

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CRESCIMENTO E ATIVIDADE DE ENZIMAS DO
METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM COTILÉDONES
DE *Crotalaria juncea* CULTIVADOS *in*
vitro.

CAMPINAS - SP

1997

KÁTIA VIVIANE GONÇALVES

CRESCIMENTO E ATIVIDADE DE ENZIMAS DO
METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM COTILÉDONES
DE *Crotalaria juncea* CULTIVADOS *in*
vitro.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Kátia Viviane
Gonçalves
e aprovada pela Comissão Julgadora.
28/11/97

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

Orientador: Prof. Dr. Ladaslav Sodek.

Campinas - SP
1997

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

9808133

NIDADE	BC
CHAMADA:	unicamp
	9587c
	Ex
TOMBO BC	33198
PROC.	395/98
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	28/03/98
N° CPD	

CM-00108225-4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Gonçalves, Kátia Viviane

G587c Crescimento e atividade de enzimas do metabolismo de nitrogênio em cotilédones de *Crotalaria juncea* cultivados *in vitro* / Kátia Viviane Gonçalves. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.
91f. illus.

Orientador: Ladaslav Sodek

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Asparaginase. 2. *Crotalaria*. 3. Nitrogênio-Metabolismo.
I. Sodek, Ladaslav. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA:

Campinas, 28 de novembro de 1997.

BANCA EXAMINADORA:

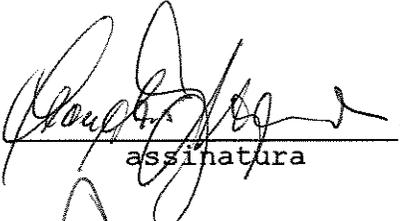
TITULARES:

Prof. Dr. Ladaslav Sodek



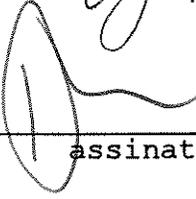
assinatura

Prof. Dr. Leandro Ferreira de Aguiar



assinatura

Prof. Dr. Paulo Mazzafera



assinatura

SUPLENTE:

Profa. Dra. Marlene A. Schiavinato

assinatura

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha mais profunda gratidão às seguintes pessoas:

ao Prof. Ladaslav Sodek, pela oportunidade, orientação, estímulo e confiança;

aos professores Marlene Schiavinato, Paulo Mazzafera e Jorge Vega, que participaram da pré-banca, pelas sugestões e críticas;

aos professores e amigos Leandro e Estela, pela amizade, paciência e, principalmente, pela chance de alcançar novos horizontes;

aos colegas e amigos, em especial à Lili, à Ana Paula e ao Cicinho, à Angela, à Fefa, à Cris, à Nira, à Claudinha e à Rosilayne: como vocês me agüentaram!!!? .

aos companheiros de Rep, Kiki, Luka, Serginho e Iara, Lu, Marva, Srdjan, Omar: grandes amigos, momentos inesquecíveis!

ao meu assessor para assuntos computacionais de plantão, e assuntos aleatórios em geral, Yurial: "obrigado e desculpa"!

ao Srdjan, à Flávia e ao Yuri, pela ajuda com o inglês, valeu!

aos funcionários do DFV, à Josênia e à Silvia pela presteza e simpatia.

Gostaria de agradecer, também, à Coordenadoria de aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa (FAEP/UNICAMP) pelo auxílio financeiro, bem como aos meus "paistrocinadores".

E não é que eu terminei!!!

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMO	ii
SUMMARY	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1- Material Vegetal e Cultivo das Plantas.....	14
3.2- Cultivo dos Cotilédones.....	15
3.3- Extração e Dosagem de Proteínas.....	20
3.4- Preparação de Extrato e Avaliação de Atividade Enzimática.....	21
4. RESULTADOS.....	28
4.1- Definição do Meio de Cultura e Crescimento dos Cotilédones.....	28
4.2- Atividade da Enzima Asparaginase.....	42
4.3- Atividades das Enzimas GS, GOGAT e GDH.....	50
4.4- Influência de Glu sobre o Crescimento de Cotilédones.....	53

5. DISCUSSÃO.....	57
5.1- Definição das Condições de Cultivo <i>in vitro</i> Para os Cotilédones de <i>C. juncea</i>	57
5.2- Atividade da Enzima ASNase.....	62
5.3- Atividades das Enzimas GS, GOGAT e GDH.....	66
6. CONCLUSÃO.....	68
7. LITERATURA CITADA.....	69

ABREVIATURAS

ALC	Ácido alantóico
ALN	Alantoína
ASNase	L-asparaginase
BSA	Bovine serum albumin Albumina de soro bovino
DTT	Ditiotreitol
DAA	Dias após a antese
EDTA	Etileno diamino tetracetato
GDH	Glutamato desidrogenase
GOGAT	Glutamina oxoglutarato amida transferase ou Glutamato sintase
GS	Glutamina sintetase
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMO

Foi implementado um sistema *in vitro* para o crescimento de cotilédones imaturos de *Crotalaria juncea* L. Com a finalidade de estudar o metabolismo do nitrogênio, cotilédones com 39 dias após a antese cresceram por 8 dias em meio líquido de cultivo contendo diferentes fontes nitrogenadas. As atividades das enzimas asparaginase, glutamina sintetase, glutamato sintase e glutamato desidrogenase foram maiores quando asparagina foi utilizada como fonte de nitrogênio. O uso de glutamina proporcionou os melhores níveis de crescimento e deposição de proteínas de reserva. Asparagina, entre as fontes testadas, foi a segunda melhor para a promoção do crescimento dos cotilédones. A menor eficiência da asparagina não pode ser explicada por deficiência na atividade de glutamina sintetase, limitação de asparaginase ou insuficiência de glutamato para a reação de glutamina sintetase.

SUMMARY

An *in vitro* system for the growth of *Crotalaria juncea* L. was implemented. In order to study the metabolism of nitrogen, cotyledons collected 39 days after anthesis were grown for 8 days in a liquid culture medium containing different nitrogen sources. It was observed that the activities of the enzymes asparaginase, glutamine synthetase, glutamate synthase and glutamate dehydrogenase were greater when asparagine was used as a nitrogen source. Among the tested sources, glutamine provided the greatest growth rates and deposition of storage proteins, followed by asparagine. It was concluded that the lower efficiency obtained with asparagine can not be explained by a deficiency of the glutamine synthetase activity, asparaginase limitation or glutamate insufficiency in the glutamine synthetase reaction.

1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio é o elemento que mais limita o crescimento das plantas, principalmente em sistemas agrícolas (MENGEL & KIRKBY, 1979), uma vez que entra na estrutura química de vários compostos essenciais ao funcionamento desses organismos, dentre os quais as proteínas.

As proteínas vegetais apresentam importância fundamental tanto para a alimentação humana como para a nutrição de animais. Cerca de 70% dos alimentos protéicos consumidos pelo homem são de origem vegetal (KAUL, 1973). Dessas proteínas, 70% são obtidas de cereais, enquanto que as leguminosas contribuem com cerca de 18% (EVANS & GRIDLEY, 1979). As leguminosas, entretanto, são plantas bastante estudadas quanto ao metabolismo de N, principalmente devido a sua capacidade de fixação do N_2 atmosférico.

Os vegetais, de modo geral, podem absorver N do solo na forma inorgânica, como NO_3^- ou NH_4^+ . O NO_3^- pode ser reduzido nas raízes ou, transportado via xilema, sofrer redução nas folhas. O sítio de redução do NO_3^- varia de acordo com a disponibilidade do mesmo no solo e com o nível da enzima redutase de nitrato na raiz (PATE, 1980). Outro tecido com capacidade para a redução do NO_3^- é a vagem, a qual pode funcionar como fonte de N para as sementes de leguminosas (MORI & SODEK, 1983).

O íon NH_4^+ também pode ser absorvido pelo sistema radicular, mas quando isso ocorre, ele é prontamente

assimilado pelas enzimas GS/GOGAT, que são responsáveis pela ausência deste íon no sistema de transporte da planta.

Algumas plantas, entre as quais as leguminosas, podem formar associações simbióticas com bactérias capazes de fixar N_2 atmosférico, que é fornecido à planta sob a forma de NH_4^+ .

A simbiose leguminosa-rizóbio é a mais estudada. As leguminosas constituem a terceira maior família dentre as Angiospermas e incluem, desde o ponto de vista de morfologia, habitat e ecologia, espécies muito diversas, que quando noduladas o fazem com bactérias da família Rhizobiaceae (MONTALDI, 1995).

Esta simbiose ocorre em estruturas determinadas, denominadas nódulos, e é através delas que a planta pode obter todo o N necessário para o seu desenvolvimento. A planta, por sua vez, contribui fornecendo aos microorganismos os fotoassimilados que vão garantir seu crescimento e o bom funcionamento do nódulo. Como o metabolismo de N da planta é espacialmente separado, ocorrendo dentro da célula, o sistema de utilização destes fotoassimilados é bem controlado (SCHUBERT, 1986; ANDERSON & BEARDALL, 1991).

O primeiro produto estável da fixação do N_2 nos nódulos de leguminosas é o NH_4^+ (BERGENSEN, 1965). O íon, resultante da ação da nitrogenase, é excretado do bacteróide para as células do hospedeiro, e tem que ser prontamente utilizado por ser tóxico ao tecido vegetal (GIVAN, 1979). Assim, ele é rapidamente assimilado pelas atividades combinadas das enzimas GS e GOGAT, cujo produto final de suas reações, o

glutamato, pode ser utilizado na formação de outras moléculas nitrogenadas (SCHUBERT, 1986).

Os compostos nitrogenados são geralmente os principais solutos presentes no xilema, alcançando concentrações de 0,1 a 2,1 mg de N/ml, enquanto que no floema estes níveis chegam a ser 10 a 20 vezes maiores (PATE, 1980).

O N transportado via xilema depende da transpiração e, portanto, ocorre apenas durante o dia, quando os estômatos estão abertos e em direção a órgãos que transpiram em maior intensidade. É uma forma de transporte pouco importante para frutos e outros sítios de consumo que apresentam pouca ou nenhuma transpiração. Esses órgãos são supridos principalmente pelo floema. O transporte no floema se dá por fluxo de pressão e seu carregamento, nas fontes, é um processo ativo envolvendo ATPase (SERVAITES et al., 1979)

No xilema, o N pode ser transportado sob as formas inorgânica (NO_3^-) ou orgânica (principalmente amidas e ureídeos). O NO_3^- é a única forma inorgânica presente no xilema. Já os compostos orgânicos presentes em sua seiva vão variar de acordo com os processos de aquisição de N presentes nas raízes (PATE, 1980).

Fortes evidências demonstram que os ureídeos são produtos diretos da fixação de N (THOMAS & SCHRADER, 1981), havendo uma correlação entre o teor de ureídeos no xilema e o grau de dependência da fixação de N (McCLURE et al., 1980, HERRIDGE, 1982). Deste modo, plantas noduladas como *Glycine max* (McCLURE & ISRAEL, 1979), *Phaseolus vulgaris* (HUNGRIA et al., 1985) *Psophocarpus tetragonolobus* (PATE et al., 1980),

Vigna unguiculata (PEOPLES et al., 1985a) e outras leguminosas tropicais apresentam os ureídeos ALN e ALC como principal forma de transporte de N no xilema. Dentre os aminoácidos, asparagina é a principal forma de transporte em leguminosas tropicais. Já glutamina predomina em plantas como *Datura stramonium* (LEWIS, 1975), e em gramíneas como *Zea mays* (ARRUDA & SILVA, 1979) e *Triticum aestiva* (SIMPSON & DALLING, 1981). As duas amidas também se destacam como forma de transporte de N no xilema em espécies noduladas ou não como em *Pisum sativum* (BEUSICHEM, 1983), *Pisum arvense* (PATE & WALLACE, 1964), *Lupinus albus* (PATE et al., 1981; ATKINS et al., 1979), além de outras leguminosas de regiões temperadas (SCHUBERT, 1986).

Os compostos nitrogenados transportados no floema são , de modo geral, os mesmos que predominam no xilema. Assim, glutamina é o principal composto encontrado em gramíneas (TULLEY & HANSON, 1979; SIMPSON & DALLING, 1981; LYNZNIK et al., 1982) e em leguminosas as duas amidas se destacam (LAYZELL & LaRUE, 1982; SHARKEY & PATE, 1976). Já, a quantidade de N transportado no floema sob a forma de ureídeos representa uma pequena fração mesmo quando os níveis de ureídeos no xilema são altos (PATE et al., 1984).

O N encontrado no floema pode se originar da degradação de reservas de órgãos senescentes, dos processos de assimilação de nitrato na folha ou da transferência direta de N do xilema. A passagem de compostos nitrogenados diretamente do xilema para o floema é um processo bastante importante, pois garante, juntamente com os outros, o suprimento de N.

para os sítios não servidos pelo xilema. Porém, essa transferência é bastante seletiva, o que diminui a variabilidade na composição do floema. Desse modo, NO_3^- não pode ser transportado para o floema. Já compostos como os aminoácidos básicos (arginina, lisina, histidina) são transferidos com alta eficiência, enquanto a transferência de aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato) é pouco efetiva. Os aminoácidos neutros (asparagina, glutamina, glicina, serina,) são deslocados do xilema para o floema com boa eficiência. A natureza aniônica dos compostos parece ser o fator de regulação de sua transferência para o floema (PATE, 1980).

O descarregamento dos compostos nitrogenados do floema para os sítios de consumo envolve, provavelmente, gasto de energia. Esse processo é bem estudado para frutos imaturos, cujas características estruturais permitem isolar os sítios de consumo (embrião) dos terminais do floema (pericarpo e tegumento da semente). Assim, os compostos nitrogenados chegam ao tecido materno por via simplástica e atingem o embrião através do apoplasto (THORNE, 1985).

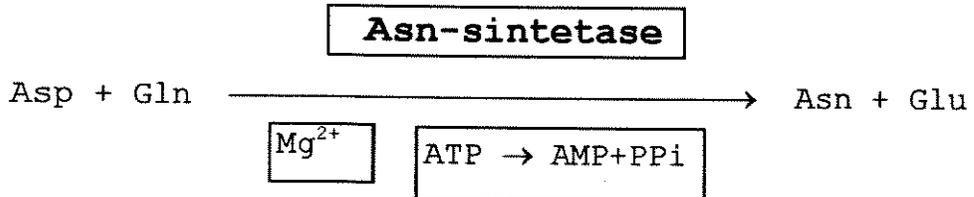
Neste percurso, os compostos sofrem metabolização nos tecidos maternos antes de atingirem o embrião (MURRAY, 1987). Desta forma, os ureídeos parecem não chegar ao embrião, sendo completamente metabolizados nos tecidos maternos (RAINBIRD et al., 1984; PEOPLES et al., 1985b). Asparagina e glutamina são metabolizadas parcialmente antes de atingirem o embrião, sendo que o grau em que este metabolismo ocorre depende geralmente da idade do fruto (PEOPLES et al., 1985b). Porém o

embrião tem plena capacidade para utilizar essas amidas (THOMPSON *et al.*, 1977; LEA *et al.*, 1979; HAGA & SODEK, 1987).

A asparagina foi o primeiro aminoácido a ser detectado em plantas (VAUQUELIN & ROBIQUET, 1806). Dentre os protéicos, é o principal composto nitrogenado presente em leguminosas (LEA & FOWDEN, 1975) e um importante constituinte solúvel acumulado em estruturas vegetativas durante os estádios de pré-florescimento (PATE, 1971, citado por ATKINS *et al.*, 1975). Asparagina e, em menor quantidade, glutamina são os principais constituintes nitrogenados em folhas jovens de *P. sativum* (URQUHART & JOY, 1982); predominam em seiva do floema de frutos de *Lupinus* e *Spartium* (PATE *et al.*, 1974; 1975); o conteúdo de asparagina varia entre 50-70% do N conduzido aos frutos e sementes de *L. albus* (ATKINS *et al.*, 1975); asparagina e glutamina são os principais constituintes nitrogenados da seiva do xilema de leguminosas como *Crotalaria*, *Vicia*, *Pisum*, *Lupinus*, *Trifolium*, *Medicago*, *Lotus*, *Vigna*, *Phaseolus*, e ainda em *Casuarina*, *Myrica* e *Asparagus* (SIECIECHOWICZ *et al.*, 1988a; SELLEDT & ATKINS, 1991,; DAVIES & KING, 1993; HURST & CLARK, 1993; VITÓRIA, 1994;). Asparagina aparece, também, como o principal composto nitrogenado na briófita *Sphagnum fallax* (HEESCHEN *et al.*, 1996).

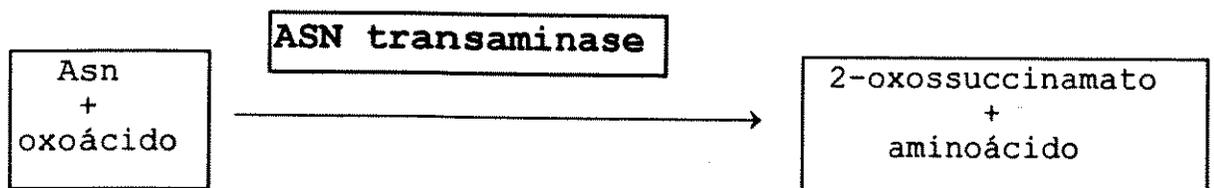
Três rotas possíveis para a síntese da asparagina em plantas foram sugeridas por SIECIECHOWICZ *et al.* (1988a), porém a mais provável é a da produção direta da asparagina a partir de aspartato, pela ação da enzima asparagina sintetase. A reação envolve a transferência do grupo amida da

glutamina (às vezes NH_4^+) para aspartato e necessita de ATP e Mg^{2+} , resultando em asparagina, glutamato, AMP e PPI:



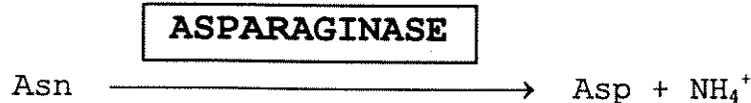
SIECIECHOWICZ *et al.* (1988a) sugeriram, também, quatro prováveis vias para o catabolismo de asparagina, porém as enzimas necessárias para duas dessas rotas ainda não foram isoladas.

A asparagina amino transferase (asparagina-piruvato transaminase, asparagina aminotransferase) é a enzima responsável pela terceira via de degradação da asparagina. Ela foi detectada em soja (STREETER, 1977), ervilha (IRELAND & JOY, 1983) e tremoço (ATKINS *et al.*, 1983) É encontrada no peroxissomo e, também denominada serina-glioxilato aminotransferase. Tem um importante papel nas folhas uma vez que, através da transaminação do glioxilato, permite a formação de glicina e serina utilizadas no ciclo fotorrespiratório (REHFELD & TOLBERT, 1972; STREETER, 1977; TA *et al.*, 1985).



A enzima apresenta alta atividade durante todo o desenvolvimento da folha e baixa atividade em sementes imaturas (IRELAND & JOY, 1981). É influenciada pela luz, apresentando máxima atividade nas primeiras horas do dia, e por compostos como o ATP e certos íons como Ca^{2+} e Cl^- (SIECIECHOWICZ *et al.*, 1988a).

A quarta via, e a melhor caracterizada, é a degradação da Asn envolvendo a enzima L-asparaginase-amino-hidrolase - ASNase. Localizada no citosol das células, a ASNase degrada asparagina liberando como produtos NH_4^+ e aspartato que serão utilizados para a produção de vários outros compostos (SIECIECHOWICZ *et al.*, 1985).



A ASNase foi encontrada inicialmente em sementes imaturas de *L. albus* (ATKINS *et al.*, 1975). Posteriormente foi detectada em raízes, nódulos, folhas, flores e em sementes imaturas de outras espécies (STREETER, 1977; LEA *et al.*, 1978, CHANG & FARNDEN, 1981; SIECIECHOWICZ & IRELAND, 1989).

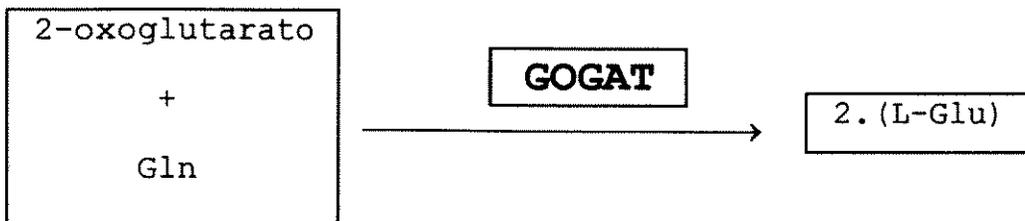
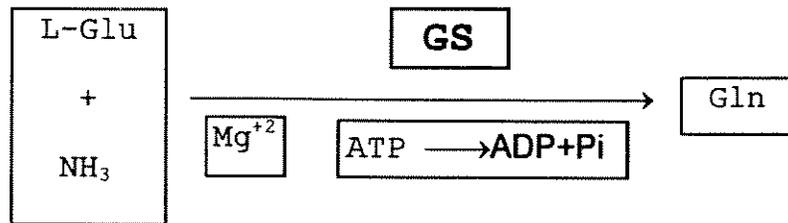
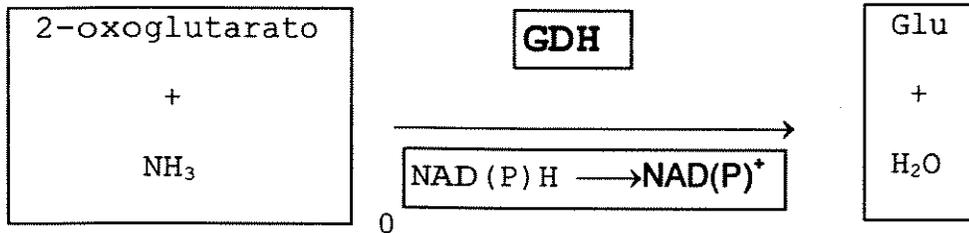
A enzima mostra especificidade para o seu substrato (STREETER, 1977; IRELAND & JOY, 1981; TONIN & SODEK, 1990) e apresenta duas formas, podendo ser dependente ou independente do íon K^+ para a sua atividade (SODEK *et al.*,

1980). Outros íons também podem promover a atividade da ASNase, entre eles Rb^+ , Na^+ , NH_4^+ e Ca^{2+} (SUELTER, 1970; LEA et al., 1978; SODEK et al., 1980; SIECIECHOWICZ & IRELAND, 1989). Porém alguns compostos como a glutamina e a metionina sulfoximina e certos íons (como NH_4^+ em excesso) podem diminuir a atividade da enzima (IRELAND & JOY, 1983; SIECIECHOWICZ et al., 1985; SIECIECHOWICZ et al., 1989; TONIN & SODEK, 1990). A luminosidade é outro fator que influi na atividade da ASNase. Foi observado que na presença de luz a atividade da enzima aumenta, ocorrendo o inverso quando a planta é submetida a um período de escuro (SIECIECHOWICZ et al., 1988b)

As duas formas da ASNase podem ocorrer dentro de um mesmo gênero (LEA et al., 1978; SODEK et al., 1980; VITÓRIA, 1994; AGUIAR, 1995) ou em órgãos diferentes de uma mesma espécie (CHANG & FARNDEN, 1981), sendo que a proporção entre as duas formas depende da espécie de planta, dos órgãos e do estágio de desenvolvimento (SODEK & LEA, 1993).

A atividade da ASNase em tecidos de sementes imaturas está intimamente associada às atividades de outras três enzimas, GDH, GS e GOGAT, que cumprem a função de assimilar o NH_4^+ resultante do catabolismo da asparagina (LOUGH et al., 1992).

GDH e GS/GOGAT, denominadas de enzimas da biossíntese primária de aminoácidos, atuam em duas vias metabólicas distintas, porém o produto de suas atividades é o aminoácido glutamato (MIFLIN & LEA, 1977):



Apesar de ambas as vias atuarem em tecidos vegetais, GS/GOGAT assume papel principal na assimilação de NH_4^+ em plantas uma vez que sua afinidade por esse substrato chega a ser 30 vezes maior que GDH (LEA et al., 1978). GDH, porém,

parece ter a importante função de atuar na desintoxicação desses tecidos, quando o nível de amônia é excessivo (MIFLIN & LEA, 1977).

É interessante notar, também, que essas enzimas têm suas atividades aumentadas após a ASNase ter seu pico de atividade. Esse atraso permite o acúmulo de amônio nos tecidos, favorecendo as atividades destas enzimas (SODEK *et al.*, 1980; LOUGH *et al.*, 1992)).

GS tem demonstrado ser uma enzima cujos mecanismos regulatórios são bastante conhecidos para bactérias. Porém isso não acontece para organismos fotossintetizantes, como plantas e algas. Contudo, sabe-se que a enzima é bastante sensível à mudanças ambientais, sendo afetada por fatores como o regime de luz e a quantidade e natureza da fonte de N (MAURIN & Le GAL, 1997).

Apesar de dados iniciais, obtidos com inibidores, não indicarem qualquer atividade de GDH em cotilédones, trabalhos mais recentes relatam atividade desta enzima em testa, endosperma e cotilédones de leguminosas (MURRAY & KENNEDY, 1980; SODEK *et al.*, 1980; RATAJCZAK, 1986). Contudo, GS/GOGAT demonstra ser a via principal para a assimilação de NH_4^+ no endosperma e embrião (RATAJCZAK, 1986).

O gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae) compreende cerca de 500 espécies espalhadas em áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo (PILBEAM & BELL, 1979). Apesar das espécies deste gênero serem consideradas invasoras, apresentam importância econômica uma vez que são utilizadas no controle de nematóides (MIRANDA, 1981), como forrageiras (RIZZINI E

MORAIS, 1976), no combate à erosão, para adubação verde e como fonte de fibras (MILLER, 1967).

Estudos anteriores demonstraram que crotalaria é uma boa fonte para o estudo da enzima ASNase (VITÓRIA, 1994; AGUIAR, 1995). Optou-se, então, por trabalhar com uma das espécies do gênero, *C. juncea*, utilizando o sistema de cultivo de cotilédones *in vitro*. Esta espécie possui enzima dependente de K^+ e apresenta, como forma de transporte no xilema, as amidas asparagina e glutamina (VITÓRIA, 1994).

A vantagem do sistema de cultivo de cotilédones *in vitro* é que ele permite estudar o crescimento desses órgãos de forma mais precisa, uma vez que os mesmos são mantidos em ambiente cujos fatores são plenamente controláveis e, ainda, a avaliação da utilização de nutrientes pode ser feita sem a interferência de outras partes do fruto (THOMPSON et al., 1977).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Estabelecer um sistema de cultivo *in vitro* para o crescimento de cotilédones imaturos de *C. juncea*;
- determinar neste sistema a influência das amidas asparagina e glutamina sobre as atividades das enzimas ASNase, GS, GOGAT e GDH.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E CULTIVO DAS PLANTAS

As sementes de crotalária (*Crotalaria juncea* L.) utilizadas neste trabalho, foram cedidas pela Seção de Leguminosas do Instituto Agrônomo de Campinas e, posteriormente, multiplicadas em canteiros do Departamento de Fisiologia Vegetal, do Instituto de Biologia (IB), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP.

A fim de acelerar o processo de germinação, as sementes, previamente selecionadas, foram escarificadas com o auxílio de um bisturi e permaneceram em placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com água, por uma noite. Em seguida, em casa de vegetação, as sementes foram transferidas para bandejas plásticas, tendo vermiculita lavada como substrato. As plantas foram mantidas em condições naturais de luz e temperatura, regadas diariamente e receberam solução nutritiva completa de HOAGLAND e ARNON (1950) duas vezes por semana, a partir da segunda semana após o plantio. Atingida a altura de aproximadamente 30 cm, as plantas foram transplantadas para canteiros e regadas quando necessário.

O controle fitossanitário, sempre que preciso, foi efetuado utilizando-se soluções de BENLATE (2,5 g/L) e DECIS (2,0 ml/L) em três aplicações sucessivas, com intervalo de uma semana entre cada uma.

Para experimentos que exigiram a determinação da idade dos frutos, as flores foram marcadas a intervalos de 3 dias a partir de sua abertura. Desse modo, a idade aproximada das vagens foi dada em dias após a antese (DAA).

3.2 CULTIVO DOS COTILÉDONES

3.2.1 MEIOS DE CULTURA

O meio de cultivo líquido de THOMPSON *et al* (1977) foi desenvolvido para cultura de cotilédones de soja e a sua composição é a seguinte:

MACRONUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/L)
KCl	745
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
K ₂ SO ₄	1044

MICRONUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/L)
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6
KI	0,83
NaMoO ₄	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl.5H ₂ O	0,025

FERRO	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/L)
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Na ₂ EDTA	37,25

COFATORES	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/L)
Tiamina	0,04
Mio-inositol	10,0
Ácido nicotínico	0,05
Piridoxina	0,05
Glicina	0,2

FONTE DE CARBONO	CONCENTRAÇÃO FINAL (g/L)
Sacarose	40,0

FONTES DE NITROGÊNIO	CONCENTRAÇÃO FINAL (g N/L)
Gln	1,75
Asn	1,75
Glu	1,75
ALN	1,75
NH ₄ NO ₃	1,75
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,875

O meio foi preparado em água deionizada e o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 1 M. Foram colocados 2 ml deste meio nos frascos de cultura, que foram autoclavados a 120°C, sob pressão de 1 atm por 20 minutos.

As fontes de N foram solubilizadas em água deionizada e 2 ml foram acrescentados aos frascos, assepticamente, por

filtração (MILLIPORE 0,22 μ m). As operações foram realizadas em câmara de fluxo laminar.

Combinações entre fontes nitrogenadas e concentrações de N, quando ocorreram, são especificadas em cada experimento.

Outros dois meios de cultura, descritos por MILLERD *et al* (1975) e CHANDLER *et al* (1983), desenvolvidos para cultura de ervilha, foram utilizados para testes de crescimento com cotilédones de crotalária.

O meio descrito por MILLERD *et al* (1975) apresenta a seguinte composição:

MACRONUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/L)
KCl	400
CaCl ₂	440
K ₂ SO ₄	300
KH ₂ PO ₄	50
MgSO ₄ .7H ₂ O	370

MICRONUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/L)
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,0
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6
KI	0,8
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0,2

FERRO	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/L)
FeSO ₄ .7H ₂ O	55,5
Na ₂ EDTA	74,5

VITAMINAS	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/L)
Tiamina	4,0
Mio-inositol	100,0

FONTE DE CARBONO	CONCENTRAÇÃO FINAL (g/L)
Sacarose	40,0

FONTE DE NITROGÊNIO	[CONCENTRAÇÃO FINAL (g N.L ⁻¹)]
L-Gln	1,75

Os componentes do meio, inclusive a fonte de N, foram solubilizados em água deionizada e o pH ajustado para 4,5 com NaOH 1 M. Em câmara de fluxo laminar, a solução foi esterilizada por filtração (MILLIPORE 0,22 μ m) e 4 ml colocados em frascos do tipo "french-square" de 40 ml, previamente esterilizados em autoclave a 120°C, sob pressão de 1 atm por 20 minutos.

O terceiro meio utilizado foi preparado de acordo com CHANDLER et al (1983) e é composto de:

MACRONUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/L)
CaCl ₂ .2H ₂ O	588
KH ₂ PO ₄	816
K ₂ SO ₄	348
MgSO ₄ .7H ₂ O	481,48

FONTE DE CARBONO	CONCENTRAÇÃO FINAL (g/L)
Sacarose	100,0

FONTE DE NITROGÊNIO	CONCENTRAÇÃO FINAL (g N/L)
Gln	1,75

Os micronutrientes e a solução de Fe-EDTA foram adicionadas nas mesmas concentrações utilizadas para o meio de cultura de THOMPSON (1977). Como os outros meios, este também foi solubilizado em água deionizada. O pH foi ajustado para 5,0 com NaOH 1 M e 4 ml do meio, esterelizado por filtração (MILLIPORE 0,22 μ m), foram adicionados aos frascos autoclavados previamente, nas condições já especificadas.

3.2.2 INOCULAÇÃO E CULTIVO DOS COTILÉDONES

Após coleta e seleção, as vagens intactas, com idade de aproximadamente 39 DAA, foram tratadas com solução de SDS 0,1% e hipoclorito de sódio 0,5%, por 5 minutos. Foram enxaguadas por 3 vezes com água destilada e esterelizada.

Com auxílio de pinças e bisturi, cada fruto foi transferido e aberto em placa de Petri. As sementes foram removidas, transferidas para outra placa contendo papel de filtro umedecido pelo meio de cultura e selecionadas. Sementes de tamanhos uniformes foram transferidas e abertas em uma terceira placa de Petri com papel de filtro. A testa e o endosperma foram eliminados, o eixo embrionário excisado e os cotilédones foram separados e inoculados no meio de cultura contendo a fonte específica de nitrogênio. Foram colocados dois pares de cotilédones por frasco, que foram cobertos com filme de PVC e, posteriormente, levados para cultivo.

A água e todos os materiais utilizados foram esterilizados previamente em autoclave a 120°C, 1 atm de pressão, por 20 minutos. Todo o processo foi feito em câmara de fluxo laminar horizontal.

Os frascos de cultura foram colocados em agitador (130 agitações por minuto) e mantidos à uma temperatura de 25°C sob luz contínua, com irradiância de 24 $\mu\text{E/s/m}^2$, por um período de tempo que variou de 2 a 15 dias, conforme o experimento realizado. Os frascos que apresentaram sinais de contaminação foram eliminados.

Os cotilédones utilizados para as análises foram retirados dos frascos de cultura, lavados em água destilada (3 vezes), enxugados com papel absorvente e pesados.

3.3 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Para extração de proteínas, os cotilédones foram liofilizados. Foi determinada a massa seca dos mesmos, que em seguida foram triturados em almofariz e as proteínas foram extraídas com NaOH 0,2%, por 20 minutos. Foi mantida uma relação de 4ml de NaOH para 30 mg de material.

O material foi centrifugado a 2500 x g por 10 minutos, à temperatura ambiente, e o sobrenadante separado. Este processo foi repetido por 3 vezes e os sobrenadantes combinados foram utilizados para a quantificação de proteínas de acordo com BRADFORD (1975). Misturou-se a 100 μl de amostra, 5 ml de reagente. A reta padrão foi determinada

utilizando-se BSA, num intervalo de 0 a 100 μ g de proteína, através de regressão linear.

3.4- PREPARAÇÃO DE EXTRATOS E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Foram determinadas as atividades de enzimas envolvidas no metabolismo de asparagina, glutamato e glutamina durante o crescimento dos cotilédones de *C. juncea*.

Os ensaios foram feitos com cotilédones colhidos diretamente das plantas ou crescidos em meio de cultura. Os cotilédones retirados de meio de cultura foram lavados com água destilada por 3 vezes, enxutos em papel de filtro, contados e pesados.

3.4.1- PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Foram utilizados dois extratos distintos para se determinar as atividades das diferentes enzimas trabalhadas.

O primeiro, usado para extração da ASNase, foi preparado pela maceração dos cotilédones em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 contendo KCl 50mM , DTT 1 mM, CaCl₂ 160 μ M e glicerol 10% v/v em graal e pistilo previamente resfriados (4°C). O extrato foi centrifugado a 10.000 x g, durante 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi separado e uma alíquota de 1,0 ml foi dessalinizada em coluna de Sephadex G-25 (1 x 8 cm), previamente equilibrada com tampão de extração, que foi mantida em geladeira a 10°C. A fração protéica coletada foi utilizada para a dosagem da enzima.

O outro extrato, utilizado para dosar a atividade das enzimas GS, GOGAT e GDH, foi obtido pela homogeneização do material vegetal, também em graal e pistilo previamente resfriados (4°C), com tampão Imidazol-HCl 50 mM, pH 7,2, contendo 1 mM de DTT. O homogeneizado foi centrifugado e dessalinizado conforme descrito anteriormente e a fração protéica coletada, usada para avaliação das atividades das diferentes enzimas.

Durante todo o procedimento, os extratos enzimáticos foram mantidos em gelo.

3.4.2- DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A - Ensaio para ASNase

A metodologia adotada para a dosagem da atividade da asparaginase (ASNase - E.C. 3.5.1.1) seguiu procedimento desenvolvido por SODEK & LEA (1993), onde a quantidade de NH_4^+ liberado pela ação da enzima sobre a Asn é utilizada para determinar a sua atividade. Para tanto, foram utilizados os seguintes reagentes:

- Tampão Tris-HCl 50 mM, pH=8,0;
- Asn 30 mM solubilizada em Tris-HCl 50 mM, pH=8,0;
- solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 mM;
- H_2SO_4 (concentrado);
- K_2CO_3 50%;

- solução de fenol - 2,5 g de fenol + 12,5 mg de $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (nitroprussiato de sódio) em 250 ml de água deionizada;
- solução de hipocloritode sódio - 1,25 g de NaOH + 5,3 g de Na_2HPO_4 anidro + 2,5 ml de NaOCl 5% em 250 ml de água deionizada;
- NaOH 2 M, previamente titulado¹.

O ensaio foi preparado adicionando-se , em Eppendof, 50 μl de ASN 30 mM a 100 μl do extrato dessalinizado. A mistura foi incubada em banho termostaticado a 30°C, por 1 hora. Para interromper a reação e dar início à difusão de NH_3 , o tubo recebeu 500 μl de K_2CO_3 50% e foi imediatamente fechado com tampa contendo uma gota de 5 μl de H_2SO_4 18 M na sua face interna. A gota de ácido suspensa na tampa capta a NH_3 formando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A difusão de NH_3 ocorre por cerca de 8 horas à temperatura ambiente.

Dois controles e um padrão de NH_4^+ foram montados. O primeiro controle, denominado de "tempo zero", foi uma duplicata do ensaio principal. O segundo, denominado de "branco", foi constituído de 50 μl de Asn 30 mM e 100 μl de tampão Tris-HCl 50 mM. O padrão de NH_4^+ foi feito com 50 μl de Asn 30 mM, 50 μl de tampão e 50 μl da solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os dois controles e o padrão tiveram as reações interrompidas com K_2CO_3 50% imediatamente após a suas montagens. Os tubos

¹ Para a titulação do NaOH , foi colocado em um Eppendorf, 500 μl de água deionizada, uma gota de verde de bromocresol 0,1% (solubilizado em etanol) e uma gota de 5 μl de H_2SO_4 18 M, que foi depositada na tampa do tubo. O tubo foi agitado e o NaOH foi sendo adicionado até o ponto de viragem, que deve ocorrer em torno de 75 μl de NaOH para cada 5 μl de H_2SO_4 , quantidade necessária para neutralizar o ácido sulfúrico.

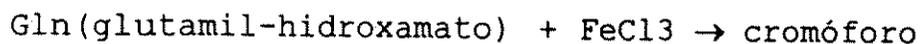
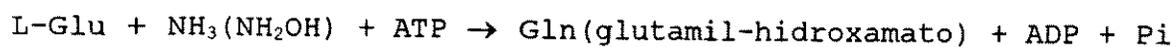
foram agitados, tampados com tampa contendo a gota de 5 μl H_2SO_4 e deixados à temperatura ambiente por cerca de 8 horas.

Completado o período de difusão, a dosagem do NH_4^+ foi feita pelo método de McCULLOGH (1967). A tampa com a gotícula de ácido foi removida e colocada em outro Eppendorf contendo 500 μl do reagente de fenol. Esse reagente foi misturado ao ácido por agitação e 100 μl de NaOH 2 M foi adicionado para a neutralização do ácido. A solução de HOCl foi colocada no tubo e este foi levado para banho termostático por 45 minutos a 37°C , resultando numa coloração azul. O ensaio foi monitorado em espectrofotômetro a 630 nm, usando o branco como controle.

A atividade foi calculada pela diferença de leitura obtida entre o ensaio incubado e a reação no tempo zero e expressa em μmoles de NH_4^+ /h.cotilédone.

B- Ensaio para GS

A avaliação da atividade da enzima glutamina sintetase (GS - E.C. 6.3.1.2) foi feita de acordo com método proposto por RHODES *et al* (1976). Para tanto, foi medida a formação de glutamil-hidroxamato formado pelos substratos glutamato e hidroxilamina. A hidroxilamina é utilizada para substituir a NH_3 :



O ensaio consiste de 100 μ l de ATP 100 mM, 300 μ l de $MgCl_2$ 300 mM, 300 μ l de L-Glu 500 mM, 100 μ l de NH_2OH 100 mM, 400 μ l de tampão Imidazol-HCl 200 mM ($pH=7,2$) e 400 μ l do extrato dessalinizado em volume final de 1,6 ml.

Todos os reagentes foram solubilizados em água. ATP e L-Glu tiveram seus pHs acertados para 7,2 com KOH 1 M. A hidroxilamina foi solubilizada na presença de NaOH na proporção de 2:1 g, respectivamente.

O ensaio foi incubado a 30°C e após 10 e 20 minutos, foram retiradas alíquotas de 400 μ l. À essa alíquota do ensaio foi acrescentado 0,6 ml do reagente de $FeCl_3$. Esse reagente, proposto por FERGUSON & SIMS (1971), é composto de HCl 0,67 M, ácido tricloroacético 0,2 M e $FeCl_3$ 0,37 M.

Ao se adicionar o reagente de $FeCl_3$, a reação é interrompida e obtem-se a formação de um composto (cromóforo) responsável pela coloração amarelada do ensaio.

As amostras foram centrifugadas à temperatura ambiente, à 8000 x g, por 5 minutos. As proteínas precipitadas foram removidas e a quantidade de glutamil-hidroxamato formada foi monitorada em espectrofotômetro a 535 nm. Como controle, foi utilizada uma mistura de 0,6 ml do reagente de $FeCl_3$ com 0,4 ml de água.

Os resultados foram expressos em μ moles de glutamil-hidroxamato/h.cotilédone levando-se em consideração que 1 μ mol de glutamil-hidroxamato, nas condições do ensaio, apresenta uma absorvância em torno de 0,34 (MORI, 1981).

C- Ensaio para GOGAT

A atividade da enzima glutamato sintase ou glutamina-oxoglutarato amidatransferase (GOGAT - E.C. 2.6.1.53) foi avaliada pelo método proposto por DOUGALL (1974).

Neste método, a determinação da atividade da enzima é feita mediante a quantificação do consumo de NADH durante a reação da enzima com os substratos L-Gln e α -KG, como segue:



O meio de reação para o ensaio da enzima apresenta a seguinte composição: 300 μ l de NADH 1 mM, 300 μ l de L-Gln 50 mM, 300 μ l de α -KG 50 mM, 1,5 ml de tampão Tris-HCl 50 mM (pH=7,5) e 600 μ l do extrato dessalinizado. Obteve-se, desse modo, um volume final de 3,0 ml.

Como controle, foi montado um ensaio com os mesmos substratos, porém a glutamina foi substituída por 300 μ l de tampão do ensaio.

Os tubos de ensaio foram mantidos à 30°C e a reação foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm, a 0, 15 e 30 minutos após a adição do extrato. Água foi usada como branco, para calibrar o aparelho.

A atividade da enzima foi avaliada, calculando-se a taxa de oxidação da NADH, cujo coeficiente de extinção é:

$$\text{NADH } E_{340} (\text{mM}) = 6,22$$

A atividade foi expressa em μ moles de NAD^+ /h.cotilédone.

D- Ensaio para GDH

A atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH - E.C. 1.4.1.3)- dependente de NADH, foi medida segundo metodologia proposta por SODEK et al (1980) que, assim como para GOGAT, avalia a oxidação de NADH a 340 nm, na presença de NH_4^+ e α -KG:



O ensaio foi composto de 300 μl de NADH 1 mM, 300 μl de CaCl_2 100 mM, 1,5 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 mM, 300 μl de α -KG 100 mM, 300 μl de tampão Tris-HCl 50 mM (pH=8,2) e 300 μl do extrato.

No ensaio utilizado como controle substituiu-se o $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$ por 1,5 ml de tampão do ensaio.

Os tubos foram colocados em banho termostaticado a 30°C e monitorados em espectrofotômetro a 340 nm a 0, 15 e 30 minutos após a adição do extrato. Água foi usada como branco para calibrar o aparelho

O pH de α -KG foi ajustado para 8,2 com KOH 1 M e todos os substratos da reação foram solubilizados em Tris-HCl 50 mM, pH 8,2.

4 . RESULTADOS

4.1- DEFINIÇÃO DO MEIO DE CULTURA E CRESCIMENTO DOS COTILÉDONES

4.1.1- MEIOS DE CULTURA

Para iniciar os trabalhos com *C. juncea*, foi necessário determinar, primeiramente, um sistema *in vitro* que permitisse estudar o crescimento de seus cotilédones.

Para tanto, os meios de cultura líquidos descritos por MILLERD *et al.* (1975), THOMPSON *et al.* (1977) e CHANDLER *et al.* (1983) foram testados. Utilizou-se como fonte de N a amida glutamina.

Os cotilédones foram incubados por um período de 8 dias nos três diferentes meios de cultura e após esse período, o crescimento dos mesmos foi avaliado. Os resultados, expressos em massa fresca por cotilédone, são ilustrados pela figura 1.

O meio descrito por THOMPSON *et al.* (1977) foi o que apresentou maior eficiência em termos de crescimento. Os dados, expressos em função da massa fresca média dos cotilédones, demonstram que enquanto neste meio ocorreu um aumento de 57,13 mg, nos demais, esse aumento foi de 26,57 mg e 19,32 mg para os meios de Chandler e Millerd, respectivamente. A massa fresca média dos cotilédones ao final dos 8 dias de experimento foi de 65 mg para o meio de Thompson, 34,37 mg para o meio de Chandler e 27,12 mg para

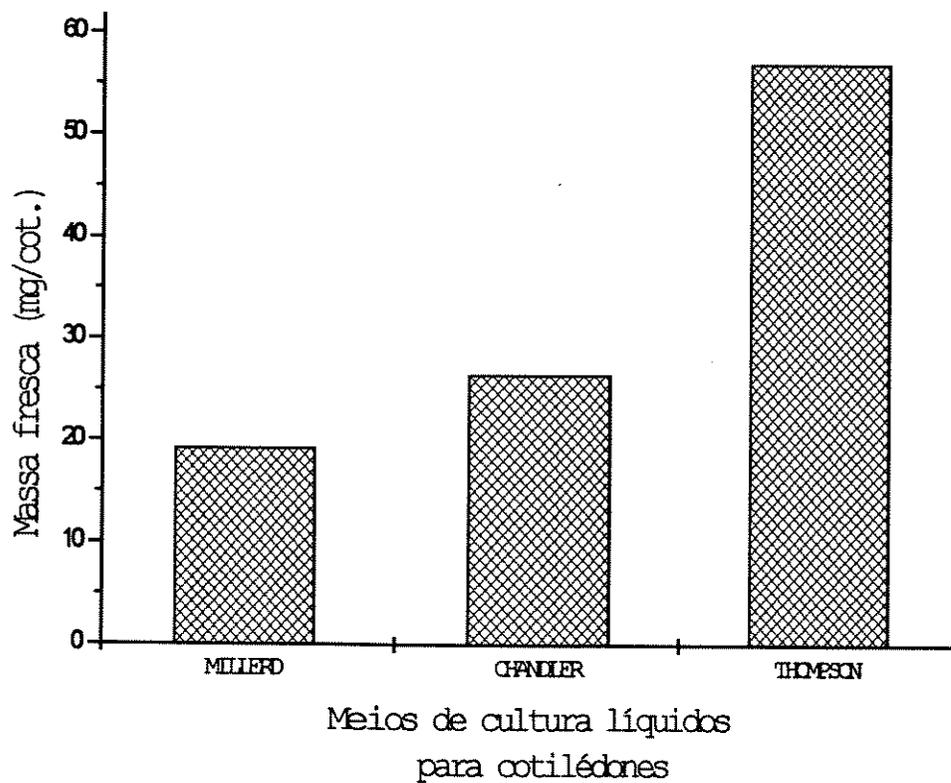


FIGURA 1- Crescimento de cotilédones de *C. juncea* em diferentes meios de cultura líquidos. Cotilédones imaturos aos 39 DAA foram incubados por 8 dias, tendo glutamina como fonte de N. A massa fresca média dos cotilédones no primeiro dia de cultivo era de 7,80 mg.

Millerd. A massa fresca média dos cotilédones no início do cultivo era de 7,80 mg.

O aumento em massa fresca de cotilédones crescidos *in situ* (figura 3) num período equivalente ao do cultivo *in vitro* foi bastante próximo ao obtido pelo meio de Millerd, mas inferior ao observado no cultivo em meio de Chandler e Thompson.

Uma vez que o crescimento dos cotilédones obtido *in vitro*, com o meio de THOMPSON, foi bem superior ao observado *in situ*, não foi feita nenhuma tentativa no sentido de otimizar esse meio de cultivo, que passou a ser utilizado em todos os ensaios posteriores.

4.1.2- TEMPO DE INCUBAÇÃO

Com o objetivo de determinar o tempo em que os cotilédones deveriam ser mantidos no meio de cultura, outro experimento foi conduzido em condições semelhantes. Glutamina foi utilizada como fonte de N e os cotilédones permaneceram no meio de cultura por um período que variou de 2 a 15 dias. O acúmulo de massa fresca e massa seca, bem como o conteúdo de proteínas foram analisados.

De acordo com a figura 2A, nota-se que os ganhos em massa fresca e seca ocorreram quase que paralelamente. Observando as curvas obtidas para massa seca (figura 2A) e proteínas (figura 2B), verifica-se que elas seguem um contorno sigmóide, que é mais acentuado para proteínas, sendo

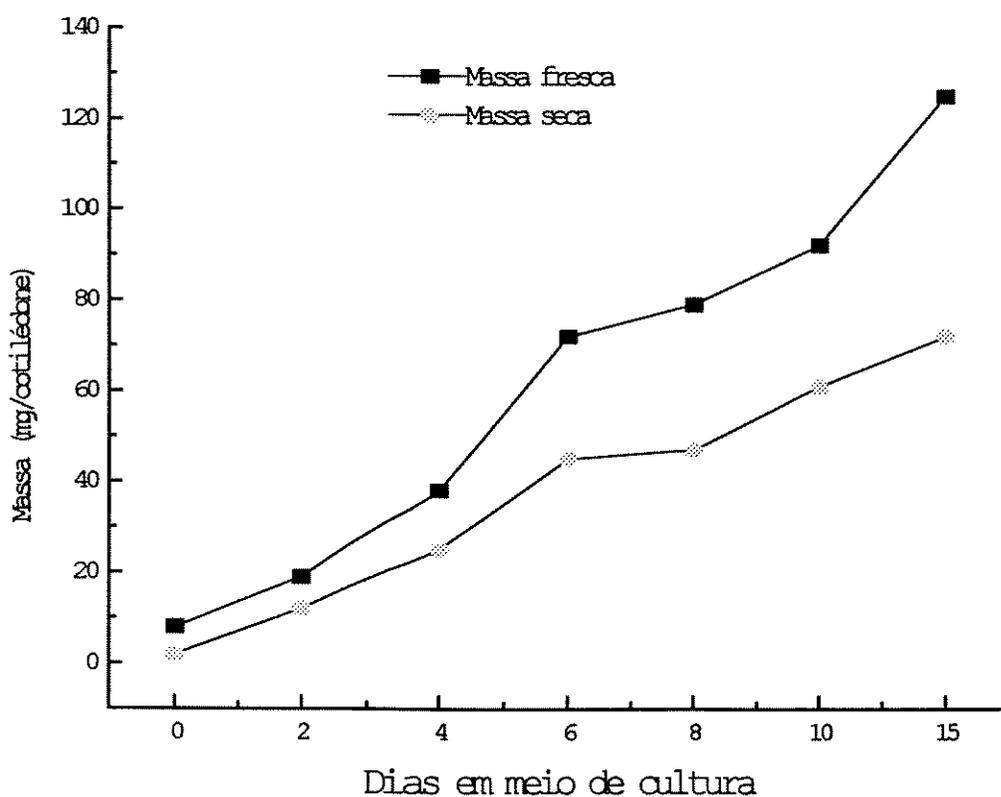


FIGURA 2A- Crescimento de cotilédones de *C. juncea* em meio de cultura líquido por um período de 0 a 15 dias. Cotilédones imaturos com 39 DAA foram cultivados com glutamina como fonte de N.

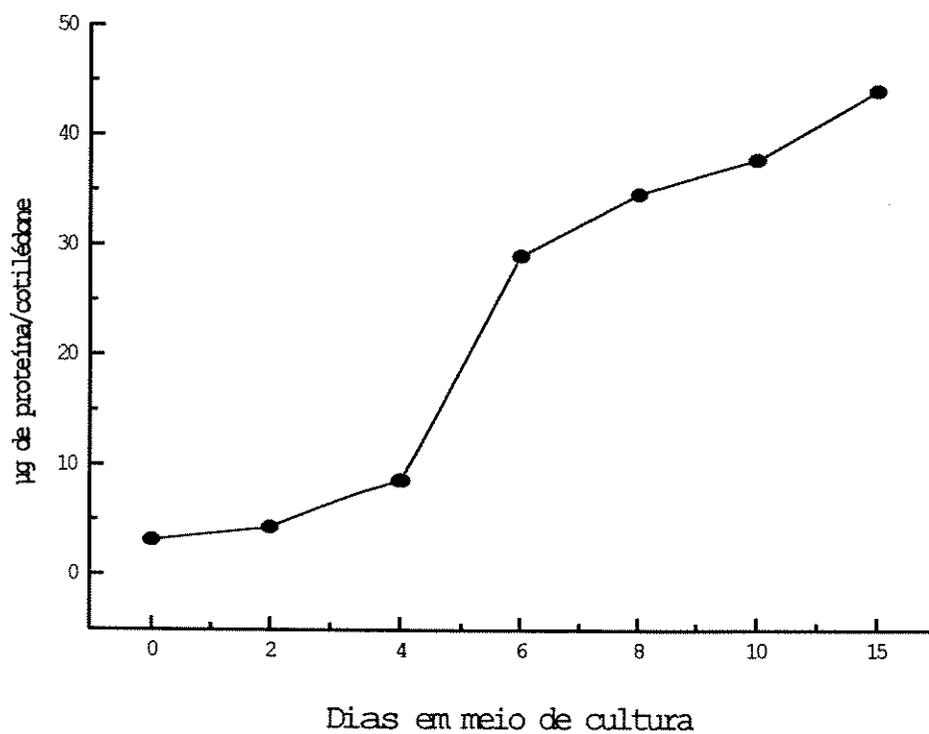


FIGURA 2B- Crescimento de cotilédones de *C. juncea* em meio de cultura líquido por um período de 0 a 15 dias. Cotilédones imaturos com 39 DAA foram cultivados com glutamina como fonte de N.

que o intervalo de 4 a 6 dias após o início da cultura representa a fase onde ocorrem os maiores ganhos.

A partir da análise deste dados, foi estipulado tempo de oito dias de incubação, tendo em vista que esse período apresentou bom crescimento e alto acúmulo de massa.

4.1.3- IDADE DOS FRUTOS

Com o intuito de estabelecer a idade em que os frutos deveriam ser coletados para os experimentos, foi realizada, inicialmente, uma análise do material *in situ* durante a ontogenia do fruto. Para o intervalo que variou de 12 a 45 dias após a antese, foram determinadas as massas fresca e seca das sementes. Os cotilédones, devido ao seu tamanho bastante reduzido, só puderam ser separados do restante da semente depois de 30 DAA.

De acordo com os dados mostrados na figura 3 é possível notar um ganho gradativo em massa o qual torna-se mais acentuado a partir de 30 DAA.

Os valores das massas seca e fresca de cotilédones são expressos para o par, o que facilita a comparação com as sementes. Verifica-se que os aumentos em massa registrados para os cotilédones ocorreram em paralelo aos da semente.

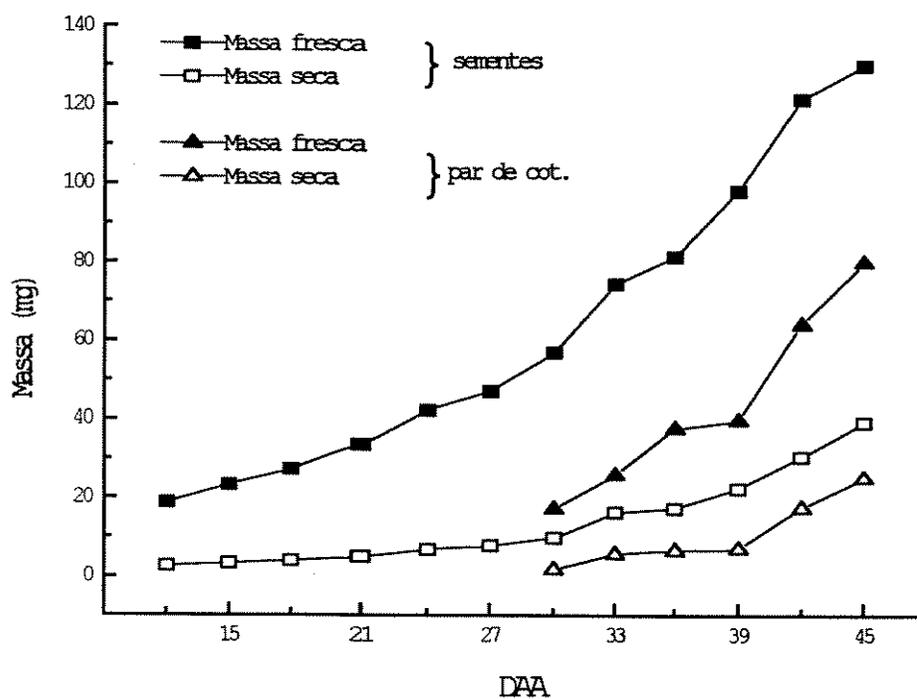


FIGURA 3- Crescimento *in situ* de sementes e cotilédones de *C. juncea*. Sementes colhidas em diferentes DAA. Separação dos cotilédones só foi viável após 30 DAA e os dados, expressos por par de cotilédones, facilita comparação com sementes.

Baseado nos dados obtidos para cotilédones crescidos *in situ*, foi montado um ensaio com cotilédones coletados aos 36, 39, 42 e 45 DAA e cultivados nas condições de cultura já estabelecidas. Os dados deste experimento são mostrados nas figuras 4A e 4B.

A figura 4A demonstra que os cotilédones, coletados no intervalo de 36 a 45 DAA, apresentaram ganhos em massa fresca, que giraram em torno de 40 mg/cotilédone. Já o acúmulo em massa seca, teve uma variação, para este mesmo intervalo, de aproximadamente 4 mg, ficando em torno de 13 mg/cotilédone. Contudo, é possível notar, apesar da pequena diferença existente entre as fases 39 e 45 DAA, que a correspondente a 39 DAA é aquela no qual se obteve o maior crescimento dos cotilédones.

Analisando, também, a diferença em massa obtida entre uma fase e a sua antecedente, é possível verificar que ela será positiva para o primeiro intervalo (39-36 DAA= 3,70 mg/cotilédone para massa fresca e 4,07 mg/cotilédone para massa seca) e negativa para os demais. Isso demonstra que 39 DAA, além de representar a fase de pico, é, também, aquela em que ocorreu maior variação em relação ao ganho em massa fresca e seca.

Pelos dados obtidos para acúmulo protéico, e mostrados na figura 4B, é possível notar que 42 DAA foi a idade de pico para proteínas, porém uma análise entre a diferença entre uma idade e a sua antecedente, mostra que a maior variação em

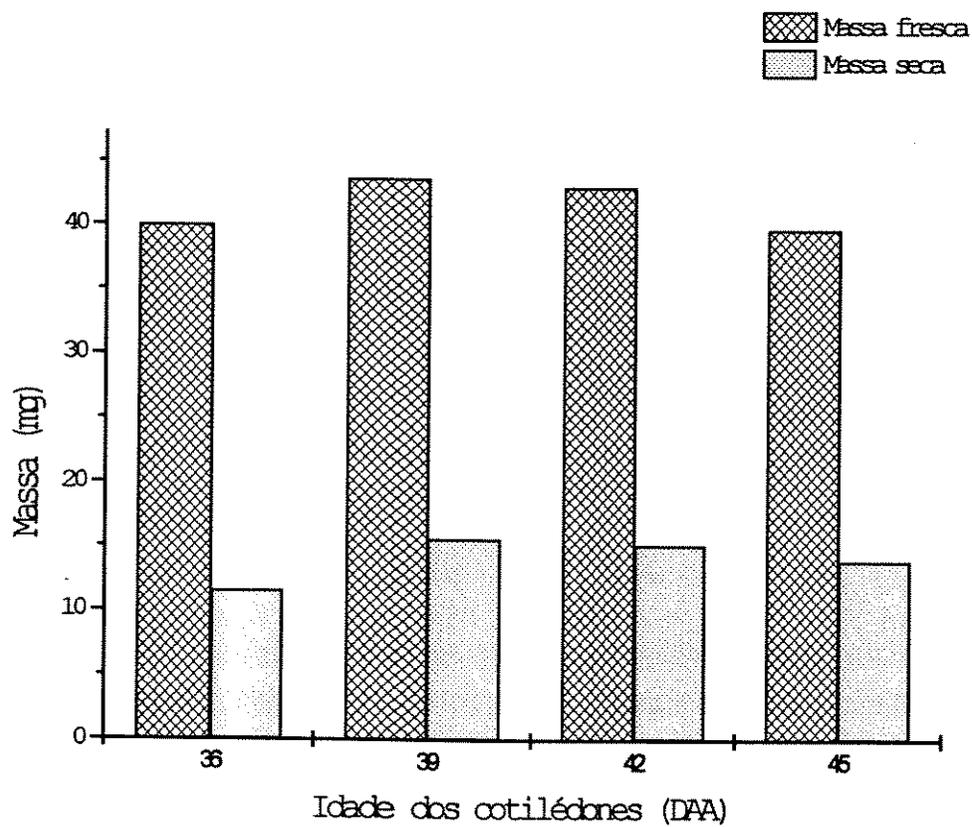


FIGURA 4A- Crescimento de cotilédones de *C. juncea* in vitro. Cotilédones foram cultivados por 8 dias com Gln como fonte de N.

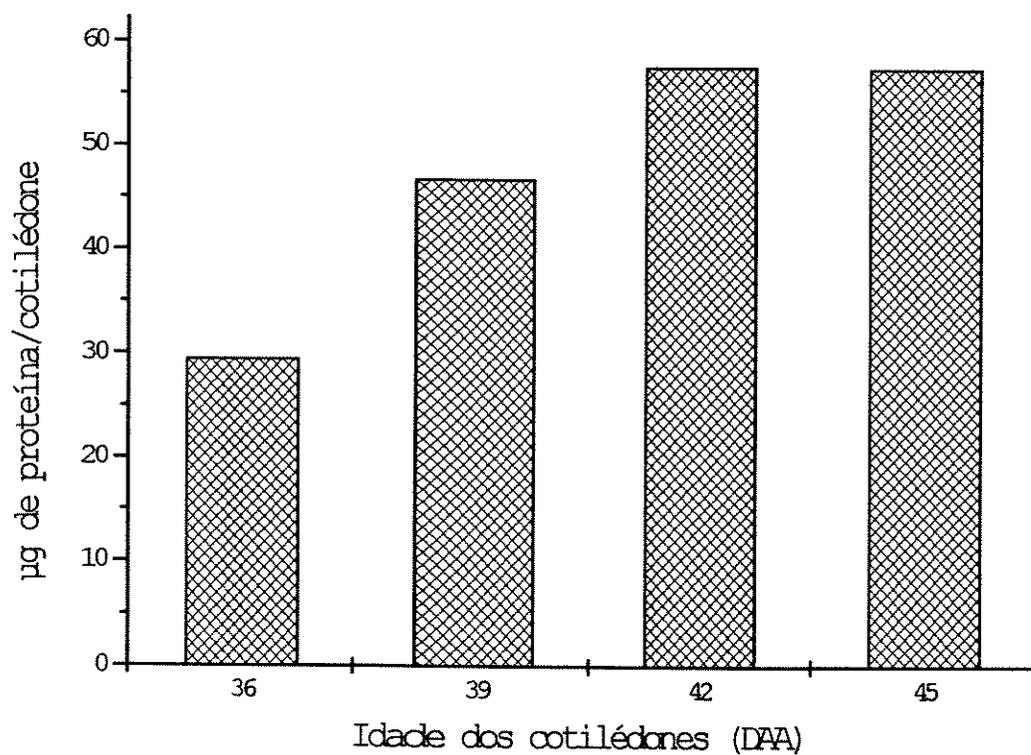


FIGURA 4B- Crescimento de cotilédones de *C. juncea in vitro*. Cotilédones foram cultivados por 8 dias com Gln como fonte de N.

acúmulo protéico ocorre entre 36 e 39 DAA, com ganhos equivalentes a 1,5 vezes o obtido entre 39 e 42 DAA.

Partindo dessas análises, os cotilédones selecionados para os experimentos posteriores foram coletados com 39 DAA. Coincidentemente, os cotilédones utilizados nos experimentos posteriores, também contavam com essa idade.

4.1.4- FONTES DE NITROGÊNIO

Procurou-se, em seguida, determinar a influência de diferentes fontes de N sobre o crescimento dos cotilédones de *C. juncea*. Foram testadas as amidas, glutamina e asparagina, o ureídeo, ALN, e, ainda, NH_4NO_3 , como fontes únicas de N. Os dados deste teste podem ser vistos nas figuras 5A e 5B.

Nota-se, na figura 5A, que, em termos de massa fresca, glutamina e ALN apresentaram rendimentos superiores a 2 vezes ao obtido por asparagina e NH_4NO_3 . Enquanto esta fontes de N apresentaram valores próximos a 20 mg/cotilédone, as primeiras demonstraram ganhos em torno de 50 mg/cotilédone.

Quando se compara a aquisição de massa seca, verifica-se que as diferentes fontes de N apresentam valores decrescentes que seguem a sequência glutamina, asparagina, ALN e NH_4NO_3 , com ganhos de 11,15; 7,02; 5,85 e 4,15 mg/cotilédone, respectivamente. Nota-se, também, que não houve proporcionalidade entre massa seca e fresca. O destaque, neste sentido, foi ALN, onde a massa fresca foi desproporcionalmente mais alta em relação à massa seca.

Já ao se analisar a figura 5B, referente ao acúmulo de proteínas nos cotilédones de *C. juncea*, é possível notar que a amida glutamina proporcionou um ganho superior ao de outras fontes de N, apresentando quase duas vezes mais proteínas que a segunda melhor fonte, asparagina. Enquanto glutamina expressou valores de 67,11, asparagina obteve ganho de 34,86 µg de proteínas/cotilédone. As duas amidas mostram ganhos bastante significativos em relação à ALN e à fonte inorgânica, que obtiveram ganhos de 7,17 e 12,12 µg de proteínas/cotilédone, respectivamente. É possível notar, também, que o ureídeo demonstrou ser a fonte menos eficiente para o crescimento dos cotilédones, uma vez que foi superado pela fonte inorgânica.

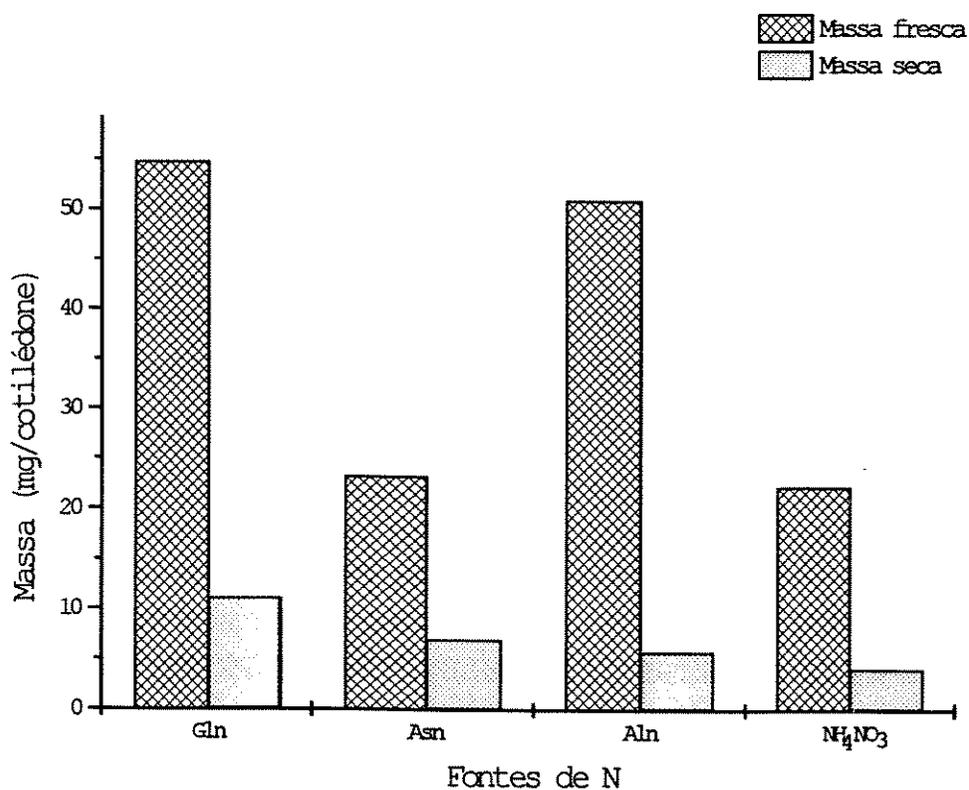


FIGURA 5A- Crescimento de cotilédones de *C. juncea* cultivados com diferentes fontes de N. Cotilédones com 39 DAA foram cultivados durante 8 dias com diferentes fontes de N na concentração de 1,75 g de N/l.

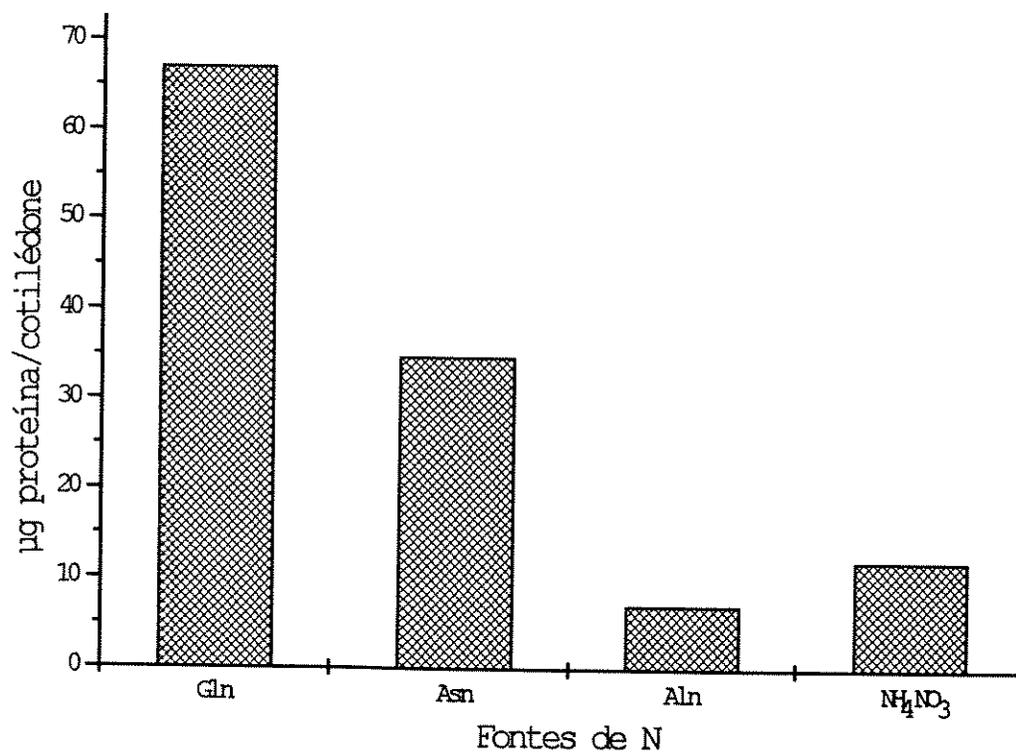


FIGURA 5B- Acúmulo de proteínas em cotilédones de *C. juncea* cultivados com diferentes fontes de N. Cotilédones com 39 DAA foram cultivados por 8 dias com diferentes fontes de N na concentração de 1,75 g de N/l.

4.2 -ATIVIDADE DA ENZIMA ASPARAGINASE

A influência das amidas glutamina e asparagina sobre a atividade da enzima ASNase foi a próxima etapa estudada.

Inicialmente, foi realizado um estudo com a finalidade de estabelecer em qual idade os cotilédones de *C. juncea* apresentavam maior atividade para a enzima ASNase. Foram coletados frutos entre 36 e 45 DAA. Procedida a extração, a atividade da enzima foi dosada. Os resultados obtidos são apresentados na figura 6.

Verificou-se que a fase correspondente a 39 DAA foi aquela em que os cotilédones apresentaram maior atividade para ASNase, coincidindo com o estágio onde também se obteve melhores índices de crescimento.

Utilizando-se cotilédones com 39 DAA cultivados *in vitro*, foi conduzido um experimento com o objetivo de verificar o comportamento da atividade da ASNase na presença das duas amidas como fontes de N. Do extrato vegetal utilizado para dosar a atividade da ASNase foi determinado, ainda, o teor de proteínas. Medidas de massa fresca dos cotilédones também foram feitas.

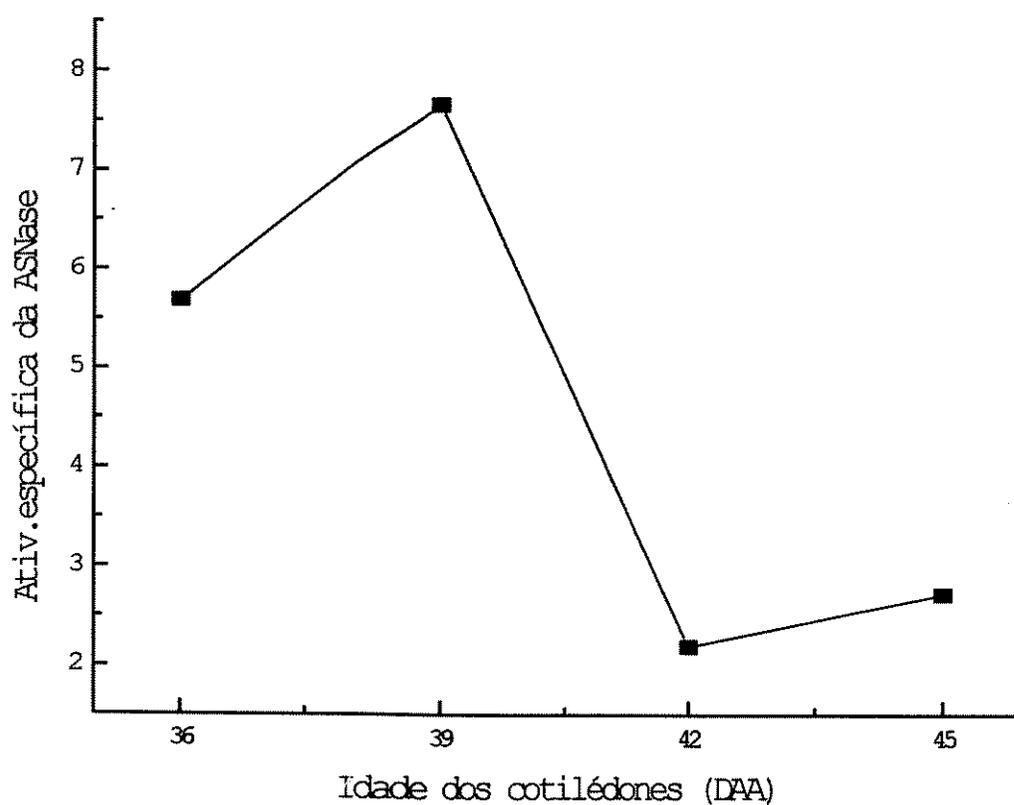


FIGURA 6- Atividade específica da ASNase (nmol NH₄⁺.h/mg proteína) em cotilédones de *C. juncea* coletados no intervalo de 36 a 45 DAA.

A maior atividade da ASNase foi observada quando a fonte de N foi asparagina (figura 7A). A enzima, que no dia inicial apresentou atividade próxima a 8,7 nmoles de NH_4^+ .h/mg de proteína, alcança seu pico (13,5 nmoles de NH_4^+ .h/mg de proteína), no quarto dia após o início da cultura, quando cultivada em meio líquido com essa amida. Após este estágio, a atividade da enzima declinou chegando a um valor próximo ao inicial. Porém, quando esses cotilédones são mantidos com glutamina, como fonte de N, a curva apresenta valores que decresceram durante todo o período de cultivo, chegando ao valor de 2,89. nmoles de NH_4^+ .h/mg de proteína no último dia de cultivo.

Os dados mostrados na figura 7B, que expressam os ganhos em massa fresca, demonstraram que glutamina, assim como nos experimentos anteriores, apresentou maior eficiência que asparagina para o crescimento dos cotilédones de *C. juncea*. Cotilédones cultivados com glutamina apresentaram maior acúmulo em massa fresca, atingindo um valor cerca de duas vezes maior ao alcançado por aqueles crescidos em presença de asparagina.

Os níveis de proteína dos cotilédones (figura 7C) demonstraram um aumento progressivo para as duas fontes de N, embora atinja valores superiores, a partir do quarto dia de cultivo, quando a fonte é glutamina. Os resultados, tanto para crescimento como para proteínas, demonstraram que a diferença entre as atividades da ASNase na presença de

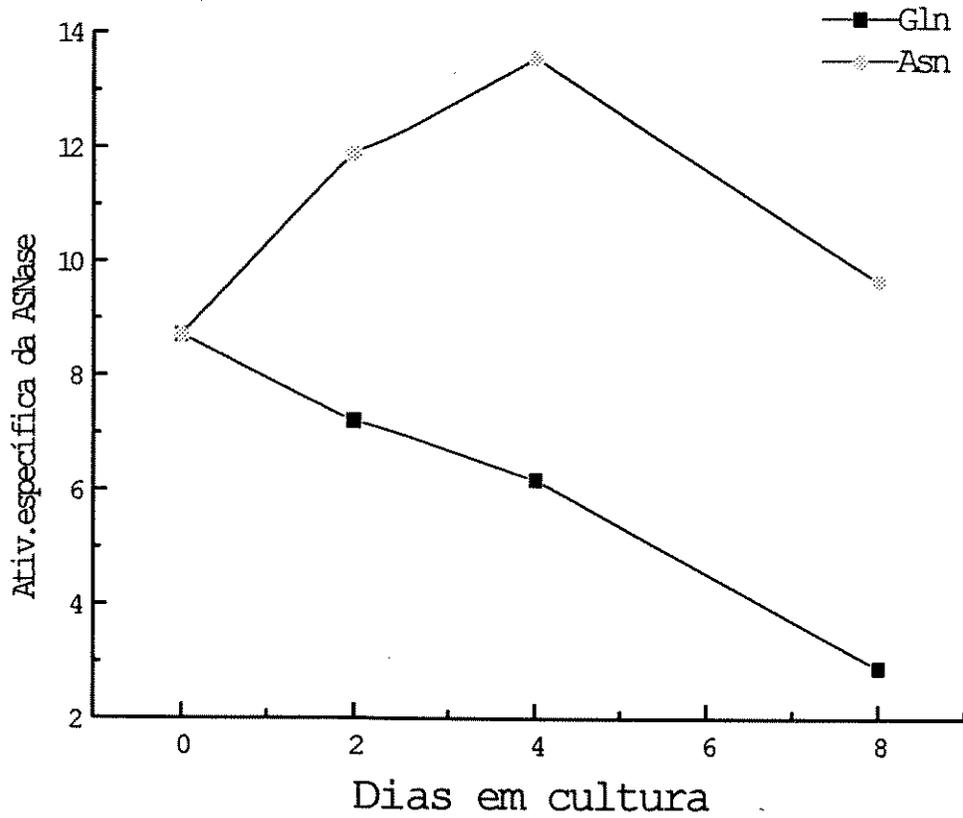


FIGURA 7A- Influência das amidas Gln e Asn sobre a atividade específica da ASNase (nmoles NH_4^+ .h/mg proteína) de cotilédones de *C. juncea*. Cotilédones imaturos com 39 DAA foram cultivados com as amidas por um período de 8 dias.

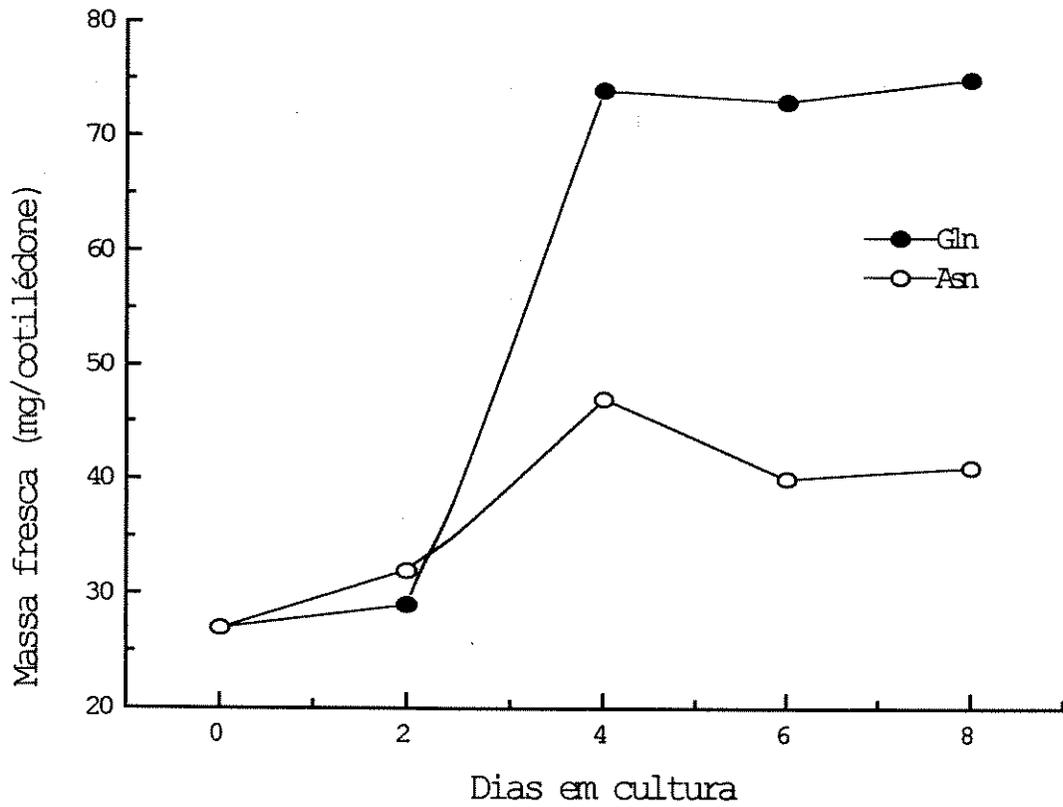


FIGURA 7B- Influência das amidas Gln e Asn sobre o crescimento de cotilédones de *C. juncea*. Cotilédones imaturos com 39 DAA foram cultivados com as amidas por um período de 8 dias.

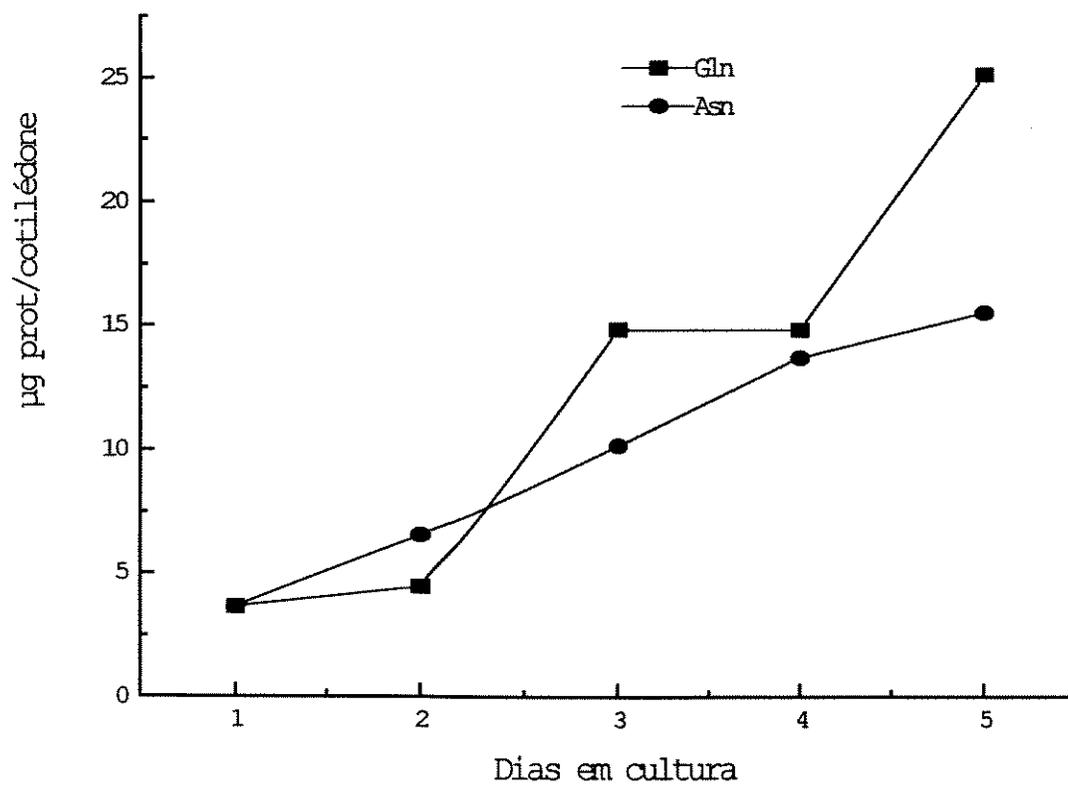


FIGURA 7C- Influência das amidas Gln e Asn sobre o crescimento de cotilédones de *C. juncea*. Cotilédones imaturos com 39 DAA foram cultivados com as amidas por um período de 8 dias.

asparagina ou glutamina não pode ser explicada por crescimento anormal ou deficiência no processo de extração.

Tendo em vista os efeitos opostos da duas amidas sobre a atividade da ASNase, outro ensaio foi realizado utilizando combinações dessas fontes para determinar qual delas exercia efeito sobre a enzima. Os resultados podem ser vistos na figura 8.

Nos controles, onde Asn e Gln foram mantidas como fontes únicas, Asn propiciou maior atividade da enzima, enquanto que Gln diminui essa atividade, o que foi verificado com os dados anteriores. Quando as amidas foram combinadas a atividade da ASNase diminuiu, da mesma forma observada com Gln como fonte única de N. A predominância do efeito da Gln também foi observada quando combinada com Asn em concentração relativa de 1/10 (Gln/Asn).

Portanto, a concentração de Gln influi diretamente sobre a atividade da ASNase, sendo que quanto maior a concentração de Gln, menor é a atividade. Esse fato é constatado ao se comparar os resultados obtidos nos tratamentos Asn, Asn+Gln e Asn+Gln/10. Enquanto o primeiro tratamento, onde Asn é utilizada isoladamente, apresenta a maior atividade para ASNase, os outros tratamentos, que utilizaram combinações entre Asn e Gln, demonstram uma redução nesta atividade conforme a concentração de Gln é aumentada.

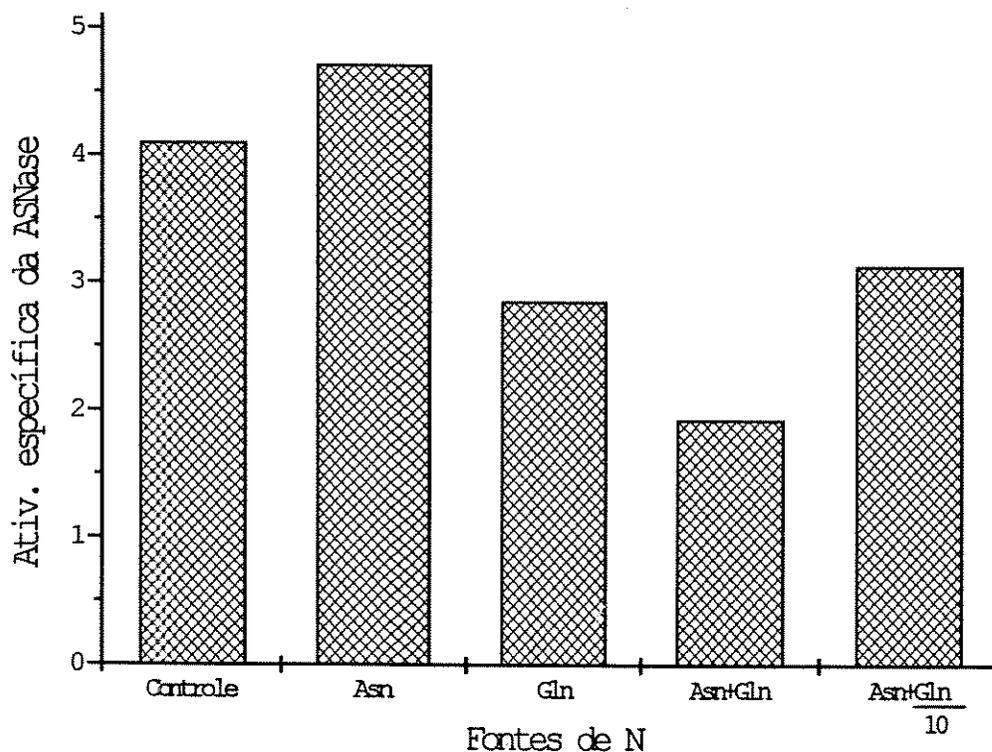


FIGURA 8- Atividade específica da ASNase (nmol NH₄⁺·h/mg de proteína) de cotilédones de *C. juncea* cultivados com combinações entre Asn e Gln. Cotilédones com 39 DAA foram cultivados por 8 dias. Cada fonte presente foi usada na concentração de 1,75 g de N/l, exceto no tratamento Asn+Gln/10, onde Gln está na concentração de 0,175 g de N/l. O tratamento controle expressa a atividade da ASNase no dia de início de cultivo

4.3 ATIVIDADES DAS ENZIMAS GS, GOGAT E GDH

Tendo em vista o efeito de asparagina e glutamina sobre a ASNase, procurou-se determinar qual seria a influência dessas amidas sobre as atividades das principais enzimas envolvidas no aproveitamento de NH_4^+ e, portanto, na formação direta de aminoácidos para a síntese de proteínas de reserva.

Após cultivo *in vitro* durante 8 dias na presença de asparagina e glutamina como fontes únicas de N, verificou-se que asparagina demonstra uma tendência para proporcionar atividades mais elevadas em relação a glutamina (figuras 9A e 9B). Observa-se, porém, que para os cotilédones de *C. juncea*, as diferenças de atividades de GS e GDH proporcionadas pelo cultivo com qualquer dessas amidas são relativamente pequenas.

Por outro lado, a atividade de GOGAT para cotilédones crescidos em meio de cultura contendo asparagina como fonte de N, mostra ser o dobro da atividade alcançada por cotilédones cultivados em presença de glutamina como fonte nitrogenada.

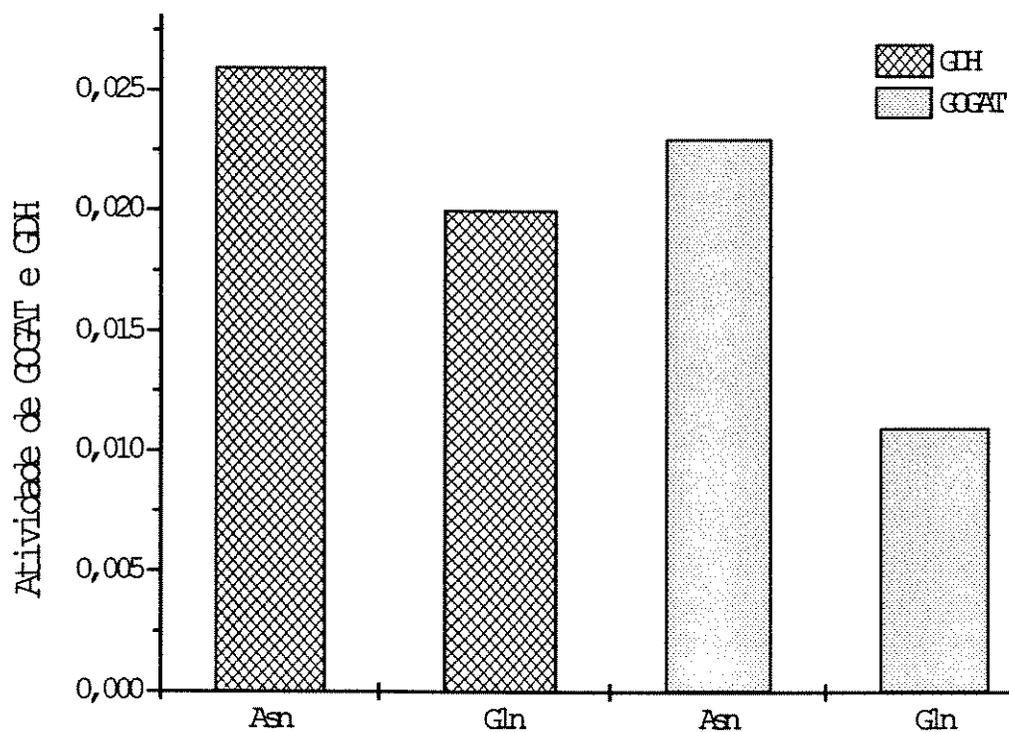


FIGURA 9A- Atividades de GOGAT e GDH em cotilédones de *C. juncea* cultivados *in vitro*. As Atividades são expressas em $\mu\text{moles de NAD}^+ \cdot \text{h} / \text{cotilédone}$ para cotilédones com 39 DAA, cultivados por 8 dias.

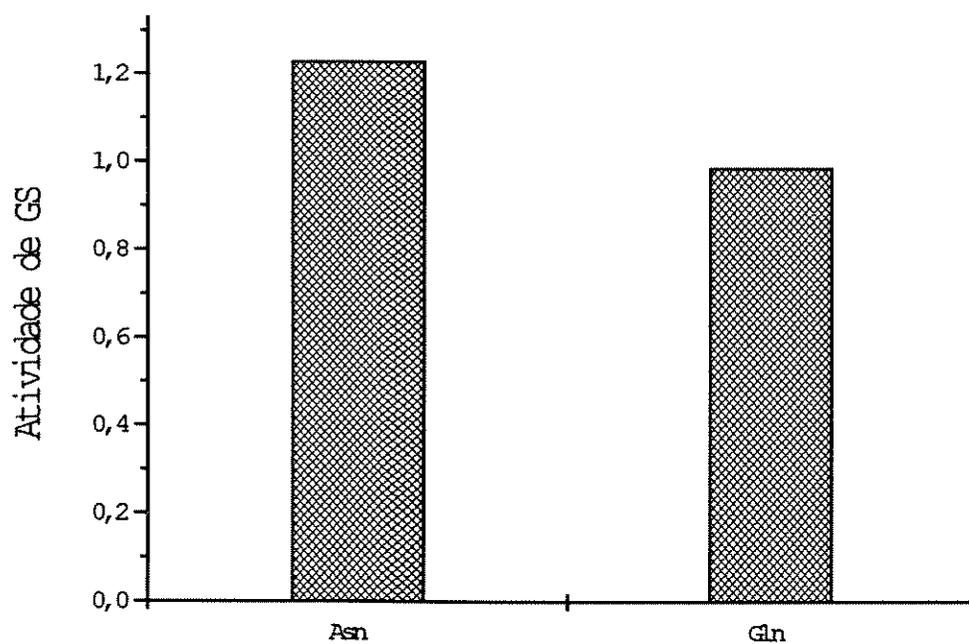


FIGURA 9B- Atividade de GS em cotilédones de *C. juncea* cultivados *in vitro*. A Atividade é expressa em µmoles de glutamil-hidroxiato.h/cotilédone para cotilédones com 39 DAA, cultivados por 8 dias.

4.4 INFLUÊNCIA DE GLUTAMATO SOBRE O CRESCIMENTO DE COTILÉDONES

Tendo em vista que a superioridade de glutamina sobre asparagina, como fonte de N, não pode ser aparentemente explicada em termos de oscilações na atividade de GS, foi conduzido um outro experimento para verificar se a menor eficiência de asparagina como fonte de N ocorreria em função de uma possível deficiência de glutamato, necessário para assimilação de NH_4^+ produzido, entre outros, pelo catabolismo da própria asparagina. Para este fim, glutamato, na concentração de 1,75g de N/l foi incluído nos meios de cultivo contendo glutamina ou asparagina e os resultados obtidos por este ensaio são mostrados na figura 10A, 10B e 10C.

Analisando os dados referentes ao ganho de massa seca (figura 10B) e acúmulo de proteínas (figura 10C), é possível inferir que glutamato, quando usado isoladamente, não demonstra ser uma fonte de N tão eficiente quanto as amidas, para o crescimento dos cotilédones de *C. juncea*. Quando glutamato é utilizado em combinação com asparagina ou glutamina, exerce ação inibitória sobre o crescimento desses cotilédones reduzindo, em menor ou maior grau, o ganho em massa (fresca e seca) e o acúmulo de proteínas proporcionados por essas fontes, quando utilizadas isoladamente.

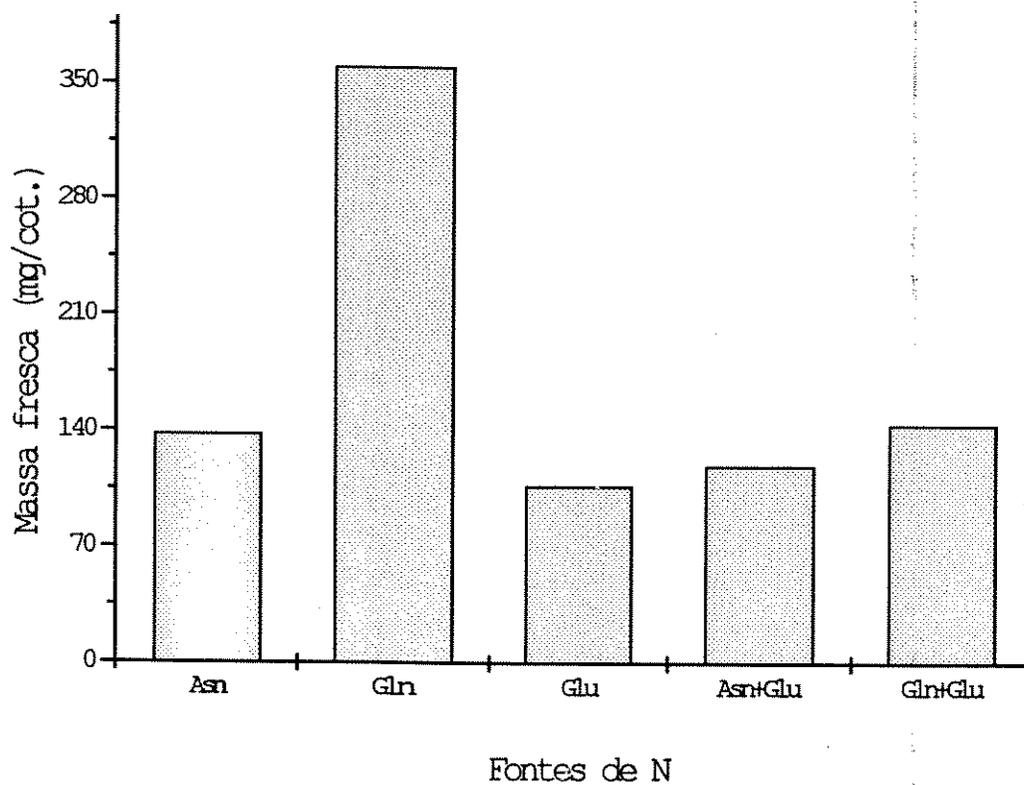


FIGURA 10A- Efeito de Glu sobre o crescimento de cotilédones de *C. juncea*. Cotilédones com 39 DAA foram cultivados por 8 dias . Cada fonte foi adicionada na concentração de 1,75 g de N/l.

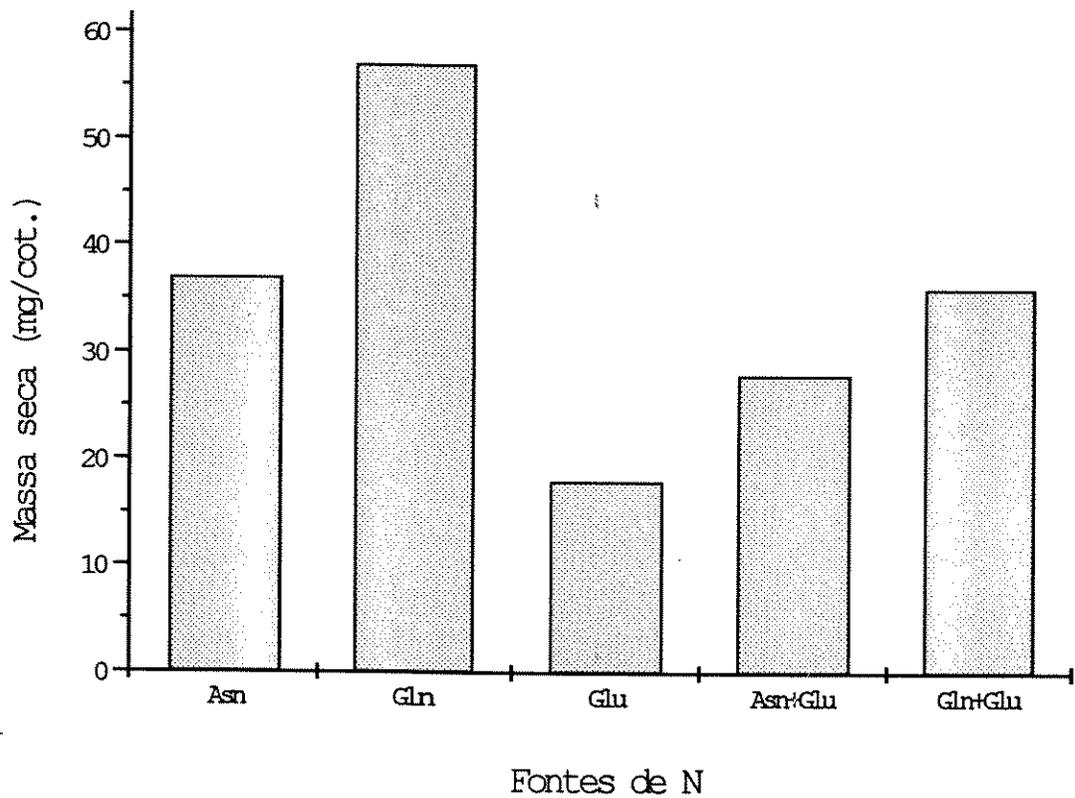


FIGURA 10B- Efeito de Glu sobre o crescimento de cotilédones de *C. juncea*. Cotilédones com 39 DAA foram cultivados por 8 dias . Cada fonte foi adicionada na concentração de 1,75 g de N/l.

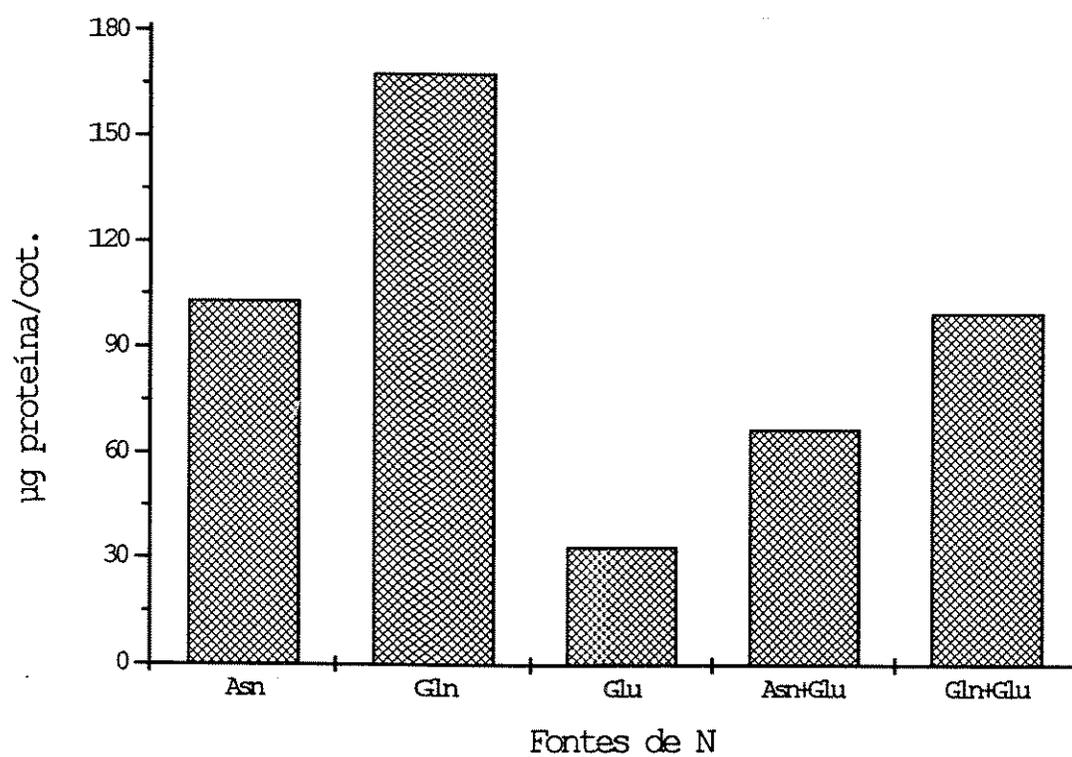


FIGURA 10C- Efeito de Glu sobre o crescimento de cotilédones de *C. juncea*. Cotilédones com 39 DAA foram cultivados por 8 dias . Cada fonte foi adicionada na concentração de 1,75 g de N/l.

5. DISCUSSÃO

5.1- DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO *IN VITRO* PARA OS COTILÉDONES DE *C. juncea*.

O crescimento de cotilédones de *C. juncea in vitro*, mostrou-se adequado, para os fins deste estudo, quando coletados aos 39 DAA e cultivados por 8 dias, no meio de cultura líquido descrito por THOMPSON *et al.* (1977).

Para chegar a esta conclusão foi necessário avaliar variáveis como o meio de cultura, o estágio ideal para coleta do material, tempo de cultivo e fontes de N adequadas. Porém estas análises não foram realizadas com o intuito de otimizar as condições de cultivo, e sim, para encontrar aquelas que fossem adequadas para a realização dos estudos com as diferentes enzimas.

As citadas condições, utilizadas neste trabalho, foram consideradas adequadas pois proporcionaram resultados de crescimentos mais elevados que aqueles observados para cotilédones coletados *in situ*. A comparação dos dados obtidos na figura 1, para cotilédones de 39 DAA crescidos por 8 dias em meio de THOMPSON, com os dados de massa fresca de cotilédones coletados de plantas no período de 39 a 45 dias (intervalo de 6 dias) da figura 3, demonstra este resultado: enquanto que os cotilédones coletados *in situ* apresentam um ganho em massa fresca de cerca de 21,1 mg num período de 9

dias, *in vitro* esse valor atinge um ganho de 57,13 mg no período de 8 dias de cultivo.

O maior crescimento de cotilédones cultivados *in vitro* comparado com aqueles crescidos *in situ* também foi obtido em outros estudos: THOMPSON et al. (1977), trabalhando com cotilédones de soja, cultivados com glutamina, por um período de 6 dias, obtiveram ganhos em massa fresca de 20,9 mg *in situ* e 58 mg *in vitro*; HAGA & SODEK (1987), utilizando as mesmas condições para o crescimento de soja, também observaram esse fato.

Durante a incubação de cotilédones, é comum obter uma curva sigmoideal para o crescimento e, principalmente, para acúmulo de proteínas de reserva. A fase de crescimento lento observada no início do cultivo possivelmente constitui um período de adaptação fisiológica ao novo meio. Logo em seguida vem uma fase de rápido crescimento que tende a, gradativamente, atingir valores mais estáveis.

Na literatura, geralmente, o tempo de incubação usado para os sistemas *in vitro* é escolhido de modo a englobar a fase de crescimento rápido e alguns dias após este estágio. Esse tempo pode variar em 5 (LEA et al., 1979 - trabalhando com ervilha), 6 (THOMPSON et al., 1977 - cultivo de soja), 7 (SKOKUT et al., 1982 - soja) ou mais dias. Sabe-se, ainda, que cotilédones em condições de cultivo *in vitro* são capazes de sintetizar proteínas por um período maior que 8 dias (MILLERD et al., 1975).

No experimento ilustrado pela figura 2, em que os cotilédones de crotalária foram mantidos em meio de cultura

por até 15 dias, nota-se que, para essa planta, a fase de maior acúmulo de massa e de proteínas ocorre entre o período de 4 a 6 dias. Portanto, o prazo de 8 dias foi determinado como o adequado para o crescimento desses cotilédones. É importante notificar, também, que neste intervalo, a quantidade de N no meio ainda não é limitante, uma vez que a síntese protéica se prolonga por mais dias.

A idade dos cotilédones utilizados para o cultivo *in vitro* é outro fator que influi no crescimento (THOMPSON et al., 1977). Analisando os dados obtidos na figura 4, é possível notar que os cotilédones de *C. juncea* apresentam um aumento de crescimento proporcional ao seu tamanho inicial e que gira em torno de 40 mg para massa fresca. Esses resultados também foram demonstrados para soja pelos trabalhos de HAGA & SODEK, (1987) e THOMPSON et al., (1977), que obtiveram um ganho de aproximadamente 20 mg/cotilédone.

Estudos realizados por THOMPSON et al., (1977) e confirmados por HAGA & SODEK, (1987) mostraram que cotilédones de soja a partir de 20 DAA apresentaram um ganho constante em massa seca. Já para proteínas, esse ganho constante ocorreu com cotilédones a partir de 30 DAA. Os dados mostrados na figura 4, para cotilédones de *C. juncea* cultivados por 8 dias, confirmam que a partir de 39 DAA o ganho em massa seca se torna praticamente constante e que os ganhos protéicos se estabilizam a partir de 42 DAA

Estudos anteriores demonstraram que a glutamina é a mais eficiente fonte de N utilizada pelos cotilédones de soja (THOMPSON et al., 1977; HAGA & SODEK, 1987) e de ervilha (LEA

et al., 1977) para a síntese protéica e a que proporciona maior ganho em massa seca. Os dados obtidos confirmaram essa tendência também para os cotilédones de *C. juncea* (figura 5). Presumivelmente isso deva ocorrer porque a glutamina é uma fonte de rápida absorção, baixa toxicidade, fácil conversão a glutamato e outros aminoácidos, além de participar de várias reações biológicas importantes (THOMPSON *et al.*, 1977).

O crescimento de cotilédones utilizando asparagina como fonte de N foi cerca de 30% menor que glutamina. Apesar de LEA *et al.* (1977) terem mostrado que, para ervilha, asparagina é uma fonte tão eficiente quanto glutamina, trabalhos com soja (THOMPSON *et al.*, 1977; SKOKUT *et al.*, 1982; HAGA & SODEK, 1987) exibiram a mesma tendência apresentada por crotalária.

SKOKUT *et al.*, (1982) demonstraram que o N derivado do grupamento amida da asparagina se acumula no meio de cultivo e sugeriram que houvesse baixa atividade das enzimas de assimilação de NH_4^+ , o que explicaria a menor eficiência da Asn como fonte de N. Nossos dados demonstram, porém, que a atividade de GS é até superior quando a fonte de N é asparagina (figura 9), o que coloca em dúvida a hipótese de SKOKUT *et al.*

Por outro lado, a deficiência nos processos de assimilação de NH_4^+ pode resultar não apenas de uma baixa atividade de GS, mas também por falta de glutamato. Porém nossos resultados não confirmam essa hipótese, tendo em vista que a inclusão de glutamato no meio de cultura não melhorou a eficiência obtida com asparagina (figura 10). De qualquer

forma, a deficiência metabólica em relação à assimilação de amônia, aliada a efeitos de toxicidade desse acúmulo ainda poderia explicar a menor eficiência de asparagina, como fonte única de N, em relação a glutamina.

Além de asparagina e glutamina, outras fontes de N foram estudadas neste trabalho. Destas fontes, ALN e NO_3^- foram utilizados por serem, junto com as amidas, os principais componentes do transporte de N em crotalária. Já NH_4^+ é a forma de N inorgânico assimilada em reações catalizadas pela GS ou por GDH.

ALN foi uma fonte de N pouco eficiente para o crescimento de cotilédones de *C. juncea* crescidos *in vitro*. A baixa eficiência de ALN poderia estar associada ao fato que os ureídeos (ALN e ALC) não são importantes no transporte de N em crotalária (VITÓRIA, 1994). Entretanto, esta possibilidade parece pouco provável, uma vez que em soja, uma leguminosa onde esses ureídeos predominam como forma de transporte, ALN também não foi eficiente como fonte única de N para o cultivo de cotilédones (HAGA & SODEK, 1987).

O uso de ALN proporcionou maior aumento de massa fresca, sem o incremento concomitante de massa seca. Isso sugere que esta fonte de N provoca um acúmulo de água no tecido cotiledonar maior que o observado para as outras fontes.

ALN foi a segunda pior fonte de N se considerada a massa seca, e a pior do ponto de vista do acúmulo de proteínas.

Vários fatores podem afetar a utilização da ALN como fonte de N para cotilédones crescidos em meio de cultura. A baixa absorção da ALN do meio de cultura pode ser um fator

limitante para a sua utilização assim como uma rota metabólica incompleta para a utilização de ureídeos como fonte de N, uma vez que ainda não foi demonstrado qualquer atividade de enzima que degrade o ácido alantóico em cotilédones (HAGA & SODEK, 1987). RAINBIRD *et al.* (1984) demonstraram que *in vivo* os ureídeos são metabolizados nos tecidos do fruto antes de atingirem os cotilédones e que asparagina e glutamina constituem as principais formas de N utilizadas para a nutrição desses órgãos. Isso poderia explicar a ausência de um sistema metabólico eficiente para a utilização de ALN nos cotilédones (HAGA & SODEK, 1987).

NH_4NO_3 apresentou, dentre as fontes testadas, baixa eficiência para manter o crescimento de cotilédones de *C. juncea*. Dados semelhantes foram obtidos para soja e ervilha por THOMPSON *et al.* (1977), LEA *et al.* (1979) e HAGA & SODEK (1987).

O NO_3^- , uma forma de transporte de N exclusiva do xilema (PATE, 1980), parece ser totalmente metabolizado antes de atingir o fruto. Tentativas de detectar atividade da enzima redutase de nitrato em cotilédones imaturo foram infrutíferos (MORI & SODEK, 1983). Portanto, é possível que a pouca utilização de NH_4NO_3 como fonte de N se deva à presença do íon NH_4^+ .

5.2- ATIVIDADE DA ASNase

A enzima ASNase desempenha um importante papel na formação de proteínas de reserva em cotilédones de

leguminosas. Responsável por degradar a Asn que chega ao fruto em desenvolvimento, sua atividade gera como produtos elementos chaves que são utilizados diretamente na síntese de outros aminoácidos.

Essa via metabólica envolve, além da ASNase, outras duas enzimas importantes, GS e GOGAT, que assimilam o NH_4^+ e o transformarão em um outro produto passível de ser usado para a síntese de aminoácidos, através de transaminações, o glutamato.

A atividade da ASNase varia de acordo com o material estudado. LEA et al. (1977), trabalhando com *Lupinus polyphyllus* encontrou atividade de 3,51 nmol/min/mg proteína para o extrato bruto; CHANG & FARNDEN (1981), usando extrato bruto de *L. arboreus*, obteve atividade de 9,1 nmol/min/mg prot.; AGUIAR (1995) obteve, para extrato bruto de três diferentes espécies do gênero *Crotalaria*, as seguintes atividades específicas (nmol/min/mg de prot.): *C. zanzibarica* = 0,003, *C. paulina* = 0,0038 e *C. juncea* = 0,023; CHAGAS (1997) obteve, para extrato bruto de ervilha, atividade de 16 nmol/min/mg de proteína. Os dados obtidos por nós mostraram atividade de 0,145 nmoles/min/mg prot. Nota-se que as atividades obtidas para crotalária são bem inferiores àquelas obtidas para *Lupinus* e ervilha. Vale destacar aqui, que o material utilizado para esses experimentos foi coletado na fase de maior atividade da ASNase, o que explica a menor atividade obtida por AGUIAR (1995) para esta mesma espécie.

Além da atividade da ASNase variar de acordo com a planta estudada, também pode ser diferente de acordo com o

órgão, ou parte do órgão estudada. CHANG & FARNDEN, 1981, demonstrou que a atividade de ASNase varia de acordo com a região da raiz e a idade das folhas em espécies de *Lupinus*. HOSTALÁCIO *et al.* (1985) obtiveram dados onde o pico de atividade de ASNase, em feijão, ocorre primeiro no cotilédone e atinge níveis praticamente iguais em testa e cotilédone. SODEK *et al.*, 1980, demonstraram que o pico de atividade em testa de ervilha, além de ocorrer antes do pico de atividade no cotilédone, o faz em maior intensidade.

Quando os cotilédones de *C. juncea* são submetidos a cultivo *in vitro* com as duas amidas, verifica-se que a atividade da ASNase segue os mesmos padrões obtidos para soja (TONIN & SODEK, 1990). O aumento de atividade da ASNase observado até o quarto dia de cultura em meio com asparagina deve-se, provavelmente, à necessidade de sustentação da síntese de todos os outros compostos nitrogenados que entrarão na biossíntese das proteínas de reserva (TONIN, 1988).

Após essa fase, ocorre uma queda na atividade da ASNase, que chega a atingir, no oitavo dia de cultivo, valor próximo à atividade inicial. Essa diminuição, também observada em cotilédones de soja, foi explicada por TONIN (1988) como sendo ação de alguma substância inibidora sintetizada a partir do início desse declínio.

Quando glutamina é utilizada como fonte de N para o crescimento de cotilédones de *C. juncea* ocorre uma diminuição gradativa da atividade da ASNase desde o início até o final

do cultivo. Resultados semelhantes foram obtidos por TONIN (1988), para soja.

Crescimento anormal ou mesmo uma deficiência no processo de extração não podem justificar essa diferença no padrão de atividade da enzima para as duas amidas, uma vez que os níveis de proteínas presentes nos extratos tiveram um aumento progressivo.

Duas hipóteses poderiam explicar esse comportamento da enzima: ou asparagina estimularia a atividade da enzima ou glutamina, agindo de modo contrário, inibiria esta atividade.

Os resultados ilustrados na figura 9 esclarecem essas hipóteses ao ilustrar claramente a inibição da atividade da enzima por glutamina. Neste experimento, verifica-se que quanto maior é a concentração de glutamina no meio de cultura, maior é o grau de inibição ao qual a enzima está submetida. Assim, quando glutamina é utilizada na mesma concentração que asparagina a atividade da ASNase se reduz pela metade, enquanto que glutamina usada na concentração de 1/10 de asparagina reduz a atividade em cerca 30%.

Conforme sugerido por TONIN (1988), os resultados indicam que essa diminuição na atividade, seria devido a uma provável inibição da síntese da enzima por glutamina. Como o nível de degradação se mantém, a quantidade de enzima presente se reduz, o que refletirá diretamente sobre sua atividade, fazendo-a diminuir.

Os dados nos permitem ainda, calcular a taxa de acúmulo de proteínas por cotilédone. Sabendo-se que a variação protéica no período de 0 a 8 dias de cultura é de 67,11 μg

prot./cotilédone, quando glutamina é utilizada como fonte e que essa variação para asparagina é de 34,86 μg prot./cotilédone, chega-se a valores de incorporação de N de cerca de 4 nmoles N/h/cot., para glutamina, e de 2,07 nmoles N/h/cot., para asparagina.

Os valores de atividade de ASNase, dados em nmoles de NH_4^+ /h/cotilédone, são , respectivamente, de 42,36 e 59,29, para glutamina e asparagina. Esses dados nos permite deduzir que essas atividades de ASNase são suficientes para permitir o acúmulo protéico verificado para ambas as fontes. A menor eficiência da fonte asparagina, em relação a glutamina, não pode ser explicada por alguma limitação na atividade da ASNase.

5.3- ATIVIDADES DAS ENZIMAS GS, GOGAT E GDH`

As atividades de GDH e GS (figura 9) praticamente não apresentaram grandes diferenças quando as fontes de N utilizadas para o cultivo de cotilédones de *C. juncea* foram as amidas asparagina e glutamina. No entanto, é possível notar estes valores foram consistentemente maiores quando asparagina foi usada como fonte de N.

Relacionando as atividades de GS e GDH com a ASNase, é possível inferir que essa ligeira vantagem da asparagina sobre glutamina se deva à maior atividade da ASNase, que ocorrendo até o quarto dia de cultivo (figura 7), libera substrato (NH_4^+) para a utilização por parte dessas enzimas.

Verifica-se , também, que a atividade de GS é bastante superior à GDH, compatível com o fato de esta ser via preferencial para a assimilação de NH_4^+ em cotilédones de *C. juncea*.

GOGAT, contudo, demonstrou atividade mais elevada quando asparagina foi usada como fonte de N, atingindo um valor maior que o dobro da atividade alcançada quando a fonte de N no meio de cultivo foi glutamina. MIFLIN & LEA (1977) notaram que a enzima é inibida pela presença de glutamina.

Apesar da atividade de GOGAT ser mais baixa em cotilédones cultivados com glutamina, isso não chega a ser um fator limitante em função da alta eficiência de utilização desse aminoácido como fonte de N.

Os dados para acúmulo de N, apresentados no item anterior, podem também ser utilizados aqui e comparados com as atividades demonstradas pelas enzimas GS e GOGAT. Observando os dados da figura 9, pode-se inferir que a atividade de GS para as duas fontes nitrogenadas é muito superior ao necessário para atender a taxa de N acumulado nos cotilédones sob a forma de proteínas. Portanto, a menor eficiência de asparagina como fonte de N, não pode ser explicada por deficiência na atividade de GS.

6. CONCLUSÕES

1. A atividade da enzima ASNase de cotilédones imaturos de *C. juncea*, cultivados em meio de cultura, é inibida pela amida glutamina.

2. Asparagina demonstrou ser uma fonte de N menos eficiente que glutamina para o cultivo *in vitro* de cotilédones de *C. juncea*. Essa menor eficiência de asparagina não pode ser explicada por:

- deficiência na atividade de GS;
- limitação da enzima ASNase;
- Insuficiência de glutamato para a reação de GS.

7. LITERATURA CITADA

- AGUIAR, L.F. 1995. Estudo molecular e imunoquímico da asparaginase de *Crotalaria*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil. Tese de Doutorado.
- ANDERSON, J.W. & BEARDALL, J 1991. Others lighth-coupled assimilatory and reductive mechanisms. IN: Molecular activities of plant cell. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 230-241.
- ARRUDA, P. & SILVA, W.J. 1979. Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncle. *Phytochemistry* 18:408-410.
- ATKINS, C.A., PATE, J.S. & SHARKEY, P.J. 1975. Asparagine metabolism-key to the nitrogen nutrition of developing legume seed. *Plant Physiol.* 56:807-812.
- ATKINS, C.A., PATE, J.S. & LAYZELL, D.B. 1979. Assimilation and transport of nitrogen in non-nodulated (NO_3^- -grown) *Lupinus albus* L. *Plant Physiol.* 64:1078-1082.
- ATKINS, C.A., PATE, J.S., PEOPLES, M.B. & JOY, K.W. 1983. Amino acid transport and metabolism in relation to the nitrogen economy of a legume leaf. *Plant Physiol.* 71:841-848.

- BERGENSEN, F.J. 1965. Ammonia an early stable product of nitrogen fixation by soybean root nodules. *Aust. J. Biol. Sci.* 18: 1-9.
- BEUSICHEM, M.L. 1983. Xylary charge distribution and nitrogen transport in *Pisum sativum* L. during dinitrogen fixation or nitrate nutrition. *Z. Pflanzenphysiol.* 109:449-458.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- CHANDLER, P.M., HIGGINS, T.J.V., RANDALL, P.L. & SPENCER, D. 1983. Regulation of legumin levels in developing pea seeds under conditions of sulfur deficiency. *Plant Physiol.* 71:47-54.
- CHANG, K.S. & FARNDEN, J.F. 1981. Purification and properties of asparaginase from *Lupinus arboreus* and *Lupinus angustifolius*. *Arch. Biochem. Biophys.* 208(1):49-58.
- DAVIES, K.M. & KING, G.A. 1993. Isolation and characterization of cDNA clone for a harvest-induced asparagine synthetase from *Asparagus officinalis* L. *Plant Physiol.* 102:1337-1340.

- DOUGALL, D.K. 1974. Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58:693-649.
- EVANS, A.M. & GRIDLEY, H.E. 1979. Prospects for the improvement of protein and yield in food legumes. *Curr. Adv. Plant Sci.* 11(1): 1-17.
- FERGURSON, A.R. & SIMS, A.P. 1971. Inactivation in vivo of glutamine synthetase and NAD-specific glutamate dehydrogenase its role in the regulation of glutamine synthesis in yeast. *J. Gen. Microbiol.* 69:423-427.
- GIVAN, C.V. 1979. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochemistry* 18:375-382.
- HAGA, K.I. 1982. Nutrição nitrogenada do cotilédone imaturo de soja. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil. Tese de Mestrado.
- HAGA, K.I. & SODEK, L. 1987. Utilization of nitrogen sources by immature soybean cotyledons in culture. *Ann. Bot.* 59:597-601.
- HEESCHEN, V., MATLOK, J., SCHRADER, S. & RUDOLF, H. 1996. Asparaginase catabolism in bryophytes: purification and characterization of two L-asparaginase isomorphs from *Sphagnum fallax*. *Physiol. Plant.* 97:402-410.

- HERRIDGE, D.F. 1982. Relative abundance of ureides and nitrate in plant tissues of soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 70:1-6.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Sta. Circ.* 347.
- HUNGRIA, M., NEVES, M.C.P. & VICTORIA, R.L. 1985. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. I. Atividade da nitrogenase, da redutase do nitrato e transporte do nitrogênio na seiva do xilema. *Rev. Bras. Ci. Solo.* 9:193-200.
- HURST, P.L. & CLARK, C.J. 1993. Postharvest changes in ammonium, amino acids and enzymes of amino acid metabolism in asparagus spear tips. *J. Sci. Food Agric.* 63:465-471.
- IRELAND, R.J. & JOY, K.W. 1981. Two routes for asparagine metabolism in *Pisum sativum* L. *Planta* 151:289-293.
- IRELAND, R.J. & JOY, K.W. 1983. Subcellular localization of asparaginase and asparagine aminotransferase in *Pisum sativum* leaves. *Plant Physiol.* 72:1127-1129.

- KAUL, A.K. 1973. Mutation breeding and crop protein improvement. IN: Improving Plant Protein by Nuclear Techniques. IAEA. pp. 1-106.
- LAYZELL, D.B. & LaRUE, T.A. 1982. Modelling C and N transport to developing soybean fruits. *Plant Physiol.* 70:1290-1298.
- LEA, P.J. & FOWDEN, L. 1975. Asparagine metabolism in higher plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 168:3-14.
- LEA, P.J., FOWDEN, L. & MIFLIN, B.J. 1978. The purification and properties of asparaginase from *Lupinus* species. *Phytochemistry* 17:217-222.
- LEA, P.J., HUGHES, J.S. & MIFLIN, B.J. 1979. Glutamine- and asparagine-dependent protein synthesis in maturing legume cotyledons culture *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 30:529-537.
- LEWIS, O.A.M. 1975. An ^{15}N - ^{14}C study of the role of the leaf in the nitrogen nutrition of the seed of *Datura stramonium* L. *J. Exp. Bot.* 26:361-366.
- LOUGH, T.J., CHANG, K.S., CARNE, A., MONK, B.C., REYNOLDS, P.H. & FARNDEN, K.J.F. 1992. L-asparaginase from developing seeds of *Lupinus arboreus*. *Phytochemistry.* 31(1):1519-1527.

- LYZNIK, L.A., ZDROJEWSKI, W., NEUMANN, M., MACEWICZ, J. & RACZYNSKA-BOJANOWSKA, K. 1982. A possible role of pedicel-placento-chalazal tissues in the amino acids supply to the developing maize endosperm. *Maydica* 27:191-1982.
- MAURIN, C. & GAL, Y.L. 1997. Glutamine synthetase in marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae): regulation of activity in relation to light and nitrogen availability. *Plant Sci.* 122: 61-69.
- McCLURE, P.R. & ISRAEL, D.W. 1979. Transport of nitrogen in the xilem of soybean plants. *Plant Physiol.* 64:411-416.
- McCLURE, P.R., ISRAEL, D.W. & VOLK, R.J. 1980. Evaluation of the relative ureide content of xilem sap as an indicator of N₂ fixation in soybeans. *Plant Physiol.* 66:720-725.
- MCCULLOUGH, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin. Chem. Acta* 17:297-304.
- MENGEL, K. & KIRKBY, E.A. 1979. Principles of plant nutrition. International Potash Institute, Switzerland, second edition, 592p.
- MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. 1977. Amino acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:299-329.

- MILLER, R.H. 1967. *Crotalaria* seed morphology, anatomy and identification. *Technical Bulletin*, 1373:1-73.
- MILLERD, A., SPENCER, D., DUDMAN, W.F. & STILLER, M. 1975. Growth of immature pea cotyledons in culture. *Aust. J. Plant Physiol.* 2:51-59.
- MIRANDA, A.C. 1981. Sistemas de incompatibilidade e autoincompatibilidade em *Crotalaria juncea* L. Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz", Piracicaba, São Paulo, Brasil. Tese de Mestrado.
- MONTALDI, E.R. 1995. Principios de Fisiologia Vegetal. Primeira ed. SUR Ediciones, La Plata, Argentina.
- MORI, T.E.S. 1981. Metabolismo do nitrogênio durante a fase do desenvolvimento reprodutivo da soja. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil. Tese de Mestrado.
- MORI, T.E.S. & SODEK, L. 1983. Nitrogen economy of a single fruiting node of soybean. *Z. Pflanzenphysiol.* 111(1):29-38.
- MURRAY, O.R. & KENNEDY, I.R. 1980. Changes in activities of enzymes of nitrogen metabolism in seedcoat and cotyledons during embryo development in pea seeds. *Plant Physiol.* 66:782-786.

- PATE, J.S. 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:313-340.
- PATE, J.S. & WALLACE, W. 1964. Movement of assimilated nitrogen from the root system of the field pea (*Pisum arvense* L.). *Ann. Bot.* 28:80-99.
- PATE, J.S., SHARKEY, P.J. & LEWIS, O.A.M. 1974. Phloem bleeding from legume fruits a technique for study of fruit nutrition. *Planta.* 120:229-243.
- PATE, J.S., SHARKEY, P.J. & LEWIS, O.A.M. 1975. Xilem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legume, studied by a phloem bleeding technique. *Planta* 122:11-26.
- PATE, J.S., ATKINS, C.A., WHITE, S.T., RAINBIRD, R.M. & WOO, K.C. 1980. Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. *Plant Physiol.* 65:961-965.
- 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.

- PATE, J.S., PEOPLES, M.B. & ATKINS, C.A. 1984. Spontaneous phloem bleeding from cryopunctured fruits of a ureide-producing legume. *Plant Physiol.* 74:499-505.
- PEOPLES, M.B., PATE, J.S. & ATKINS, C.A. 1985(a). The effect of nitrogen source on transport and metabolism of nitrogen in fruiting plants of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *J. Exp. Bot.* 36:567-582.
- PEOPLES, M.B., ATKINS, C.A., PATE, J.S. & MURRAY, D.R. 1985(b). Nitrogen nutrition and metabolic interconversions of nitrogenous solutes in developing cowpea fruits. *Plant Physiol.* 77:382-388.
- PILBEAN, D.J., BELL, A.E. 1979. Free amino acids in *Crotalaria* seeds. *Phytochemistry.* 18:973-985.
- RAINBIRD, R.M., THORNE, J.H. & HARDY, R.F.W. 1984. Role of amides, amino acids and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. *Plant Physiol.* 74:329-334.
- RATAJCZAK, W. 1986. Asparagine metabolism in developing seeds of *Lupinus luteus* L. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 181:17-22.
- REHFELD, D.W. & TOLBERT, N.E. 1972. Aminotransferases in peroxisomes from spinach leaves. *J. Biol. Chem.* 247:4803-4811.

- RIZZINI, C.T. & MORIS, W.B. 1976. Botânica Econômica. 1ª edição. EPU EDUSP, São Paulo, Brasil.
- RHODES, D., RENDON, G.A. & STEWART, G.R. 1975. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. *Planta*. 125:201-211.
- SCHUBERT, K.R. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37:539-574.
- SELLSTEDT, A. & ATKINS, C.A. 1991. Composition of amino acid compounds transported in xilem of *Casuarina* sp. *J. Exp. Bot.* 42(245):1493-1498.
- SERVAITES, J.C., SCHRADER, L.E. & JUNG, D.M. 1979. Energy-dependent loading of amino acid and sucrose loading in the floem. *Plant Physiol.* 64:546-550.
- SHARKEY, P.J. & PATE, J.S. 1976. Translocation from the leaves to fruits of a legume, studied by a phloem bleeding technique: diurnal changes and effects of continuous darkness. *Planta*. 128:63-72.
- SIECIECHOWICZ, K.A. & IRELAND, R.L. 1989. Isolation and properties of asparaginase from leaves of *Pisum sativum*. *Phytochemistry*. 28(9):2275-2279.

- SIECIECHOWICZ, K.A., IRELAND, R.J. & JOY, K.W. 1985. Diurnal variation of asparaginase in developing pea leaves. *Phytochemistry*. 77:506-508.
- SIECIECHOWICZ, K.A., JOY, K.W & IRELAND, R.J. 1988a The metabolism of asparaginase in plants. *Phytochemistry* 27(3):663-671.
- SIECIECHOWICZ, K.A., JOY, K.W & IRELAND, R.J. 1988b. Diurnal changes in asparaginase activity in pea leaves I. The requirement for light for increased activity. *Phytochemistry* 39(203):695-706.
- SIECIECHOWICZ, K.A., JOY, K.W & IRELAND, R.J. 1989. Effect of methionine sulfoximine on asparaginase activity and ammonium levels in pea seeds. *Plant Physiol.* 189:192-196.
- SIMPSON, R.J. & DALLING, M.J. 1981. Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.) III. Enzymology and transport of amino acids from senescing flag leaves. *Planta*. 151:447-456.
- SKOKUT, T.A., VARNER, J.E., SCHAEFER, J., STEJSKAL, E.O. & MCKAY, R.A. 1982. (¹⁵N)NMR determination of asparagine and glutamine nitrogen utilization for synthesis of storage protein in developing cotyledons of soybean in culture. *Plant Physiol.* 69:308-313.

- SODEK, L. & LEA, P.J. 1993. Asparaginase from testa of developing lupin and pea seeds. *Phytochemistry*. 34(1):51-56.
- SODEK, L., LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. 1980. Distribution and properties of potassium-dependent asparaginase isolated from developing seeds of *Pisum sativum* and other plants. *Plant Physiol.* 65:22-26.
- STREETER, J.G. 1977. Asparaginase and asparagine transaminase in soybean leaves and root nodules. *Plant Physiol.* 60:235-239.
- SUELTER, C.H. 1970. Enzymes activated by monovalent cations. *Science* 168:789-795.
- TA, T.C., JOY, K.W. & IRELAND, R.J. 1985. Role of Asn in photorespiratory nitrogen metabolism of pea leaves. *Plant Physiol.* 78:334-337.
- THOMAS, R.J. & SCHRADER, L.E. 1981. Ureide metabolism in higher plants. *Phytochemistry* 20:361-371.
- THOMPSON, J.F., MADISON, J.T. & MUENSTER, A.E. 1977. *In vitro* culture of immature cotyledons of soya bean (*Glycine max* L. Merrill). *Ann Bot.* 41:29-39.

- THORNE, J.H. 1985. Phloem unloading of C and N assimilates in developing seeds. *Amer. J. Bot.* 74:1122-1137.
- TONIN, G.S. 1988. Influência das fontes de nitrogênio na atividade de enzimas envolvidas no processo de assimilação de amidas e ureídeos em cotilédones imaturos de soja mantidos em cultura. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil. Tese de Doutorado.
- TONIN, G.S. & SODEK, L. 1990. Asparaginase, allantoinase and glutamine synthetase activities in soybean cotyledons grown *in vitro*. *Phytochemistry* 29(9):2829-2831.
- TULLEY, R.E. & HANSON, A.D. 1979. Phloem amino acids in barley. *Plant Physiol.* 65(supl.): (5) abstr. 191.
- URQUHART, A.A & JOY, K.W. 1982. Transport, metabolism and redistribution of xylem-borne amino acids in developing pea shoots. *Plant Physiol.* 69:1226-1232.
- VAUQUELIN, M & ROBIQUET, M. 1806. The discovery of a new plant principle in *Asparagus sativus*. *Ann. Chim.* 57:88-93.
- VITÓRIA, A.P. 1994. Propriedades da asparaginase e determinação de compostos nitrogenados em algumas espécies do gênero *Crotalaria*. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil. Tese de Mestrado.