenum New York, pp. 135-60.
- A.O.A.C. - ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. 1970. Official methods of analysis. Washington, AOAC, 1015p.
- APRISON, M.H., MAGEE, W.E. & BURRIS, R.H. 1954. Nitrogen fixation by excised soybean root nodules. J. Biol. Chem. 208:29-39.
- ARRUDA, P. 1979. Síntese de aminoácidos e proteínas, e características físicas e químicas em endospermas normal e sugary-opaque-2, durante o desenvolvimento da semente de milho. Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas, 117p.
- ARRUDA, P., SILVA, W.J. & TEIXEIRA, J.P.F. 1978. Protein and free amino acids in a high lysine maize double mutant. Phytochemistry 17:1217-18.

- ASPINAL, G.O., BEGBIE, R., MCKAY, J.E. 1967. Polysaccharide components of soybeans. Cereal Sci. Today 12:225-29.
- ATKINS, C.A., PATE, J.S. & SHARKEY, P.J. 1975. Asparagine metabolism - Key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. Plant Physiol 56:807-12.
- BARKER, R.D., DERBYSHIRE, J.E., YARWOOD, A. & BOULTER, D. 1976. Purification and characterization of the major storage proteins of *Phaseolus vulgaris* seeds, and their intracellular and cotyledonary distribution. Phytochemistry 15:751-57.
- BATAGLIA, O.C. & MASCARENHAS, H.A.A. 1977. Absorção de nutrientes pela soja. Instituto Agronômico, Campinas. Boletim Técnico nº 41, 36p.
- BATAGLIA, O.C., MASCARENHAS, H.A.A., TEIXEIRA, J.P.F. & TISSELLI Fº, O. 1976. Acúmulo de matéria seca e nutrientes em soja cultivar Santa Rosa. Bragantia 35:237-47.
- BATAGLIA, O.C., TEIXEIRA, J.P.F., FURLANI, P.R., FURLANI, A. M.C. & GALLO, J.R. 1978. Métodos de análise química de plantas. Instituto Agronômico, Campinas. Boletim Técnico nº 87, 31p.
- BATES, R.P., KNAPP, F.W. & ARAUJO, P.E. 1977. Protein quality of greenmature, dry mature and sprouted soybeans. J. Food Sci. 42:271-72.
- BAUER, A., URQUHART, A.A. & JOY, K.W. 1977a. Amino acid metabolism of pea leaves: diurnal changes and amino acids synthesis from ¹⁵N-nitrate. Plant Physiol 59:915-19.
- BAUER, A., JOY, R.W. & URQUHART, A.A. 1977b. Amino acid metabolism of pea leaves: labeling studies on utilization of amides. Plant Physiol 59:920-24.

- BERGERSEN, F.J. 1965. Ammonia - an early stable product of nitrogen fixation by soybean root nodules. *Aust. Biol.Sci.* 18:1-9.
- BERGERSEN, F.J. 1971. Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 22:121-40.
- BEZDICEK, D.F., EVANS, D.W., ABEDE, B. & WITTERS, R.E. 1978. Evaluation of peat and granular inoculum for soybean yield and N fixation under irrigation. *Agron. J.* 70:865-68.
- BIDWELL, R.G.S., BARR, R.A. & STEWARD, F.C. 1964. Protein synthesis and turn-over in cultured plant tissue: sources of carbon for synthesis and the fate of the protein breakdown products. *Nature (Lond.)* 203:367-73.
- BILS, R.F. & HOWELL, R.W. 1963. Biochemical and cytological changes in developing soybean cotyledons. *Crop Sci.* 3: 304-8.
- BLACKBURN, S. 1968. Amino acid determination - Methods and Techniques. Marcel Dekker, I.N.C., New York, USA, 271pp.
- BOLLAND, M.J., HANKS, J.F., REYNOLDS, P.H.S., BLEVINS, D. G., TOLBERT, N.E. & SCHUBERT, K.R. 1982. Subcellular organization of ureide biogenesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen-fixing soybean nodules. *Planta* 155:45-51.
- BOLLARD, E.G. 1956. Nitrogenous compounds in plant xylem sap. *Nature (Supl.)* 178:1189-90.
- BARNES, R.L. 1959. Formation of allantoin and allantoic acid from adenine in leaves of *Acer saccharinum* L. *Nature (Supl.)* 184:1944.
- BONNER, J. 1950. Purines and Pyrimidines. *In: Plant Biochemistry.* Academic Press Inc., Publ., New York, NY, p.319-27.

- BOONVISUT, S. & WHITAKER, J.R. 1976. Effect of heat, amylase and disulfide bond cleavage on the in vitro digestibility of soybean proteins. J. Agric. Food Chem. 24:1130-35.
- BRIM, A.C., SCHULTZ, W.M. & COLLINS, F.I. 1967. Nuclear magnetic resonance analysis for oil in soybeans *Glycine max* (L.) Merrill, with implications in selection. Crop Sci. Madison 7:220-22.
- BULOW, J.F.W. von. 1978. Plant influence in symbiotic nitrogen fixation. In: Limitations and potentials for Biological Nitrogen fixation in the tropics. J. Dobereiner, R.H. Burris, A. Hollaender, A.A. Franco, C.A. Neyra e D.B. Scott, (eds). Vol 10, Plenum Pub. Co. New York, pp.75-94.
- BURRIS, R.H., JONES, L.T. & EMERICH, D.W. 1978. Nitrogenase systems. In: Limitations and potentials for Biological nitrogen fixation in the tropics. J. Dobereiner, R.H. Burris, A. Hollaender, A.A. Franco, C.A. Neyra e D.B. Scott (eds.), Vol 10, Plenum Pub. Co. New York, NY, pp. 191-207.
- BUTTLER, G.W., FERGUSON, J.D. & ALLISON, R.M. 1961. The biosynthesis of allantoin in Symphytum. Physiol. Plant. 14:310-21.
- CARELLI, M.L.C., FAHL, J.I. & TEIXEIRA, J.P.F. 1981. Efeito do nitrogênio no teor de proteína e composição em aminoácidos de sementes de feijão. Pesqui Agropec. Bras., Brasília 16(6):795-99.
- CATSIMPOOLAS, N. 1969. A note on the proposal of an immunological system of reference and nomenclature for the major soybean globulins. Cereal Chem. 46:369-72.
- CHAPMAN, G.W. Jr., ROBERTSON, J.A. & BURDICK, D. 1976. Chemical composition and lipxygenase activity in soybean as affected by genotype and environment. J. Am. Oil Chem. Soc. 53:54-56.

- CHERRY, J.G. & HAGEMAN, R.H. 1960. Separation and identification of soluble nucleotides from etiolated corn seedlings as a function of growth. *Plant Physiol.* 35:343-52.
- CHERRY, J.H. & HAGEMAN, R.H. 1961. Nucleotide & Ribonucleic acid metabolism of corn seedlings. *Plant Physiol.* 36:163-68.
- CHU, W.S. & SHELDON, V.L. 1979. Soybean oil quality as influenced by planting site and variety. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56:71-73.
- COLLINS, F.I. & CARTTER, J.L. 1956. Variability in chemical composition of seed from different portions of the soybean plant. *Agron. J.* 48:216-19.
- COLLINS, F.I. & HOWELL, R.W. 1957. Variability of linoleic acids in soybean oil. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 34:491-93.
- COLLINS, F.I. & SEDGWICK, V.F. 1959. Fatty acid composition of several varieties of soybeans. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 36:641-44.
- CONN, E.E. & STUMPF, P.K. 1975. *Introdução à Bioquímica*, trad. J.R. Magalhães (Superv.). Editora E. Blücher Ltda., São Paulo, 447pp.
- COHEN, G.N. 1967. *Biosynthesis of small molecules*. Harper & Row, Publishers, New York, USA, 108pp.
- CROCOMO, O.J. 1977. Metabolismo de proteínas e aminoácidos em sementes. In: *Curso Intensivo sobre Proteínas Vegetais*. O. J. Crocomo (Coord.). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, SP, p.31.
- CROCOMO, O.J. 1979. Biossíntese das proteínas. In: *Fisiologia Vegetal*. M.G. Ferri (Coord.), Vol 1, EPU-EDUSP, São Paulo, 301-13pp.

- CROOCKSTON, R.K., O'TOOLE, J. & OZBUN, J.L. 1974. Characterization of the bean pod as photosynthetic organ. *Crop Sci.* 14:708-12.
- DAVIES, D.D., GIOVANELLI, J. & REES, T.A. 1969. Ácidos nucleicos y síntesis de proteínas. *In: Bioquímica Vegetal.* Ediciones Omega, Barcelona, pp.465-92.
- DERBYSHIRE, E., WRIGHT, D.J. & BOULTER, D. 1976. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15:3-24.
- DÖBEREINER, J. 1978. Potencial for nitrogen fixation in tropical legumes and grasses. *In: Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics.* J. Döbereiner, R.H. Burris, A. Hollaender, A.A. Franco, C. A. Neyra & D.B. Scott (eds.), Vol 10, Plenum Pub. Co., New York, pp.13-24.
- DÖBEREINER, J., ARRUDA, N.B. 1967. Interrelações entre variedades e nutrição na nodulação e simbiose de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Pesqui.Agropec. Bras.*, Brasília 2:415-58.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-56.
- DUTTON, H.J. & MOUNTS, T.L. 1966. Desaturation of fatty acids in seeds of higher plants. *J. Lipid Res.* 7:221-25.
- EGLI, D.B., LEGGETT, J.E. & DUNCAN, W.G. 1978. Influence of N stress on leaf senescence and N redistribution in soybeans. *Agron. J.* 70(1):43-47.
- ELDRIDGE, A.C. & WOLF, W.J. 1967. Purification of the 11 S component of soybean protein. *Cereal Chem.* 44:645-52.

- EPSTEIN, E. 1975. A aquisição de nitrogênio. In: Nutrição Mineral das Plantas - Princípios e Perspectivas. E. Malavolta (trad.), Livros Técnicos e Científicos-EDUSP, São Paulo, pp.213-34.
- EVANS, L.T. 1975. The physiological basis of crop yield. In: Crop Physiology, some case histories. Ed. L. T. Evans, Cambridge Univ. Press, pp.327-55.
- EVANS, H.J., RUIZ-ARGUESO, T. & RUSSEL, S.A. 1978. Relationship between hydrogen metabolism and nitrogen fixation in legumes. In: Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics. J. Dobereiner, R.H. Burris, A. Hollaender, A.A. Franco, C.A. Neyra & D.B. Scott (eds.) Vol 10, Plenum Pub. Co., New York, pp.209-22.
- FARACO, M.H., MORAES, R.M., TEIXEIRA, J.P.F., SILVA, M.T.R. & MASCARENHAS, H.A.A. 1982. Influência de anos agrícolas sobre a composição e acúmulo de óleo em grãos de soja cv Santa Rosa. In: Seminário Nacional de Pesquisa de Soja, 2. Brasília, DF, 1981. Anais. Londrina, EMBRAPA-CNPSO, V. 1, pp.544-53.
- FOWDEN, L. 1954. The nitrogen metabolism of groundnut plants. the role of γ -methyleneglutamine and γ -methyleneglutamic acid. Ann. Bot. NS 18:417-40.
- FRANCO, A.A., FONSECA, O.O.M.da & MARRIEL, I.E. 1978. Efeito do nitrogênio mineral na atividade da nitrogenase e nitrato redutase, durante o ciclo de soja no campo. Rev.Bras. Cienc. Solo 2:110-14.
- FRANCO, A.A. 1978. Contribution of the legume - *Rhizobium* symbiosis to the ecosystem and food production. In: Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics. J. Dobereiner, R.H. Burris, A. Hollaender, A. Franco, C.A. Neyra & D.B. Scott (eds.), Vol 10, Plenum Pub. Co., New York, pp.65-74.

- FREIBERG, S.R., BOLLARD, E.G. & HEGARTY, M.P. 1957. The natural occurrence of urea and ureides in the soluble nitrogen of the banana plant. *Plant Physiol.* (Supl) 32:LII.
- FUKUSHIMA, D. 1969a. Denaturation of soybean proteins by organic solvents. *Cereal Chem.* 46:156-63.
- FUKUSHIMA, D. 1969b. Enzymatic hydrolysis of alcohol denatured soybean proteins. *Cereal Chem.* 46:405-18.
- FUJIHARA, S. & YAMAGUCHI, M. 1978. Effects of allopurinol (4-hydroxypyrazolo (3, 4-d) pyrimidine) on the metabolism of allantoin in soybean plants. *Plant Physiol* 62:134-38.
- FUJIHARA, S., YAMAMOTO, K. & YAMAGUCHI, M. 1977. A possible role of allantoin and the influence of nodulation on its production in soybean plants. *Plant Soil* 48:233-42.
- GAMBLE, W.K. 1978. Soybean Improvement. In: International Institute of Tropical Agriculture. Annual Report, Ibadan, Nigeria, pp.42-44.
- GEIGER, D.R. & SOVONICK, S.A. 1970. Temporary inhibition of translocation velocity and mass transfer rate by petiole cooling. *Plant Physiol.* 46:847-49.
- GRAHAM, T.A. & GUNNING, B.E.S. 1970. Localization of legumin and vicilin in bean cotyledon cells using fluorescent antibodies. *Nature* 228:81-82.
- HANWAY, J.J. & WEBER, C.R. 1971. Dry matter accumulation in eight soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) varieties. *Agron. J.* 63:227-30.
- HARPER, J.E. 1974. Soil and symbiotic nitrogen requirements for optimum soybean production. *Crop Sci.* 14:255-60.

- HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab. Prac., pp.475-76.
- HERRIDGE, D.F., ATKINS, C.A., PATE, J.S. & RAINBIRD, R.M. 1978. Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of the cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Plant Physiol. 62:495-98.
- HICKS, D.R. & PENDLETON, J.W. 1969. Effect of floral bud removed on performance of soybeans. Crop Sci. 9:435-37.
- HILL, J.E. & BREIDENBACH, R.W. 1974a. Proteins of soybean seeds. I. Isolation and characterization of the major components. Plant Physiol. 53:742-46.
- HILL, J.E. & BREIDENBACH, R.W. 1974b. II. Accumulation of the major protein components during seed development and maturation. Plant Physiol. 53:747-51.
- HILL, R.W., JOHNSON, D.R. & RYAN, K.A. 1979. A model for predicting soybean yields from climatic data. Agron. J. 71:251-56.
- HIRAYAMA, O. & HUIJII, K. 1965. Glyceride structure and biosynthesis of natural fats. Part III. Biosynthetic process of triglycerides in maturing soybean seed. Agr. Biol. Chem. 29:1-6.
- HOWELL, R.W. & CARTTER, J.L. 1953. Physiological factors affecting composition of soybeans. I. Correlation of temperatures during certain portions of the pod filling stage with oil percentage in mature beans. Agron. J. 45: 526-28.
- HOWELL, R.W. & CARTTER, J.L. 1958. Physiological factors affecting composition of soybeans. II. Response of oil and other constituents of soybeans to temperature under controlled conditions. Agron. J. 50:664-67.

- HOWELL, R.W. & COLLINS, F.I. 1957. Factors affecting linolenic and linoleic acids content of soybean oil. Agron. J. 49:593-97.
- HYMOWITZ, T., COLLINS, F.I., PANCZNER, J. & WALKER, W.M. 1972a. Relationship between the content of oil, protein and sugar in soybean seed. Agron. J. 64:613-16.
- HYMOWITZ, T., WALKER, W.M., COLLINS, F.I. & PANCZNER, J. 1972b. Stability of sugar content in soybean strains. Comm. I. Soil Sci. and Plant Physiol. 3(5):367-73.
- INKPEN, J.A. & QUACKENBUSH, F.W. 1969. Desaturation of palmitate and stearate by cell-free fractions from soybean cotyledons. Lipids 4:539-43.
- ISHIZUKA, J., OKINO, F. & HOSHI, S. 1970. Physiological studies on the nutrition of soybean plants. 3. The relation between contents of nitrogenous components in stems and vegetative growth. J. Sci. Soil Manure, Japan, 41:78-82.
- JOHNSTON, T.J. & PENDLETON, J.W. 1968. Contribution of leaves at different canopy levels to seed production of upright and lodged soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill). Crop Sci. 9:577-81.
- KALBERER, P. 1965. Breakdown of caffeine in the leaves of *Coffea arabica* L. Nature, 205:597-98.
- KATO, Y. & KITADA, S. 1979. Studies on nitrogen metabolism of soybean plants. IV. The dynamic aspect of leaf nitrogen and its relation to protein turnover. Japan J. Crop Sci. 48(2):229-42.
- KENNEDY, I.R. 1966. Primary products of symbiotic nitrogen fixation. I. Short-term exposures of serradella nodules to $^{15}\text{N}_2$. Biochim. Biophys. Acta 130:285-94.

- KEY, J.L. & HANSON, J.B. 1961. Some effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on soluble nucleotides and nucleic acid of soybean seedlings. *Plant Physiol.* 36:145-52.
- KRIVORUCHCO, D., KABA, H., SAMBUCETTI, M.E. & SANAHUJA, J.C. 1979. Maturation time and some seed composition characters affecting nutritive value in soybean varieties. *Cereal Chem.* 56:217-19.
- KROBER, O.A. & CARTTER, J.L. 1962. Quantitative interrelations of protein and non protein constituents of soybeans. *Crop Sci.* 2:171-72.
- KROBER, O.A. & GIBBONS, S.J. 1962. Nonprotein nitrogen in soybeans. *J. Agric. Food Chem.* 10(1):57-59.
- KRUPKA, R.M. & TOWERS, G.H.N. 1958. Studies of the ketoacids of wheat. II. Glyoxilic acid and its relation to allantoin. *Can. J. Botany* 36:179-86.
- KRUPKA, R.M. & TOWERS, G.H.N. 1979. Studies on the metabolic relations of allantoin in wheat. *Can. J. Botany* 37:539-45.
- KUSHIZAKI, M., ISHIZUKA, J. & AKAMATSU, F. 1964. Physiological studies on the nutrition of soybean plants. 2. Effects of nodulation on the nitrogenous constituents of soybean plants. *J. Sci. Soil Manure, Japan* 35:323-27.
- LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. 1980. Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. In: *The Biochemistry of Plants*, Vol 5, Academic Press, Inc, pp.569-607.
- LEHNINGER, A.L. 1976. *Bioquímica*. J.R. Magalhães (trad.) , Edgard Blücher Editora, Vol. 3, pp.439-596.

- LOPES, E.S. 1978. Ecology of legume *Rhizobium* symbiosis. In: Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics. J. Dobereiner, R.H. Burris, A. Hollaender, A.A. Franco, C.A. Neyra e D.B. Scott (eds.), Vol 10, Plenum Pub. Co., New York, pp.173-90.
- MAINI, N.S. & BAINS, G.S. 1965. Effect of variety and agronomic practices on the yield and composition of soybean. Indian Oilseed J. 9:231-42.
- MARCOS Fº, J. 1980. Maturidade fisiológica de sementes de soja. Pesq. agropec. bras., Brasília 15(4):447-60.
- MASCARENHAS, H.A.A. 1973. Acúmulo de matéria seca, absorção e distribuição de elementos, durante o ciclo vegetativo da soja. Instituto Agronômico, Campinas, Boletim Técnico nº 6, 48p.
- MASCARENHAS, H.A.A., HIROCE, R., MIRANDA, M.A.C., POMMER, C. V. & SAWAZAKI, E. 1978. Efeito do nitrogênio residual de soja na produção de milho. Instituto Agronômico, Campinas, Boletim Técnico nº 58, 16p.
- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M. & YAMAMOTO, Y. 1977a. Distribution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulating and non-nodulating soybeans plants. Plant & Cell Physiol. 18:353-59.
- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M. & YAMAMOTO, Y. 1977b. Incorporation of ^{15}N into allantoin in nodulated soybean plants supplied with $^{15}\text{N}_2$. Plant & Cell Physiol. 18:459-62.
- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M. YAMAMOTO, Y. 1978. Allantoin metabolism in soybean plants as influenced by grafts, a delayed inoculation with *Rhizobium* and a late supply of nitrogen compounds. Plant & Cell Physiol. 19:1161-68.

- MAZUR, A. & HARROW, B. 1971. Metabolism of nucleic acids .
In: Textbook of Biochemistry. 10a. ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, pp.374-405.
- McCLURE, P.R. & ISRAEL, D.W. 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Phisiol.* 64:411-16.
- MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry* 15:873-86.
- MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. 1977. Amino acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Phisiol.* 28:299-329.
- MINCHIN, F.R. & PATE, J.S. 1973. The carbon balance of a legume and the functional economy of its root nodules. *J. Exp. Bot.* 24:259-71.
- MIRANDA, M.A.C., MIYASAKA, S., MASCARENHAS, H.A.A. & ROSSETTO, D. 1977. Melhoramento da soja no Estado de São Paulo. In: Soja no Brasil Central. Fundação Cargill, Campinas, pp. 25-54.
- MIYASAKA, S. 1977. Botânica, Origem e Disseminação. In: A soja no Brasil Central. Fundação Cargill, Campinas, pp.3-21.
- MORSE, W.J. 1950. History of soybeans production. In: MARKLEY, K.S. Soybeans and Soybean Products. Interscience Pub., New York, Vol. 1, pp.3-59
- NAGAI, Y & FUNAHASHI, S. 1961. Allantoinase from mung bean seedlings. *Agric. Biol. Chem.* 25(4):265-68.
- NAGATA, T. 1972. Agro-ecological approaches to the variety differentiation in soybeans *Glycine max* (L.) Merril. Proceedings of a Symposium on Tropical Agricultural Researches. Tropical Agricultural Research Center, Tokio, pp.137-68.

- NAISMITH, W.E.F. 1955. Ultracentrifuge studies of soya bean protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 16:203-10.
- NASH, A.M. & WOLF, W.J. 1967. Solubility and ultracentrifugal studies on soybean globulins. *Cereal Chem.* 44:183-92.
- NEYRA, C.A. 1978. Interactions of plant photosynthesis with dinitrogen fixation and nitrate assimilation. In. Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics. J. Döbereiner, R.H. Burris, A. Hollaender, A.A. Franco, C.A. Neyra e D.B. Scott (eds.) Vol. 10, Plenum Pub. Co., New York, pp.11-20.
- OCHIAI-YANAGI, S., FURAZAWA, C. & HARADA, K. 1978. Formation of storage protein components during soybean seed development. *Agric. Biol. Chem.* 42(4):697-702.
- OGREN, W.L. & RINNE, R.W. 1973. Photosynthesis and Seed Metabolism. In: CALDWELL, B.E.(ed.). Soybeans:Improvement, Production and Uses. Agronomy n° 16, Am Soc. Agron. Madison, Wis., pp.391-416.
- OLIKER, M., POLJAKOFF-MAYBER, A. & MAYER, A.M. 1978. Changes in weight, nitrogen accumulation, respiration and photosynthesis during growth and development of seeds and pods of *Phaseolus vulgaris*. *Am. J. Bot.* 65:366-71.
- PATE, J.S. 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31:313-40.
- PATE, J.S., GUNNING, B.E.S. & BRIARTY, L.G. 1969. Ultrastructure and functioning of the transport system of the leguminous root nodule. *Planta* 85:11-34.
- PATE, J.S., SHARKEY, P.J. & LEWIS, O.A.M. 1974. Phloem bleeding from legume fruits. A technique for study of fruit nutrition. *Planta* 120:229-43.

- PATE, J.S., SHARKEY, P.J. & 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.
- PATE, J.S., SHARKEY, P.J. & ATKINS, C.A. 1977. Nutrition of a developing legume fruit. Functional economy in terms of carbon, nitrogen, water. *Plant Physiol.* 59:506-10.
- PATE, J.S., ATKINS, C.A., HERRIDGE, D.F. & LAYZELL, D.B. 1981. Synthesis, storage and utilization of amino compounds in White Lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Physiol.* 67:37-42.
- PERKIN-ELMER. 1969. Instruction Manual for the Model KLA-3B Amino Acid Analyser. N-6055 E-3, ed. Hitachi, Ltda, Japan, 193p.
- PERKIN-ELMER. 1971. Instruction Manual for Ligand Exchange Chromatography, USA, n° 6499-E, 70p.
- PHILIPS, D.A. 1980. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31:29-49.
- QUEBEDEAUX, B. & CHOLLET, R. 1975. Growth and development of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) pods. CO₂ exchange and enzyme studies. *Plant Physiol.* 55:745-48.
- RACKIS, J.J. 1979. Biochemical changes in soybeans: maturation, postharvest storage and processing, and germination. In: Post-harvest Biology and Biotechnology. H.O. Hultin e M. Milner (eds.). Food & Nutrition Press, Inc., West Point, C.I., pp.35-76.
- RAWSTHORNE, S., MINCHIN, F.R., SUMMERFIELD, R.J., COOKSON, C. & COOMBS, J. 1980. Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules. *Phytochemistry* 19:341-55.
- REINBOTHE, H. & MOTHES, K. 1962. Urea, ureides and guanidines in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 13:129-50.

- REIS, B.G. 1956. O feijão soja. Rio Grande do Sul, Secretaria da Agricultura. Sec. Inf. Agric., Circular nº 4.
- REYNOLDS, P.H.S., BLEVINS, D.G., BOIAND, M.J., SCHUBERT, K.R. & RANDALL, D.D. 1982. Enzymes of ammonia assimilation in legume nodules: a comparison between ureide and amide-transporting plants. *Physiol. Plant* 55:255-60.
- RHODES, D., RENDON, G.A. & STEWART, G.R. 1976. The regulation of ammonia assimilating enzymes in *Lemna minor*. *Planta (Berl.)* 129:203-10.
- RINNE, R.W. 1969. Biosynthesis of fatty acids by a soluble extract from developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 44:89-94.
- ROEHM, J.N. & PRIVETT, O.S. 1970. Changes in the structure of soybeans triglycerids during maturation. *Lipids* 5:353-58.
- ROSOLEM, C.A. 1980. Nutrição Mineral e Adubação da Soja. Institutos da Potassa EUA-Suiça, T. Yamada (ed.), Piracicaba, SP, Boletim Técnico nº 6, 80p.
- RUBEL, A., RINNE, R.W. & CANVIN, D.T. 1972. Protein, oil and fatty acid in developing soybean seeds. *Crop. Sci.* 12:739-41.
- RUSCHEL, A.P. 1979. Fixação biológica do nitrogênio. In: *Fisiologia Vegetal*, M.G. Ferri (coord.) EPU-EDUSP, S.Paulo, Vol. 1, pp.167-78.
- RYAN, E. & FOTTRELL, P.F. 1974. Subcellular localization of enzymes involved in the assimilation of ammonia by soybean root nodules. *Phytochemistry* 13:2647-52.
- SALLANS, H.R. 1964. Factors affecting the composition of Canadian oil seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41:215-18.

- SAOUMA, E. 1981. Seguridad alimentaria frente a las crisis. *Ceres Revista de la FAO sobre Agricultura y Desarrollo*. nº 80, 14(2):15-19.
- SCHRAUZER, G.N. 1977. Nitrogenase model systems and the mechanism of biological nitrogen reduction: Advances since 1974. *In*: W. Newton, J.R. Postgate, C. Rodrigues-Barrueco (eds.). *Recent Developments in Nitrogen Fixation*. Academic Press, Londres, pp.109-18.
- SCHUBERT, K.R. 1981. Enzymes of purine biosynthesis and catabolism in *Glycine max* (cultivar Amsoy 71): 1. Comparison of activities with nitrogen fixation and composition of xylem exudate during nodule development. *Plant Physiol.* 68(5):1115-22.
- SCOTT, D.B. 1978. Ammonia assimilation in N_2 -fixing systems. *In*: *Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics*. J. Dobereiner, R.H. Burris, A. Hollaender, A.A. Franco, C.A. Neyra e D.B. Scott (eds.), Vol. 10, Plenum Pub. Co, New York, pp.223-35.
- SGARBIERI, W. 1980. Estudo do conteúdo e de algumas características das proteínas em sementes de plantas da família *Leguminosae*. *Cienc. e Cult.* 32:78-84.
- SHANTZ, E.M. & STEWARD, F.C. 1959. Investigations on growth and metabolism of plant cells. VII. Sources of nitrogen for tissue cultures under optimal conditions for their growth. *Ann. Bot. (London)* 23:371-90.
- SHARKEY, P.J. & PATE, J.S. 1976. Translocation from leaves to fruits of a legume, studied by phloem bleeding technique: diurnal changes and effects of continuous darkness. *Planta* 128:63-72.

- SILVA, M.R.T., MORAES, R.M., TEIXEIRA, J.P.F. & MASCARENHAS, H.A.A. 1981. Variação da composição química de grãos de soja 'Santa Rosa' durante o seu desenvolvimento. *Bragantia* 40:11-19.
- SIMMONS, R.O. & QUACKENBUSH, F.W. 1954. Comparative rates of formation of fatty acids in the soybean seed during its development. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 31:601-3.
- SLOGER, C. 1973. Assimilation of ammonia by glutamine synthetase and glutamate synthetase in N₂-fixing bacteroids from soybeans nodules. *Plant Physiol.* 51 (Supl):34.
- SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. (eds.). 1972. Soybeans: Chemistry and Technology. Vol. 1, Proteins, AVI Pub. Co., West Point, C.T., 470p.
- SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. 1980. Chemical composition of the soybeans seed. In: Chemistry and Technology. A.K. Smith e S.J. Circle (eds.), vol. 1, AVI Pub. Co., West Point, C.T., pp.61-92.
- SODEK, L., LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. 1980. Distribution and properties of a potassium-dependent asparaginase isolated from developing seeds of *Pisum sativum* and other plant. *Plant Physiol.* 65:22-26.
- SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. & MOORE, S. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30:1190-1206.
- STOCKMAN, D.R., HALL, T.C. & RYAN, D.S. 1976. Affinity chromatography of the major seed protein of the bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 58:272-75.

- STREETER, J.G. 1972a. Nitrogen nutrition of field grown soybean plants. I. Seasonal variations in soil nitrogen and nitrogen composition of stem exudate. Agron. J. 64: 311-14.
- STREETER, J.G. 1972b. Nitrogen nutrition of field-grown soybean plants. II. Seasonal variations in nitrate reductase, glutamate dehydrogenase and nitrogen constituents of plant parts. Agron. J. 64:315-19.
- STREETER, J.G. 1979. Allantoin and allantoic acid in tissues and stem exudate from field-grown soybean plants. Plant Physiol. 63:478-80.
- TAJIMA, S. & YAMAMOTO, Y. 1975. Enzymes of purine catabolism in soybean plants. Plant & Cell Physiol. 16:271-82.
- TAJIMA, S. & YAMAMOTO, Y. 1977. Regulation of uricase activity in developing roots of *Glycine max*, non-nodulating variety A62-2. Plant & Cell Physiol. 18:247-53.
- TANGO, J.S., MASCARENHAS, H.A.A., SHIROSE, I. & FIGUEIREDO, I. B. 1974a. Teores de matéria graxa e proteína no grão e de ácidos graxos no óleo de diversas variedades de soja. Coletânea do ITAL, 5:331-38.
- TANGO, J.S., MASCARENHAS, H.A.A., FIGUEIREDO, I.B. & SHIROSE, I. 1974b. Influência de localidade de cultura nos teores de matéria graxa e proteína nos grãos de soja e de ácidos graxos no óleo. Coletânea do ITAL, 5:339-44.
- TANGO, J.S., MASCARENHAS, H.A.A., FIGUEIREDO, I.B. & SHIROSE, I. 1974c. Influência de anos agrícolas sobre os teores de matéria graxa e proteína no grão de soja e de ácidos graxos no óleo. Coletânea do ITAL 5:345-55.

- TANGO, J.S., MASCARENHAS, H.A.A., SHIROSE, I. & FIGUEIREDO, I.B. 1974d. Influência de inoculantes, calagem e adubação química nos teores de matéria graxa e proteína no grão de soja e de ácidos graxos no óleo. Coletânea do ITAL 5:357-63.
- TANIS, R.J. & NAYLOR, A.W. 1968. Physical and chemical studies of a low-molecular weight form to urease. Biochem. J. 108:771-77.
- TEIXEIRA, J.P.F., MASCARENHAS, H.A.A. & BATAGLIA, O.C. 1979a. Efeito de cultivares, tipos de solos e práticas culturais sobre a composição química de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). In: Seminário Nacional de Pesquisa de Soja, 1ª Londrina, PR, 1978. Anais. Londrina, EMBRAPA/CNPSo, V. 1, pp.11-16.
- TEIXEIRA, J.P.F., MASCARENHAS, H.A.A., MIRANDA, M.A.C. & BRAGA, N.R. 1979b. Efeito de localidades, adubação e anos consecutivos de plantio sobre o teor de proteínas em sementes de soja cv Santa Rosa. Científica 7(3):343-46.
- TEIXEIRA, J.P.F., SILVA, M.T.R., MASCARENHAS, H.A.A. & MAEDA, J.A. 1980. Variação da composição química de sementes de três cultivares de soja durante o armazenamento. Bragantia 39:21-25.
- TEIXEIRA, J.P.F., SILVA, M.T.R., LOPES, E.S. & GIARDINI, A.R. 1981. Ocorrência de ureídeos em folhas de amendoim como indicativo de fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico. Bragantia 40:193-97.
- TEIXEIRA, J.P.F. 1981. Avaliação do teor de ureídeos em plantas de confrei (*Symphytum officinale*). não publicado, 6p.

- TEIXEIRA, J.P.F., FARACO, M.H., SILVA, M.T.R., MORAES, R.M., MASCARENHAS, H.A.A. & MIRANDA, M.A.C. 1982. Variação na composição química de grãos de soja em função da posição das vagens na planta. In: Seminário Nacional de Pesquisa de Soja, 2. Brasília, DF, 1981. Anais. Londrina, EMBRAPA/CNPSo, pp.689-97.
- THANH, V.H. & SHIBASAKI, K. 1976. Major proteins of soybean seeds. A straight forward fractionation and their characterization. J. Agric. Food Chem. 24:1117-21.
- THIBODEAU, P.S. & JAWORSKI, E.G. 1975. Patterns of nitrogen utilization in the soybean. Planta 127:133-47.
- THOMAS, R.J. & SCHRADER, L.E. 1981. Ureide metabolism in higher plants. Phytochemistry 20:361-71
- THOMAS, R.J., FELLER, U. & ERISMANN, K.H. 1980. Ureide metabolism in non-nodulated *Phaseolus vulgaris* L. J. Exp. Botany 31:409-17.
- WARDLAW, I.F. 1968. The control and pattern of movement of carbohydrates in plants. Bot. Rev. 34:79-105.
- WENT, F.W. 1956. The role of environment in plant growth. Am. Sci. 44:378-98.
- WHITE, A., HANDLER, P. & SMITH, E.L. 1968. Metabolism of purines, pyrimidines and nucleotides. In: Principles of Biochemistry. 4a. ed., McGraw-Hill Book Co., New York, USA, pp.619-44.
- WINTER, H.C., POWELL, G.K. & DEKKER, E.E. 1982. Glutamine synthetase of germinating peanuts. Properties of two chromatographically distinct forms and their activity toward 4-methyleneglutamic acid. Plant Physiol. 69:41-47.

- WOLF, W.J. 1980. Purification and properties of the proteins.
In: Soybeans: Chemistry and Technology. A.K. Smith e S.J.
Circle (eds.), Vol. 1, AVI Pub. Co., West Point, C.T., pp.
93-143.
- WOLF, W.J. & BRIGGS, D.R. 1956. Ultracentrifugal investigation
of the effect of neutral salts on the extraction of soybean
proteins. Arch. Biochim. Biophysics 63:40-49.
- WOLF, W.J. & SLY, D.A. 1967. Cryoprecipitation of soybean
11 S protein. Cereal Chem. 44:653-68.
- WOO, K.C., ATKINS, C.A. & PATE, J.S. 1981. Ureide synthesis
in a cell-free system from cowpea (*Vigna unguiculata* (L.)
Walp.) nodules. Studies with O₂, pH and purine metabolites.
Plant Physiol. 67:1156-60.
- WRIGHT, D.J. & BOULTER, D. 1972. The characterization of
vicilin during seed development in *Vicia faba* (L.). Planta
105:60-5.
- YAZDI-SAMADI, B., RINNE, R.W. & SEIF, R.D. 1977. Components
of developing soybean seeds, oil, protein, sugars, starch,
organic acids and amino acids. Agron. J. 69:481-86.
- YOUNG, E.G. & CONWAY, C.F. 1942. On the estimation of
allantoin by the Rimini-Schryver reaction. J. Biol. Chem.
142:839-53.