

MARIA AUXILIADORA FLIO GOMES

"METABOLISMO DE UREÍDEOS E ASPARAGINA DURANTE A ONTOGENIA
DO FRUTO DE PLANTAS DE SOJA NODULADAS E NÃO-NODULADAS".

Em base noduladas, e não . . .

Orientador - Prof. Dr. LADASLAV SODEK

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

CAMPINAS

Estado de São Paulo

1982

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À minha mãe e ao meu pai (*in memoriam*), ao meu avô Teódulo Vasconcellos (*in memoriam*) e a avô Eliza Vasconcellos pela dedicação, amor e orientação para a vida.

HOMENAGEM

Ao meu esposo JOSÉ MARIA pelo apoio, compreensão, estímulo e amizade, e as minhas filhas ANA CLÁUDIA e ANA PAULA com carinho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Ladaslav Sodek pela orientação segura, apoio, dedicação e sobretudo pela amizade sincera que propiciou bom relacionamento que foi de grande valia para a execução deste trabalho.

Ao professor Dr. Antonio Celso Novaes de Magalhães, pela carinhosa amizade, ensinamentos, críticas e sugestões oferecidas a este trabalho, e pelo apoio recebido em todos os momentos.

Aos professores Dr. Ivany F. M. Válio e Dra. Rosely R. Sharif pelas sugestões oferecidas.

Ao professor Dr. João Paulo Mendes, vice-reitor da Universidade Federal do Pará, pela oportunidade oferecida e confiança em mim depositada.

Às professoras Normélia Vasconcellos, Leda Chaves e Ilze Ribeiro pela amizade e apoio que contribuíram para este sucesso.

À Universidade Federal do Pará pelo incentivo e apoio financeiro para a realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

À Universidade Estadual de Campinas pela realização deste trabalho.

À prima Eliza Campelo de Vasconcellos pelo carinho e ajuda na minha vida familiar dando-me condições de realizar este trabalho.

À irmã Ignes Magalli Rossi e irmãs Franciscanas do C.I.M., pela carinhosa acolhida, incentivo e amizade.

Aos meus tios Hélio Pereira Feio, Aracy Cecília Feio de Feio e demais familiares pela amizade e carinho.

À todos os professores, funcionários e colegas do curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela amizade e apoio.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

b) Peso da Planta	40
c) Dosagem de Ureídeos	42
2.2 - Experimento 2	44
a) Número e Peso de Nódulos	45
b) Peso da Planta	45
c) Redução de Acetileno	48
d) Ureídeos	48
3. Experimentos Preliminares com as Enzimas ...	50
3.1 - Extração	50
3.1.1 - Tampão	53
3.1.2 - KCl	54
3.1.3 - Triton X-100	54
3.1.4 - Atividade da Asparaginase	55
3.2 - Características Cinéticas	57
3.2.1 - Alantoinase	57
a) pH Ótimo	57
b) Concentração do Substrato .	57
c) Tempo de Reação	60
d) Concentração da Enzima	63
3.2.2 - Glutamina Sintetase e Asparagi	
nase	63
a) Reação da Glutamina Sinteta	
se com o Tempo	65
b) Concentração para a Enzima	
Glutamina Sintetase	65

4. Peso Fresco	65
5. Atividade das Enzimas Durante a Fase de Desenvolvimento do Fruto	70
5.1 - Alantoinase	70
5.2 - Glutamina Sintetase	73
5.3 - Asparaginase	77
5.4 - GOGAT	79
6. Conteúdo de Ureídeos, Aminoácidos e Proteínas	80
6.1 - Ureídeos	80
6.2 - Aminoácidos	86
6.3 - Proteínas	91
IV. DISCUSSÃO	96
V. RESUMO	112
VI. SUMMARY	115
VII. ABREVIATURAS	118
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
IX. APÊNDICE	135

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Influência do nitrogênio no desenvolvimento de plantas de soja noduladas e não-noduladas	37
FIGURA 2 - Influência do nitrogênio na formação de nódulos em plantas de soja inoculadas	39
FIGURA 3 - Influência do nitrogênio no peso fresco da parte aérea de plantas de soja inoculadas e não-inoculadas	41
FIGURA 4 - Influência dos diferentes níveis de nitrogênio na quantidade de ureídeos de plantas de soja inoculadas e não-inoculadas	43
FIGURA 5 - Influência do nitrogênio no peso fresco da parte aérea de plantas de soja inoculadas e não-inoculadas	47
FIGURA 6 - Influência do nitrogênio na quantidade de ureídeos e na taxa da redução de acetileno em plantas de soja noduladas e não-noduladas	49
FIGURA 7 - Influência do pH na atividade da enzima alantoinase	58
FIGURA 8 - Variação da atividade da enzima alantoinase em função da concentração do substrato	59

FIGURA 9 - Determinação do K_m da enzima alantoinase segundo Lineweaver-Burk	61
FIGURA 10 - Formação de produto em relação ao <u>tem</u> po para a enzima alantoinase	62
FIGURA 11 - Atividade da alantoinase em diferentes quantidades de enzima	64
FIGURA 12 - Formação de produto em função do tempo para a enzima glutamina sintetase.	66
FIGURA 13 - Atividade da glutamina sintetase em diferentes quantidades de enzima	67
FIGURA 14 - Alterações do peso fresco durante a ontogenia do fruto de soja nodulada e não-nodulada	69
FIGURA 15 - Atividade da enzima alantoinase na <u>va</u> gem, cotilédones e tegumento durante a ontogenia do fruto de soja não-nodulada	71
FIGURA 16 - Atividade da enzima alantoinase na <u>va</u> gem, cotilédones e tegumento durante a ontogenia do fruto de soja nodulada	72
FIGURA 17 - Atividade da enzima glutamina sinteta <u>se</u> na vagem, cotilédones e tegumento durante a ontogenia do fruto de soja não-nodulada.....	75

FIGURA 18 - Atividade da enzima glutamina sintet <u>a</u> se durante a ontogenia do fruto de <u>so</u> ja nodulada	76
FIGURA 19 - Atividade da enzima asparaginase nos cotilédones e tegumento durante a ontogenia do fruto de soja nodulada e não-nodulada.....	78
FIGURA 20 - Teor de ureídeos encontrado na vagem durante a ontogenia do fruto de soja nodulada e não-nodulada	82
FIGURA 21 - Teor de ureídeos encontrado nos coti- lédones durante a ontogenia do fruto de soja nodulada e não-nodulada	84
FIGURA 22 - Teor de ureídeos encontrado nos tegu- mentos durante a ontogenia do fruto de soja nodulada e não-nodulada	85
FIGURA 23 - Nível de aminoácidos encontrado na vagem durante a ontogenia do fruto de soja nodulada e não-nodulada	87
FIGURA 24 - Nível de aminoácidos encontrado nos cotilédones durante a ontogenia do fruto de soja nodulada e não-nodula <u>a</u> da	89
FIGURA 25 - Nível de aminoácidos encontrado nos tegumentos durante a ontogenia do fru <u>u</u> to de soja nodulada e não-nodulada ..	90

FIGURA 26 - Teor de proteína determinado na vagem durante a ontogenia do fruto de soja nodulada e não-nodulada	92
FIGURA 27 - Teor de proteína determinado nos coti <u>l</u> lédones durante a ontogenia do fruto de soja nodulada e não-nodulada	93
FIGURA 28 - Teor de proteína determinado nos tegu <u>l</u> mentos durante a ontogenia do fruto de soja nodulada e não-nodulada	95

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA I - Testes para esterilização de sementes de soja	35
TABELA II - Influência do nitrogênio na formação de nódulos em plantas de soja inocu- ladas	46
TABELA III - Comparação dos meios de extração normalmente usados para as enzimas alantoinase, asparaginase e glutami- na sintetase	51
TABELA IV - Atividade da enzima alantoinase em cotilédones utilizando-se dois meios de extração	53
TABELA V - Efeito do imidazol na atividade da enzima alantoinase em cotilédones ...	53
TABELA VI - Influência do KCl no meio de extra- ção para as enzimas alantoinase e glutamina sintetase	56
TABELA VII - Atividade da enzima asparaginase em cotilédones utilizando-se dois meios de extração	56
TABELA VIII - Atividade da enzima glutamato sin- tase nos tecidos do fruto de soja.	81

TABELA IX - Atividade da enzima alantoinase duran <u>te</u> a ontogenia de frutos de soja nodu <u>l</u> lada e não-nodulada	136
TABELA X - Atividade da enzima glutamina sinteta <u>se</u> durante a ontogenia de frutos de so <u>ja</u> nodulada e não-nodulada.....	137
TABELA XI - Atividade da enzima asparaginase du <u>rante</u> a ontogenia de frutos de soja nodulada e não-nodulada.....	138

INTRODUÇÃO

As sementes, caracteristicamente, apresentam quantidades de reservas de metabólitos suficientes para suprir a plântula durante a fase inicial de crescimento e desenvolvimento, até que esta, como planta fotossinteticamente autotrófica, torne-se apta para sintetizar seu próprio alimento. Tais reservas de um modo geral são compostas de lipídeos, proteínas, carboidratos, fosfatos orgânicos e vários compostos inorgânicos (BLACK, 1978). Dentre estas, as proteínas constituem o fator limitante em termos de valor nutricional para alimentação humana e animal, decorrente da carência de alguns aminoácidos essenciais (KAUL *et al.*, 1970). Este problema tem gerado grande interesse no campo da pesquisa, quando se sabe que cerca de 70% da proteína consumida pelo homem é de origem vegetal (KAUL, 1973) evidenciando-se, portanto, a importância da semente de plantas cultivadas como fonte de alimento (BLACK, 1978). Segundo JALIL e TAHIR (1973), os cereais contribuem com cerca de 50% e as leguminosas com 18% no fornecimento de proteínas para fins alimentícios a nível mundial. Embora o teor de proteína seja consideravelmente alto nas leguminosas, quando comparado com os cereais, sua produção ainda é relativamente baixa.

Os cereais são, de um modo geral, deficientes no

aminoácido essencial lisina (NELSON, 1969), contrastando assim com as leguminosas, onde o teor de lisina é geralmente alto. Por outro lado, as leguminosas são carentes no aminoácido metionina, enquanto que os cereais contém níveis mais elevados deste aminoácido (EGGUM, 1968). Por este motivo, as proteínas de cereais e leguminosas têm mutuamente um efeito suplementar em termos de aminoácidos.

O processo de desenvolvimento da semente envolve a síntese de muitas proteínas como as enzimas que participam do metabolismo celular e as chamadas proteínas de reserva. Nas plantas cultivadas de importância econômica, destaca-se a semente como o órgão que apresenta maior concentração de proteína. Por exemplo, sementes maduras de leguminosas geralmente apresentam teores de proteína em torno de 25 a 30% (EVANS e GRIDLEY, 1979), em certos casos chegando a atingir até 50%, como a soja (HARTWIG, 1969).

O acúmulo de proteínas em sementes, varia em torno de 1 a 4 mg por dia, num período de aproximadamente 25 a 35% do tempo necessário para a maturação das sementes, como foi constatado em *Pisum sativum* (BEEVERS e POULSON, 1972; BASHA e BEEVERS, 1976), *Pisum arvense* (FLINN e PATE, 1968), *Vicia faba* (MILLERD et al., 1971;

WRIGHT e BOULTER, 1972), *Zea mays* (MURPHY e DALBY, 1971) e soja (HILL e BREINDENBACH, 1974). Nessa fase de acúmulo de proteína, as sementes necessitam de um grande suprimento de nitrogênio. Esse nitrogênio é fornecido pelas raízes e folhas, e é transportado através do xilema e floema para os frutos (PATE, 1973; LEWIS e PATE, 1973). A produção das sementes depende em grande parte, da eficiência do processo onde partes vegetativas da planta contribuem com nutrientes para o desenvolvimento dos frutos (MORI, 1981).

A principal forma de nitrogênio utilizada pela planta é o nitrato, o qual é absorvido do solo pelo sistema radicular. Entretanto, esta forma de nitrogênio não pode ser utilizada pelas sementes, uma vez que estas são incapazes de reduzir nitrato (SCHLESIER, 1977; MORI, 1981). O órgão reconhecido como o sítio de redução e assimilação de nitrato em muitas plantas é a folha (BEEVERS, 1976), embora as raízes contribuam de uma maneira significante em algumas espécies. A contribuição das raízes parece estar ligada a sua capacidade de reduzir nitrato, de modo que, quando esta capacidade for ultrapassada, o excesso é translocado através do xilema para ser reduzido na folha (PATE *et al.*, 1974).

Além do nitrato, o íon amônia também pode ser uma fonte importante de nitrogênio para a planta, princi-

palmente para aquelas espécies adaptadas à solos ácidos ricos em matéria orgânica, onde a amônia parece ser a forma principal de nitrogênio disponível (PATE *et al.*, 1974). Porém, esta forma de nitrogênio não se encontra nas vias de transporte da planta, mesmo que seja cultivada em presença de altos níveis de amônia (IVANKOV e INGVERSEN, 1971). Isto sugere que, embora a capacidade da raiz em reduzir nitrato seja limitada, a assimilação da amônia não é (WALLACE e PATE, 1967). Provavelmente um sistema eficiente torna-se necessário na raiz para prevenir reações tóxicas da amônia.

Outra forma de nitrogênio disponível à planta é o nitrogênio atmosférico, e apenas as espécies que formam associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio são capazes de aproveitá-lo (PATE *et al.*, 1969). Um exemplo importante deste é a associação *Rhizobium - Leguminosae*. A fixação do nitrogênio atmosférico neste sistema envolve, também, a redução do nitrogênio para amônia que, por sua vez, é rapidamente assimilado na forma orgânica pelos tecidos do nódulo, os quais são considerados como o sítio de fixação de nitrogênio (SCOTT *et al.*, 1976).

Além dos produtos de redução e assimilação do nitrogênio inorgânico, a semente pode ainda contar com nitrogênio reduzido na forma de aminoácidos, proveniente da

degradação de proteínas em órgãos senescentes. Durante a senescência foliar, por exemplo, ocorre uma quebra rápida da proteína (PETERSON e HUFFAKER, 1975; FELLER *et al.*, 1977; STOREY e BEEVERS, 1977; THOMAS, 1978) e, concomitantemente, um aumento na concentração de aminoácidos no floema (HALL e BAKER, 1972; PATE *et al.*, 1974; VAN DIE *et al.*, 1975). A correlação entre degradação de proteína e a formação de asparagina em folhas, foi notada pela primeira vez por MIYACHI (1897, *in* LEA e MIFLIN, 1980). Outros trabalhos mostram que ocorre uma sucessão de reações envolvendo a degradação de proteína com formação de glutamina, asparagina e finalmente amônia (YEMM e WILLIS, 1956). Isto significa que, provavelmente, estes compostos sejam os produtos principais da degradação de proteína, os quais são transportados através do floema das folhas para os frutos em desenvolvimento (THOMAS, 1978).

Os produtos da redução e assimilação do nitrogênio inorgânico são transportados para o fruto na forma orgânica, saindo das raízes e das folhas através das vias de transporte seja do xilema ou do floema (PATE *et al.*, 1975). De um modo geral, os compostos nitrogenados constituem o maior componente da seiva do xilema, embora sua concentração situe-se em torno de 0,01 a 0,2% (p/v). Por outro lado, a concentração de nitrogênio na seiva do floema é de 10 a 20 vezes maior (DIE e WILLEMSE, 1975; PATE

et al., 1975; PATE, 1976). De qualquer forma, a nutrição dos frutos parece depender mais do floema do que do xilema, uma vez que os frutos possuem poucas ligações com o xilema e não transpiram (PATE *et al.*, 1977).

Os principais solutos nitrogenados transportados são altamente específicos daquelas espécies de plantas onde os conteúdos do xilema e do floema foram examinados em um mesmo grupo. Por exemplo, em muitas espécies de plantas as amidas glutamina e asparagina constituem as principais formas de nitrogênio transportado (BEEVERS, 1976; MIFLIN e LEA, 1977; PATE, 1980). No caso de *Datura* (LEWIS, 1975), milho (ARRUDA e SILVA, 1979) e cevada (TULLY e HANSON, 1979), a glutamina é a forma predominante, com apenas traços de asparagina. Já no caso de leguminosas, a amida que se destaca é a asparagina, representando mais de 50% do nitrogênio translocado, como foi verificado em *Lupinus albus* (PATE *et al.*, 1974; ATKINS *et al.*, 1975), *Pisum arvense* (PATE e WALLACE, 1964), *Pisum sativum* (LEWIS e PATE, 1973), soja (STREETER, 1972; WHITE *et al.*, 1981) e *Medicago sativa* (LEA e SMITH, 1972).

Em leguminosas não tropicais como o *Lupinus*, cerca de 60 a 70% do nitrogênio no xilema encontra-se na forma de asparagina, muitas vezes presente no limite de sua solubilidade, independente se o nitrogênio é derivado da fixação de nitrogênio ou da assimilação do nitrato

(PATE, 1971). Entretanto, em certas leguminosas tropicais, o principal composto nitrogenado encontrado nas vias de transporte muda de acordo com a fonte externa de nitrogênio (MATSUMOTO *et al.*, 1977; OHYAMA e KUMAZAWA, 1978; HERRIDGE *et al.*, 1978). Quando a planta é nodulada, e portanto utiliza o nitrogênio derivado da fixação, a asparagina de seiva é substituída pelos ureídeos (THOMAS e SCHRADER, 1981). O cultivo dessas leguminosas tropicais em presença de nitrato, o qual inibe a nodulação e, conseqüentemente, a fixação de nitrogênio (ATKINS e PATE, 1979), reduz a concentração de ureídeos a níveis muito baixos, de forma que a asparagina torna-se a forma de nitrogênio predominante nessas condições (PATE *et al.*, 1979).

Embora conhecidos de longa data como importantes compostos nitrogenados em várias plantas, os ureídeos (alantoína e ácido alantóico) só foram estudados mais intensivamente após o reconhecimento de sua importância como produtos da fixação de nitrogênio em leguminosas tropicais como soja, feijão de corda e *Phaseolus* sp. (THOMAS e SCHRADER, 1981).

No caso da soja, foi verificado que 86% do nitrogênio existente na seiva do xilema encontra-se na forma de ureídeos, quando a planta é totalmente dependente da fixação de nitrogênio (VAN DER DRIFT e VOGELS, 1966; NIRMALA

e SASTRY, 1975; MATSUMOTO *et al.*, 1977; McCCLURE e ISRAEL, 1979). Segundo ISHIZUKA (1977), o nitrogênio na forma de ureídeos aumenta predominantemente durante a fixação de nitrogênio, e nas sementes é mais eficientemente usado na produção de proteínas do que o nitrogênio na forma de aminoácidos ou nitrato.

A associação da síntese e transporte de ureídeos com a fixação de nitrogênio atmosférico em leguminosas tropicais foi bastante estudada principalmente em soja. MATSUMOTO *et al.* (1977 *a b*) demonstraram o acúmulo de ureídeos em várias partes de plantas de soja noduladas, enquanto que plantas não-noduladas continham níveis bastante inferiores. Tratando soja nodulada com acetileno, que é inibidor competitivo da fixação de nitrogênio, ocorre um decréscimo significativo na quantidade de ureídeos existente na seiva do xilema (ISRAEL e McCCLURE, 1980). Evidências mais diretas quanto a essa associação foram obtidas por OHYAMA e KUMAZAWA (1979), quando verificaram que o $^{15}\text{N}_2$ foi incorporado principalmente nitrogênio na forma de ureídeos, enquanto que usando $^{15}\text{NO}_3$ a incorporação se deu principalmente em asparagina.

A inibição da fixação de nitrogênio pelo nitrato em soja (MATSUMOTO *et al.*, 1977; McCCLURE e ISRAEL, 1977) e em outras leguminosas (PATE *et al.*, 1980), com consequente variação nos níveis de ureídeos, já foi bem docu-

mentada. Um estudo com *Vigna unguiculata* demonstrou que plantas noduladas tratadas com níveis de nitrato na faixa de 0 a 20 mM leva a uma diminuição progressiva no nível de ureídeos no xilema, com aumento da concentração de nitrato (PATE *et al.*, 1980).

Além da glutamina, asparagina e ureídeos, foi verificado que outros compostos podem predominar na composição do sistema vascular em alguns casos isolados, por exemplo, γ -metileno glutamina em amendoim (FOWDEN, 1954), citrulina em *L. albus* (PATE, 1971) e arginina em algumas árvores (TROMP e OVAA, 1979). Os alcalóides transportam quantidades significativas de nitrogênio no xilema de certas espécies de plantas, enquanto que o aminoácido homosserina se destaca em ervilha (PATE, 1980).

O exudato do floema de algumas espécies de plantas apresenta grande quantidade de proteínas, 10 mg de proteína por ml de exudato de *Cucurbita* (CRAFTS e CRISP, 1971), mas estas não são consideradas como constituintes móveis (ZIEGLER, 1975). O componente enzimático no exudato do floema sugere a possibilidade de transformação durante a passagem por este (ZIEGLER, 1975).

Após o reconhecimento da asparagina, glutamina e ureídeos como importantes formas de nitrogênio transportados, dentro da planta, surgiram trabalhos visando escl

recer o modo de utilização desses compostos nos sítios de consumo. O estudo da metabolização da asparagina tem se apresentado como um dos mais difíceis, apesar de sua posição de destaque entre os aminoácidos nos vegetais ser conhecida a bastante tempo. De fato, a alta concentração deste aminoácido em algumas espécies de plantas, como é o caso da *Asparagys officinales*, foi a razão que levou ao isolamento da asparagina como o primeiro aminoácido identificado (DELAVILLE, 1802 *in* LEA e FOWDEN, 1975). LEA *et al* (1968) e THING e ZSCHOCHE (1970) sugeriram que a asparagina não é metabolizada pela planta, sendo apenas um constituinte de proteínas. Para RIJVEN (1956), a asparagina agiria somente como uma fonte de nitrogênio para o crescimento de embriões jovens. Entretanto, tem sido possível cultivar tecidos vegetais com asparagina como única fonte de nitrogênio, como é o caso de cotilédones isolados de leguminosas (MILLERD *et al.*, 1975; THOMPSON *et al.*, 1977 e LEA *et al.*, 1979 *b*); *Spirodela oligorrhiza* (FERGUSON e BOLLARD, 1969) e *Lemma minor* (STEWART, 1972), o que sugere que a asparagina pode ser facilmente metabolizada.

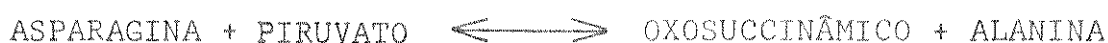
Para explicar o metabolismo da asparagina LEA e MIFLIN (1980) consideraram a participação de três possíveis enzimas: asparaginase, asparagina aminotransferase e asparagina amidatransferase. LEES e BLAKENEY (1970)

detectaram a atividade da enzima asparaginase em extrato cru de planta *Dolichos lab lab*, sendo que a maior atividade ficou distribuída entre raízes e nódulos das plantas. Nos nódulos a atividade da asparaginase foi encontrada na fração do bacteriíode. Igual distribuição desta enzima foi demonstrada nos nódulos das plantas de soja por STREETER (1977). Entretanto, apesar das muitas tentativas, nenhum dos trabalhos referentes a asparaginase demonstrou que a enzima apresenta atividade significativa. Porém, uma preparação muito ativa foi detectada e caracterizada em sementes imaturas de *Lupinus polyphyllus* (LEA *et al.*, 1978). A enzima foi purificada cerca de 500 vezes e mostrou ser específica para asparagina. ATKINS *et al.* (1975) também detectaram a presença de enzima em extrato cru de sementes imaturas de *Lupinus albus*. Tentativas foram feitas por BEEVERS e STOREY (1976) e LEA *et al.* (1978) para detectar a presença da enzima em sementes de ervilha e de outras leguminosas, mas sem sucesso. Recentemente, SODEK *et al.* (1980) mostraram indicações da existência de atividade da asparaginase, através da necessidade do íon potássio, em cotilédones e tegumento de sementes imaturas de ervilha e outras leguminosas. A atividade da enzima encontrada nos cotilédones demonstrou ser suficiente para fornecer todo o nitrogênio necessário para a acumulação de proteína na semente durante o período de maturação. A presença de uma enzima em

sementes de ervilha, capaz de metabolizar asparagina, explica o crescimento de cotilédones isolados de ervilha e soja quando mantidos em cultura com asparagina como única fonte de nitrogênio (MILLERD *et al.*, 1975; THOMPSON *et al.*, 1977 e LEA *et al.*, 1979 a). Utilizando inibidores específicos da glutamina sintetase e GOGAT, LEA *et al.* (1979 b) conseguiram demonstrar que a amônia liberada pela asparaginase é reassimilada via glutamina sintase antes da sua incorporação em proteínas na semente.

Quanto a segunda enzima possivelmente envolvida na utilização de asparagina, a asparagina aminotransferase (transaminase) foi detectada em extrato cru de tecidos de planta por MEISTER *et al.* (1952) e WILSON *et al.* (1954). Entretanto, estes trabalhos tiveram por objetivo o estudo das transaminases em geral, uma vez que as aminotransferases são conhecidas por terem múltipla especificidade (WIGHTMAN e FOREST, 1978). Isto veio mostrar que existe a possibilidade da asparagina (como qualquer outro aminoácido) de agir como um substrato para esta enzima.

Uma transaminase envolvendo especificamente a asparagina foi detectada por STREETER (1977) em extratos de folha de soja. O estudo sobre a enzima revelou que, dos 2-oxoácidos normalmente encontrados neste tecido, o piruvato foi o mais ativo como receptor do grupo alfa-amino da asparagina. A reação proposta foi a seguinte:



A enzima responsável pela utilização do produto, o ácido 2-oxosuccinâmico, e sua transformação em oxalo-acetato e amônia, foi também detectada.

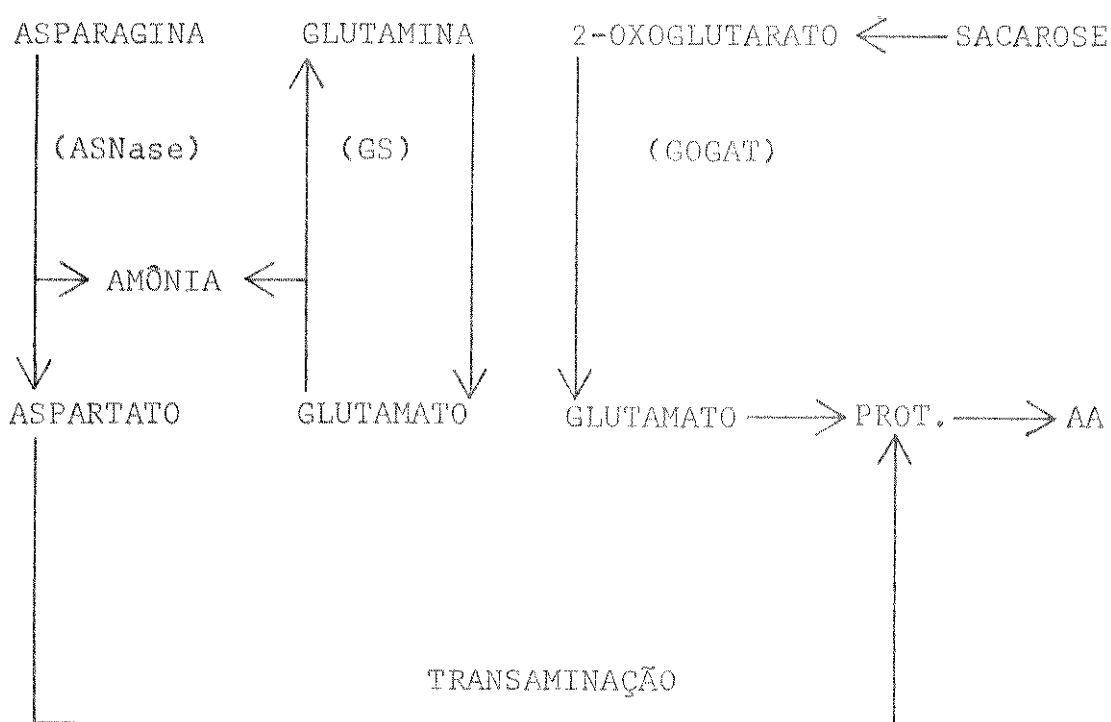
Através de estudos realizados com ^{15}N em plantas de ervilha, LLOYD e JOY (1978) confirmaram a transaminação da asparagina como um caminho importante na quebra da amida em folhas. O produto 2-oxosuccinamato pode ser deaminado, mas este estudo demonstrou que a maior parte do composto foi reduzido para 2-hidroxisuccinamato para posterior degradação em amônia e malato. Estudos sobre a localização da asparagina transaminase em outros tecidos revelaram níveis baixos em sementes imaturas de ervilha, quando comparadas com a atividade da asparaginase dependente do íon potássio (IRELAND e JOY, 1981).

Quanto à terceira enzima considerada por LEA e FOWDEN (1975 *a*, *b*), a asparagina amidatransferase, sua possível presença em tecidos vegetais foi aventada em 1974, em estudos sobre a enzima glutamina amidatransferase. Esta enzima transfere o grupo amida da glutamina para 2-oxoglutarato, porém, STEWART *et al.* (1980) FOWLER *et al.* (1974) e DOUGALL (1974) verificaram que a asparagina poderia substituir a glutamina na reação. Mais tarde, MIFLIN e LEA (1975) mostraram que a aparente utilização

da asparagina na reação foi devida a uma pequena quantidade de aspartato como contaminante da asparagina comercial. A asparagina, cromatograficamente livre de aspartato, não substitui a glutamina na reação, impondo sérias dúvidas quanto a existência desta enzima. Embora não tenha sido inequívoca a demonstração da existência de uma asparagina amidatransferase, a possibilidade de sua presença não pode ser descartada, uma vez que parece ser bem mais razoável a transferência direta do nitrogênio amida da asparagina para evitar a reassimilação da amônia, o que é necessário no caso das outras duas enzimas, asparaginase e asparagina aminotransferase (LEA e MIFLIN, 1980).

De qualquer forma, a utilização da asparagina nos sítios de consumo de planta, pode ser resumida no trabalho de IRELAND e JOY (1981), que demonstraram a importância da asparagina transaminase em folhas, raízes e vagens. Nas sementes em desenvolvimento, a asparaginase é a principal responsável pelo metabolismo deste aminoácido. Um esquema proposto para o metabolismo da asparagina em semente está mostrado na página seguinte.

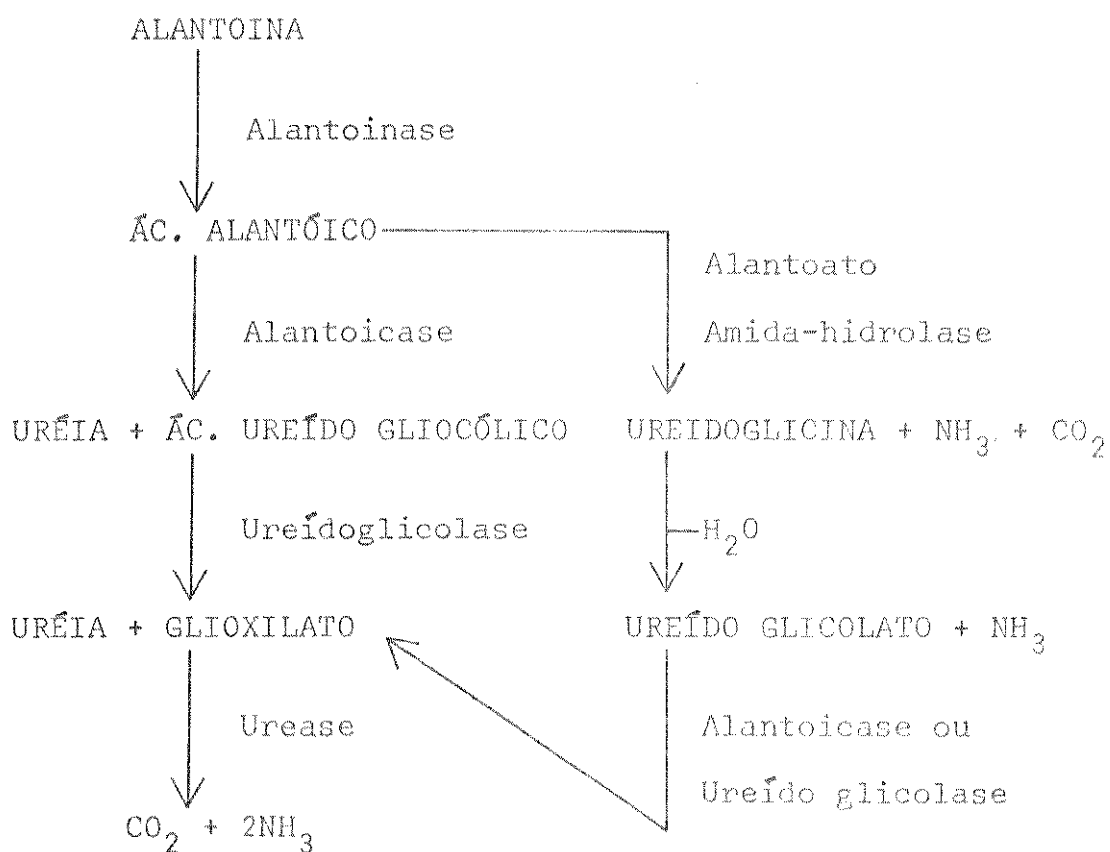
A utilização da glutamina pela planta parece envolver a enzima glutamato sintase (GOGAT). Esta enzima foi recentemente descrita (TEMPEST *et al.*, 1970), mas sua atividade tem sido facilmente demonstrada em alguns



tecidos de plantas, tais como folhas (LEA e MIFLIN, 1974), raízes (FOWLER *et al.* 1974; MIFLIN e LEA, 1975); nódulos (ROBERTSON *et al.*, 1975) e em culturas de tecidos vegetais (DOUGALL, 1974). BEEVERS e STOREY (1976) verificaram a presença da enzima em cotilédones imaturos de ervilha. GOGAT é a enzima que cataliza a transferência do grupo amida para α -cetoglutarato formando glutamato, o qual pode fornecer o grupo amino para a biossíntese de outros aminoácidos via reações de transaminase (veja esquema acima). SODEK e SILVA (1977), sugeriram que a enzima GOGAT desempenha um papel importante no metabolismo do nitrogênio em endosperma de milho, onde o nitrogênio, transportado na forma de glutamina, se torna disponível para a

síntese de outros aminoácidos.

Quanto à utilização dos ureídeos pelos frutos, ou qualquer outro órgão da planta, ainda não está bem esclarecido, talvez seja porque estes compostos apenas recentemente ganharam importância em plantas apesar de terem sido descobertos em 1930 por FOSSE e colaboradores (*in* THOMAS e SCHRADER, 1981). O esquema abaixo, elaborado por THOMAS e SCHRADER (1981), resume conhecimentos sobre o metabolismo destes compostos em microorganismos.



Como podemos observar no esquema acima, existem

duas vias para a degradação dos ureídeos (alantoína e ácido alantóico), uma envolvendo a enzima alantoato amidahidrolase e outra envolvendo a enzima alantoicase. A via da alantoato amida-hidrolase é encontrada em *Streptococcus allantoicus* (VOGELS, 1963; VOGELS e VAN DER DRIFT, 1970) e em certas estirpes de *Pseudomonas* e *Penicillium* sp. (VOGELS, 1963; TRIJBELS e VOGELS, 1966). Por outro lado, a via que envolve a enzima alantoicase é encontrada na espécie *Pseudomonas aeruginosa* (TRIJBELS e VOGELS, 1966; VOGELS, 1969). É importante notar, também, que as duas vias levam a formação dos mesmos produtos, uréia e glioxilato. Porém, um dos sistemas resulta na produção de 1 mol de uréia por mol de alantoína, e o outro 2 moles.

Embora não exista na literatura nenhuma informação quanto à utilização dos ureídeos pelo fruto, há estudos sobre as enzimas possivelmente envolvidas em outras partes da planta. Vários trabalhos tem demonstrado a presença da enzima alantoinase em plantas, principalmente com relação a associação da enzima e os glioxissomos, ou outras estruturas membranosas em células de órgãos ativos na degradação de lipídeos, como na mamona (GORDON, 1969; ST. ANGELO e ORY, 1970; THEIMER e BEEVERS, 1971), amendoim (SINGH, 1968 *in* THOMAS *et al.*, 1980) e soja (VOGELS *et al.*, 1966).

Quanto às demais enzimas envolvidas na degradação dos ureídeos (veja esquema página 16), existem alguns trabalhos (VAN DER DRIFT e BOGELS, 1966; SINGH, 1968; ECHEVIN e BRUNEL, 1973; HARTMANN e ARNOLD, 1974 *in* THOMAS *et al.*, 1980; TAJIMA *et al.*, 1977) descrevendo a atividade da enzima alantoicase em plantas. Porém, devido a problemas no método de ensaio, não se pode afirmar que a presença desta enzima em tecidos vegetais tenha sido demonstrada (THOMAS e SCHRADER, 1981).

O fato de que os ureídeos são produtos específicos da fixação do nitrogênio nos nódulos, desperta interesse científico uma vez que a nutrição nitrogenada do fruto muda drasticamente quanto a planta é nodulada ou não. Plantas noduladas transportam nitrogênio principalmente na forma de ureídeos, enquanto que, em plantas não-noduladas a forma predominante é a asparagina, com somente traços de ureídeos. Este sistema permite estudar se tal mudança no transporte de nitrogênio pode influir na atividade das enzimas envolvidas no metabolismo da asparagina e dos ureídeos em frutos. O fato da não existência de dados na literatura, acerca da presença das possíveis enzimas envolvidas no metabolismo da asparagina e dos ureídeos em frutos de soja, é de adicional interesse, principalmente em virtude das várias possibilidades que existem para o metabolismo destes compostos, jus-

tificando assim os objetivos deste trabalho, que são:

1. Verificar a presença das enzimas asparaginase e allantoinase em tecidos de frutos imaturos de soja.
2. Verificar se a forma de nitrogênio transportado para os frutos influe na atividade destas enzimas.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material Vegetal

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram usadas sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr. cv. Santa Rosa), fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas - São Paulo. As sementes foram primeiramente esterilizadas em cloreto de mercúrio a 0,1% durante 3 minutos, e em seguida lavadas em água destilada. Após a esterilização, as sementes foram colocadas para germinar em potes de plástico com capacidade para 3 litros, usando-se vermiculita como substrato. Os potes e a vermiculita foram cuidadosamente lavados e autoclavados à temperatura de 120°C durante 15 minutos. Para a obtenção de plantas noduladas e não noduladas, as plântulas no estágio cotiledonar (10 dias) foram divididas em dois lotes e um deles inoculado com 2 ml de *Rhizobium japonicum* estirpe SMS-65 fornecido pela seção de Microbiologia do Solo do Instituto Agronômico de Campinas, e o outro lote não foi inoculado. Tanto os potes das plantas que foram inoculadas, assim como os das não inoculadas, foram recobertos com uma camada de algodão hidrófilo e com uma folha de papel de filtro. A parte inferior dos potes também foi forrada internamente com uma camada de algodão. To-

dos estes cuidados foram tomados para que se evitasse qualquer forma de contaminação. Durante todo o período experimental as plantas foram mantidas em casa de vegetação, à temperatura ambiente. Com o aparecimento da primeira folha trifoliolada, iniciou-se o tratamento com solução nutritiva. As plantas não-inoculadas foram tratadas com solução nutritiva normal de Hoagland, preparada nas seguintes concentrações:

Macronutrientes		Micronutrientes	
KH_2PO_4	- 1 mM	H_3BO_3	- 2860 mg/l
KNO_3	- 5 mM	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	- 1810 mg/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	- 5 mM	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	- 220 mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	- 2 mM	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \cdot \text{H}_2\text{O}$	- 80 mg/l
		$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	- 20 mg/l
		$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	- 29,4 mg/l
		+ EDTA.Na	- 33,2 mg/l

As plantas inoculadas foram tratadas com solução nutritiva deficiente de nitrogênio, preparada como descrito a

seguir:

Macronutrientes

KH_2PO_4 - 1 mM

K_2SO_4 - 2 mM

MgSO_4 - 2 mM

CaSO_4 - 2,5 mM

As concentrações de micronutrientes e Fe-EDTA foram as mesmas utilizadas na solução normal de Hoagland. Nos dois casos foi feita irrigação duas vezes por semana, usando-se volume de 200 ml por pote. Nos intervalos as plantas foram irrigadas com água destilada, uma ou duas vezes por semana, de acordo com a necessidade.

Quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento, da segunda folha trifoliolada, elas foram induzidas à floração aplicando-se fotoperíodos curtos de 9 horas durante 4 dias, o que permitiu a obtenção de plantas de pequeno porte, aproximadamente uniformes.

Após a floração, com o aparecimento dos frutos, as plantas foram utilizadas para determinações fisiológicas e bioquímicas, onde utilizaram-se frutos de

nós específicos (5º ao 7º nó).

2. Metodologia

2.1 - Avaliação da Atividade Enzimática

Foram feitas análises para a determinação da atividade das enzimas envolvidas na utilização dos ureídeos e da asparagina durante a fase de desenvolvimento do fruto de plantas noduladas e não-noduladas. Os ensaios foram feitos nas vagens, cotilédones e tegumento, desprezando-se o eixo embrionário. Os valores foram obtidos através da média de 14 vagens por tratamento. Os tecidos foram pesados separadamente antes da extração. Cada vagem continha 2 sementes.

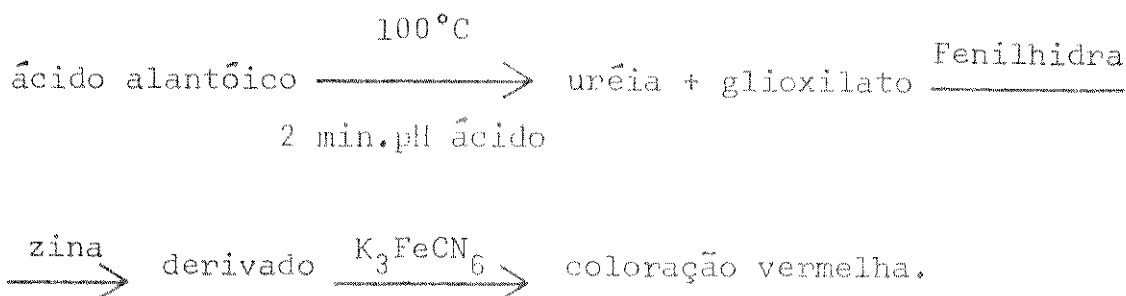
2.1.1 - Extração

O extrato foi preparado com o tampão imadozol, pH 8,0, 0,5 mM de EDTA e 1 mM de DTT. O tampão foi usado na proporção de 5 ml por grama de tecido, mantendo-se o material em temperatura baixa (0-4°C). Após a pesagem do material, os tecidos foram desintegrados com um homogeneizador Polytron modelo PT 35, durante 15 minutos, em seguida centrifugados a 10.000 x g, durante 15 minutos a 0°C. Após a centrifugação o sobrenadante

te foi utilizado para a retirada de alíquotas de 2 ml para o processo de dessalinização, passando pela coluna de Sephadex G - 25 (0,9 x 6,0 cm) equilibrada com o tampão de extração. A fração proteica (4 ml) foi coletada para as determinações enzimáticas.

2.1.2 - Ensaio da Enzima Alantoinase

A determinação da atividade da enzima allantoinase (E.C. 3.5.2.5) foi realizada dosando-se a formação do produto, ácido alantóico pelo método descrito por TRIJBELS e VOGELS (1966):

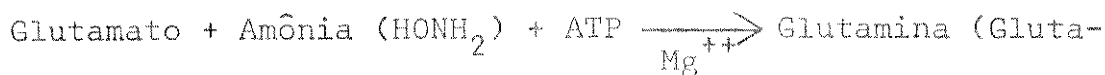


O meio de ensaio consistiu de allantoina (15 mM), 50 mM de tampão Tris HCl, pH 8,0, e uma alíquota do extrato com um volume final de 2 ml. O extrato foi incubado em banho-maria a 30°C e em intervalos de 20 minutos até 1 hora, foram retiradas alíquotas de 0,2 ml e a reação foi interrompida adicionando-se uma

mistura de 0,05 ml de HCl a 0,65 N, 1,15 ml de água destilada e, em seguida, 0,2 ml de fenilhidrazina a 0,33%. Os tubos da reação foram então colocados em banho fervente durante 2 minutos e depois levados ao gelo por 10 minutos. A seguir, foram adicionados 0,8 ml de HCl concentrado e 0,2 ml de ferricianeto de potássio a 1,65%, completando-se um volume final de 4 ml com água destilada. A leitura da absorbância da solução foi feita em espectrofotômetro, a 525 nm, e os valores expressos em μ moles de ácido alantóico por hora, por tecido usando padrão na faixa de concentração de 10 a 100 nmoles.

2.1.3 - Ensaio da Enzima Glutamina Sintetase

A atividade da glutamina sintetase (E.C. 6.3.1.2) foi calculada pelo método descrito por RHODES *et al.* (1975), através da formação de γ - glutamil hidroxamato (reação "sintetase") a partir do glutamato e hidroxilamina, que substitue a amônia, como pode-se observar pela reação:



O meio da reação consistiu de 1 mM de ATP, 4,5 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM de hidroxilamina HCl, 7,5 mM de L-glutamato (neutralizado com KOH), 50 mM de imidazol a pH 7,2 e extrato enzimático obtendo-se um volume final de 1,6 ml. Os meios de reação foram levados ao banho-maria, à uma temperatura de 30°C. Em intervalos de 0,15 e 30 minutos foram retiradas alíquotas de 0,5 ml do meio de reação, às quais foram adicionados agente contendo 0,67 N de HCl, 0,20 M de ácido tricloroacético e 0,37 M de $FeCl_3$ (FERGUSON e SIMS, 1971). Estabelecida a cor da reação as amostras foram centrifugadas a 2500 x g, durante 10 minutos a fim de remover as proteínas precipitadas. A quantidade de γ - glutamil hidroxamato foi determinada colorimetricamente a 535 nm, sabendo-se que 1 μ mol deste produto, nas condições do ensaio, dá uma absorbância de 0,34 (MORI, 1981).

2.1.4 - Ensaio da Enzima GOGAT

A atividade da glutamina oxo-glutarato amidatransferase (E.C. 2.6.1.53) foi determinada pelo método proposto por DOUGAL (1974), através da quantificação do NADH oxidado pela enzima dependente da glutamina e α -ceto-glutarato, de acordo com a reação:



O meio de reação para o ensaio da enzima consistiu de 5 mM de glutamina, 5 mM de α -cetoglutarato, 0,1 mM de NADH, uma alíquota de preparação enzimática e 50 mM de Tris HCl, pH 7,5, com volume final de 3,0 ml.

A reação foi acompanhada em cubetas que permaneceram em banho-maria a 30°C. Nos intervalos de tempo de 0, 15 e 30 minutos as leituras foram feitas diretamente no espectrofotômetro a 340 nm. A atividade foi calculada pela taxa de oxidação do NADH que foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção para o NADH de $E_{340 \text{ nm}}^{\text{mM}} = 6,22$.

2.1.5 - Ensaio da Enzima Asparaginase

O método para a dosagem da atividade da enzima asparaginase (E.C. 3.5.1.1) consistiu em incubar os extratos com ^{14}C -asparagina e determinar a quantidade de ^{14}C -aspartato formado após separação por cromatografia em camada delgada, segundo SODEK *et al.* (1980).

O ensaio foi realizado em micro-tubos de centrífuga de polipropileno contendo um volume total de 150 μl , onde foram adicionados ^{14}C - aspara

gina (10 mM), Tris.HCl (50 mM) pH 8,0, KCl (50 mM) e extrato enzimático. No tempo zero foram transferidos 75 μ l do ensaio para outro tubo mantido em gelo, e o primeiro tubo incubado a 30°C durante 1 hora. A reação foi paralizada pela imersão dos dois tubos em água fervendo por 5 minutos e, em seguida, colocados para esfriar. Os tubos foram depois centrifugados a fim de remover toda proteína precipitada.

Uma alíquota de 30 μ l foi aplicada numa placa cromatográfica de celulose: sílica 10:4 de acordo com TURNER e REDGWELL (1966), e a cromatografia desenvolvida em fenol: água (80:20 p/v). Os aminoácidos foram localizados pulverizando-se a placa com um reagente fluorescente não-destrutivo (DAVIES e MIFLIN, 1978) e observados sob luz ultra-violeta. A área correspondente ao aspartato foi retirada coletando-se o pó num disco de fibra de vidro (Whatman GF/C) empregando um dispositivo de sucção, segundo DAVIES e MIFLIN (1978). O disco foi introduzido num frasco de cintilação contendo 5 ml de mistura cintiladora (4 g PPO e 100 mg POPOP por litro de tolueno) e a contagem de radioatividade feita em contador de cintilação (Beckman LS - 100 C). A transformação de cpm em μ moles foi feita através da atividade específica do substrato marcado (50.000 cpm/ μ mol).

2.2 - Dosagem de Componentes Não-Enzimáticos

Usando o mesmo material, ou seja, vagem, cotilédones e tegumento de plantas noduladas e não-noduladas, foram determinadas as concentrações de ureídeos, aminoácidos e proteína de acordo com o método específico de cada um.

2.2.1 - Meio de Extração e Fracionamento

A extração do material vegetal foi feita em metanol, clorofórmio e água (MCW) nas proporções 12:5:3 (v/v). O material foi homogeneizado com 5 ml de solvente por grama de tecido no homogeneizador Polytron PT 35, durante 15 segundos, e centrifugado a $10.000 \times g$ por 15 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e 1 ml de clorofórmio mais 1,5 ml de água foram acrescentados (estes volumes foram usados para 4 ml de extrato). A seguir, o material sofreu agitação e, em seguida, colocados em um funil de separação para a separação da fase aquosa, livre de clorofila. Separada a fase aquosa, o material ficou em repouso para evaporar todo o clorofórmio, e então, dosar os ureídeos (alantoína e ácido alantóico) e aminoácidos. O precipi-

tado (material que contém a fração proteica), foi ressuspen-
dido em MCW (5 ml) e novamente centrifugado 15 minu-
tos. Após retirado o solvente o precipitado foi ressus-
pendido (3 vezes) em NaOH 0,1 N para extrair a proteína.
O volume usado de NaOH foi 5 ml/grama de material.

2.2.2 - Dosagem de Proteína

A proteína existente no ex-
trato foi determinada pelo método de "dye binding" de
BRADFORD (1976). O BSA (1 mg/ml) foi usado como padrão.
O reagente foi feito com 100 mg de Coomassie blue G250 em
50 ml de etanol a 95%, adicionando-se em seguida 100 ml
de H_3PO_4 a 85% (p/v) e completando-se para 1 litro com
água (H_2O). Para a dosagem de proteína, misturaram-se
5 ml do reagente com 0,1 ml de proteína (10-100 μ g). A
concentração de proteína existente nos extratos foi calcu-
lada através da curva padrão, que foi determinada usando-
-se concentrações de 10 - 100 μ g de proteína. A leitura
foi feita no espectrofotômetro à 595 nm.

2.2.3 - Dosagem de Aminoácidos

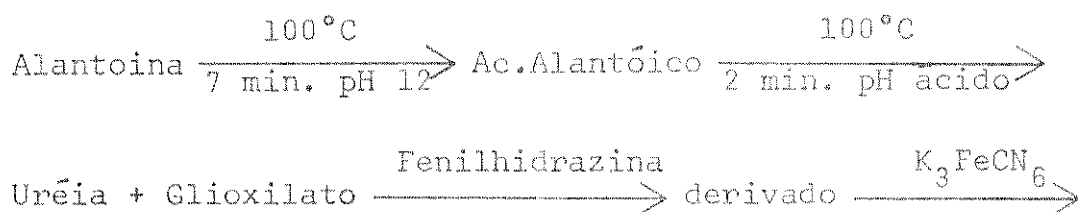
Para a dosagem de aminoáci-
dos, foi utilizado o método descrito por COCKING e YEMM
(1954). Nos tubos de reação foram colocados 1 ml de

ninhidrina a 5% (p/v) em metil celulose, 0,2 ml de cianeto de potássio a 2% (v/v) de uma solução 0,01 M em metil celulose, 0,5 ml de tampão citrato 0,2 M, pH 5,0 e 1 ml da amostra. Os tubos sofreram agitação e, em seguida, cobertos com bolas de vidro e levou-se ao banho fervente à 100°C por 20 minutos deixando-se esfriar à temperatura ambiente durante 10 minutos. Após, completou-se para 4 ml (volume final) com etanol a 60% e fez-se a leitura no espectrofotômetro a 570 nm.

Os resultados foram calculados a partir da curva padrão que foi feita com leucina nas concentrações de 0 a 100 nmoles.

2.2.4 - Dosagem de Ureídeos

A concentração dos ureídeos alantoina e ácido alantóico foi determinada pelo método descrito por TRIJBELS e VOGELS (1966). O princípio deste método pode ser resumido na seguinte série de reações:



coloração vermelha.

Para o ensaio usaram-se 1 ml da amostra, 0,2 ml de NaOH 0,5 N, 1 gota de fenilhidrazina 0,33% transferindo-se a mistura para banho fervente por 7 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados para esfriar em temperatura ambiente, adicionando-se 0,2 ml de HCl a 0,65 N, 0,2 ml de fenilhidrazina 0,33%, e novamente colocados em banho fervente durante 2 minutos e 15 segundos (tempo crítico). Os tubos, foram então colocados em gelo por 10 minutos, a seguir adicionaram-se 0,8 ml de HCl concentrado e 0,2 ml de ferricianeto de potássio (K_3FeCN_6) 1,65%. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 10 minutos, completando-se com 0,4 ml de água destilada o volume final (3 ml).

2.3 - Redução de Acetileno

Para avaliar a fixação de nitrogênio pelo material vegetal em estudo, utilizou-se a técnica da redução de acetileno (HARDY *et al.*, 1968). A enzima nitrogenase, responsável pela redução de nitrogênio atmosférico a amônia também cataliza a redução do acetileno em etileno.

As plantas foram removidas dos potes e as raízes agitadas cuidadosamente para remover a maior parte da vermiculita aderida a estas. O sistema

radicular foi destacado por inteiro do caule, e imediatamente colocado em frascos de vidro com capacidade para 600 ml, e vedados com tampa de borracha. Em seguida, injetaram-se 40 ml de acetileno e, em intervalos de tempo de 15 minutos, foram retiradas alíquotas de 0,5 ml por meio de uma seringa a fim de dosar a quantidade de etileno produzido. A dosagem de etileno foi feita por meio de cromatografia gasosa, utilizando-se uma coluna de Porapak N para separar etileno e acetileno. As dimensões da coluna foram de 1 m x 0,2 mm (d.i.). O forno do aparelho (marca Varian, modelo 2240-D) foi mantido a 110°C, o injetor a 140°C, e o detector a 150°C. Os fluxos dos gases foram os seguintes: N₂ (gás de arraste) 40 ml/min., H₂ (detector de ionização de chama), 40 ml/min. e ar, 1600 ml/min.. A análise de uma quantidade padrão de etileno permitiu transformar os dados em μ moles de acetileno reduzido.

III. RESULTADOS

1. Esterilização de Sementes

Devido à facilidade com que leguminosas como a soja nodulam mesmo sem inoculação, tornou-se necessário um trabalho para a obtenção de plantas não-noduladas, no qual várias precauções foram tomadas a fim de se evitar qualquer forma possível de contaminação. A primeira precaução foi de esterilizar as sementes que seriam utilizadas neste trabalho.

Com esta finalidade, fez-se um teste baseado no método descrito por SLOGER (1969), no qual as sementes são tratadas com EtOH a 95% durante 5 minutos seguido por HgCl_2 a 0,1%, durante 3 minutos. Entretanto, tal tratamento prejudicou muito a germinação das sementes (Tabela I) e, por este motivo foram testadas várias combinações de tempo para verificar a condição menos prejudicial à germinação. Pelos dados obtidos (Tabela I) verificou-se que os tratamentos com EtOH por 5 minutos ou HgCl_2 3 minutos isoladamente, não prejudicaram a germinação. Por outro lado, qualquer combinação de EtOH, mesmo com duração mais curta, seguida de HgCl_2 , diminuiu muito a germinação, sugerindo assim algum efeito tóxico.

TABELA I - TESTES PARA ESTERILIZAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA.

Sementes embebidas em HgCl_2 a 0,1% e em EtOH a 95% nos tempos indicados.

TRATAMENTO	TEMPO	GERMINAÇÃO (%)
H_2O	5.0 Min.	93,0
H_2O	2.5 Min.	93,0
HgCl_2	5.0 Min.	46,0
HgCl_2	3,0 Min.	100,0
EtOH	5.0 Min.	82,0
EtOH e HgCl_2	5,0 Min. e 4,0 Min.	25,0
EtOH e HgCl_2	4,0 Min. e 3,0 Min.	12,5
EtOH e HgCl_2	2,0 Min. e 3,0 Min.	28,5
EtOH e HgCl_2	3,0 Min. e 3,0 Min.	60,0
EtOH e HgCl_2	5,0 Min. e 3,0 Min.	18,0

Optou-se, portanto, pelo uso do HgCl_2 0,1% durante 3 minutos para a esterilização de sementes utilizadas neste trabalho.

2. Obtenção de Plantas Noduladas e Não-Noduladas

2.1 - Experimento 1

Visando encontrar melhores condições para o cultivo de plantas noduladas e não-noduladas, montou-se um experimento preliminar aplicando-se diferentes níveis de nitrogênio nas plantas não-inoculadas e naquelas inoculadas com *Rhizobium*. A solução nutritiva contendo os diferentes níveis de nitrogênio foi preparada misturando-se proporções da solução completa com a solução deficiente de nitrogênio, de modo que os teores finais de nitrogênio foram os seguintes: normal, 1/3 do normal, 1/10 do normal e solução totalmente deficiente de nitrogênio.

A figura 1 mostra o aspecto geral das plantas em condições de diferentes níveis de nitrogênio.

As plantas não-inoculadas, tratadas com solução nutritiva deficiente de nitrogênio, não apre-

FIGURA 1.- INFLUÊNCIA DO NITROGÊNIO NO DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE SOJA NODULADAS E NÃO-NODULADAS.

Da esquerda para a direita: não-inoculada tratada com solução nutritiva deficiente de nitrogênio (-N); não-inoculada com 1/10 de solução normal; não-inoculada com solução normal e inoculada com solução deficiente de nitrogênio



sentaram bom desenvolvimento, não formaram frutos e se apresentaram pouco enfolhadas, com folhas totalmente amareladas, indicando falta de nitrogênio. As plantas não-inoculadas, tratadas com solução contendo 1/10 de nitrogênio, também mostraram deficiência (algumas folhas amarelas), enquanto que os tratamentos com solução normal, e com 1/3 de nitrogênio, não apresentaram nenhum sintoma de deficiência. Isto sugere que, para o desenvolvimento normal de plantas não-noduladas, a solução nutritiva deve conter pelo menos 1/3 de nitrogênio ou mais. Foi observado que plantas inoculadas e cultivadas na ausência de nitrogênio formam nódulos (Fig. 1, planta da direita), os quais são capazes de fornecer todo o nitrogênio que estas plantas necessitam para seu desenvolvimento. Entretanto, o comportamento das plantas, nos diferentes tratamentos foi melhor avaliado através da observação da nodulação e determinação do peso da planta (Fig. 2). Neste mesmo experimento foi calculada a quantidade de ureídeos, pois objetivou-se a obtenção de plantas não-noduladas com baixos níveis de ureídeos.

a) Formação de Nódulos

A avaliação do efeito dos tratamentos sobre a formação de nódulos foi feita pela determinação do peso fresco e número de nódulos para cada trata-

FIGURA 2 - INFLUÊNCIA DO NITROGÊNIO NA FORMAÇÃO DE NÓDULOS EM PLANTAS DE SOJA INOCULADAS.

O número de nódulos está indicado no interior da coluna.

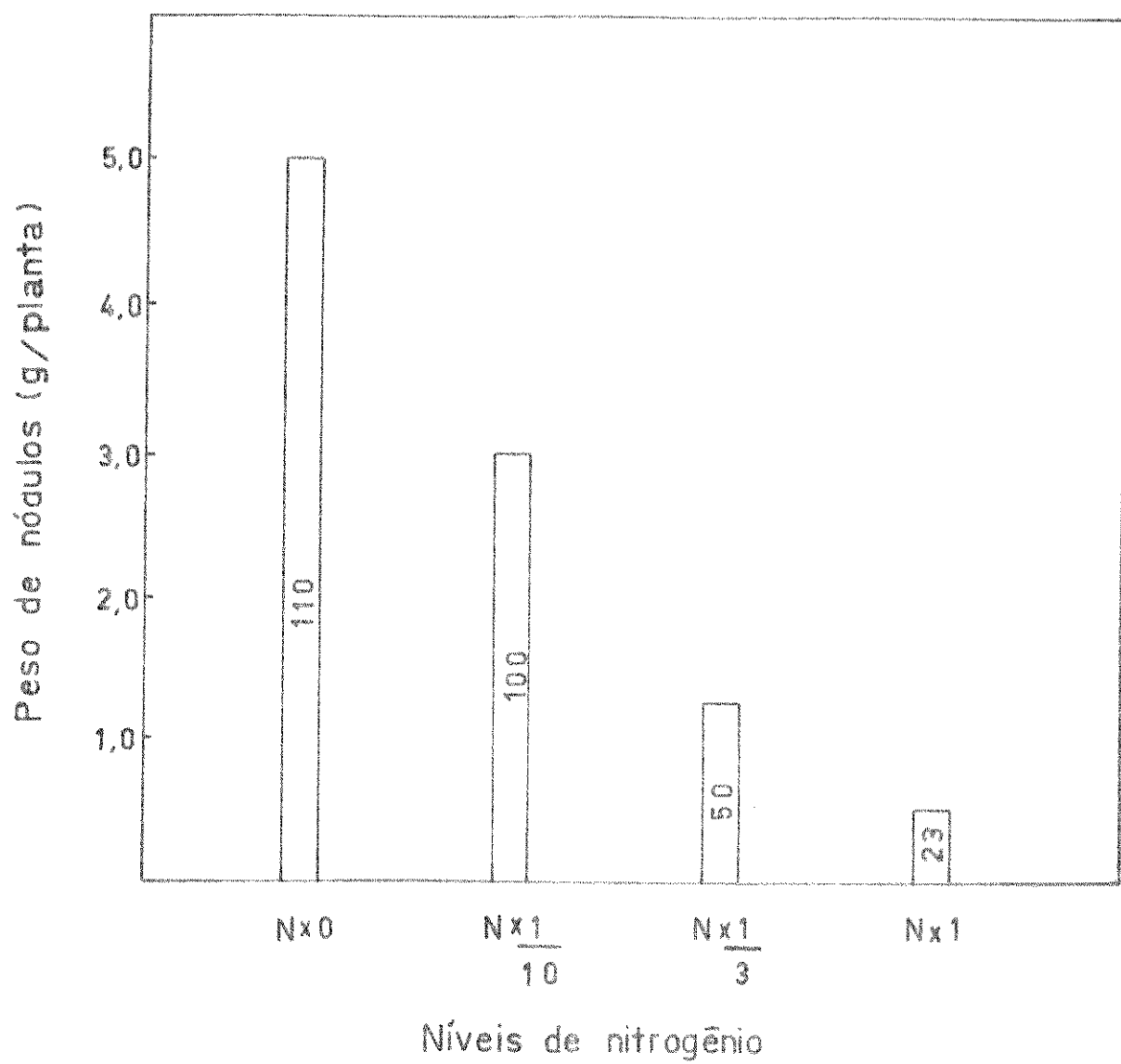
Níveis de nitrogênio:

N x 1 solução normal ($\text{NO}_3^- = 15 \text{ mM}$).

N x $\frac{1}{3}$ nitrogênio $\frac{1}{3}$ do normal.

N x $\frac{1}{10}$ nitrogênio $\frac{1}{10}$ do normal.

N x 0 solução deficiente de nitrogênio.



mento que recebeu inóculo.

Pode-se observar pelos resultados apresentados na figura 2 que o tratamento com inoculação, e sem adição de nitrogênio, apresentou maior peso e maior número de nódulos. Portanto, se mais nitrogênio na forma de nitrato, foi adicionado à solução nutritiva, menor será o grau de nodulação obtido, como ocorreu no tratamento com solução nutritiva normal, em que a nodulação foi reduzida a um nível muito baixo.

b) Peso da Planta

Antes da realização das várias dosagens foi determinado o peso fresco de cada órgão da parte aérea. Os dados incluídos na figura 3 mostram os valores de peso fresco, expressos em grama por planta, para ambos os tratamentos, nodulados e não-nodulados.

Para as plantas que foram inoculadas todos os tratamentos com nitrogênio foram semelhantes em termos de peso fresco atingido pela parte aérea, com excessão do tratamento sem nitrogênio (-N), que apesar da boa nodulação não mostrou o mesmo desenvolvimento, atingindo um peso aproximadamente 50% dos demais. Possivelmente, isto se deveu ao fato da deficiência de nitrogênio nestas plantas ter ocorrido antes da nodulação efe-

FIGURA 3 - INFLUÊNCIA DO NITROGÊNIO NO PESO FRESCO DA PARTE AÉREA DE PLANTAS DE SOJA INOCULADAS E NÃO-INOCULADAS.

Parte aérea separada em folha (F), caule (C) e vagem (V).

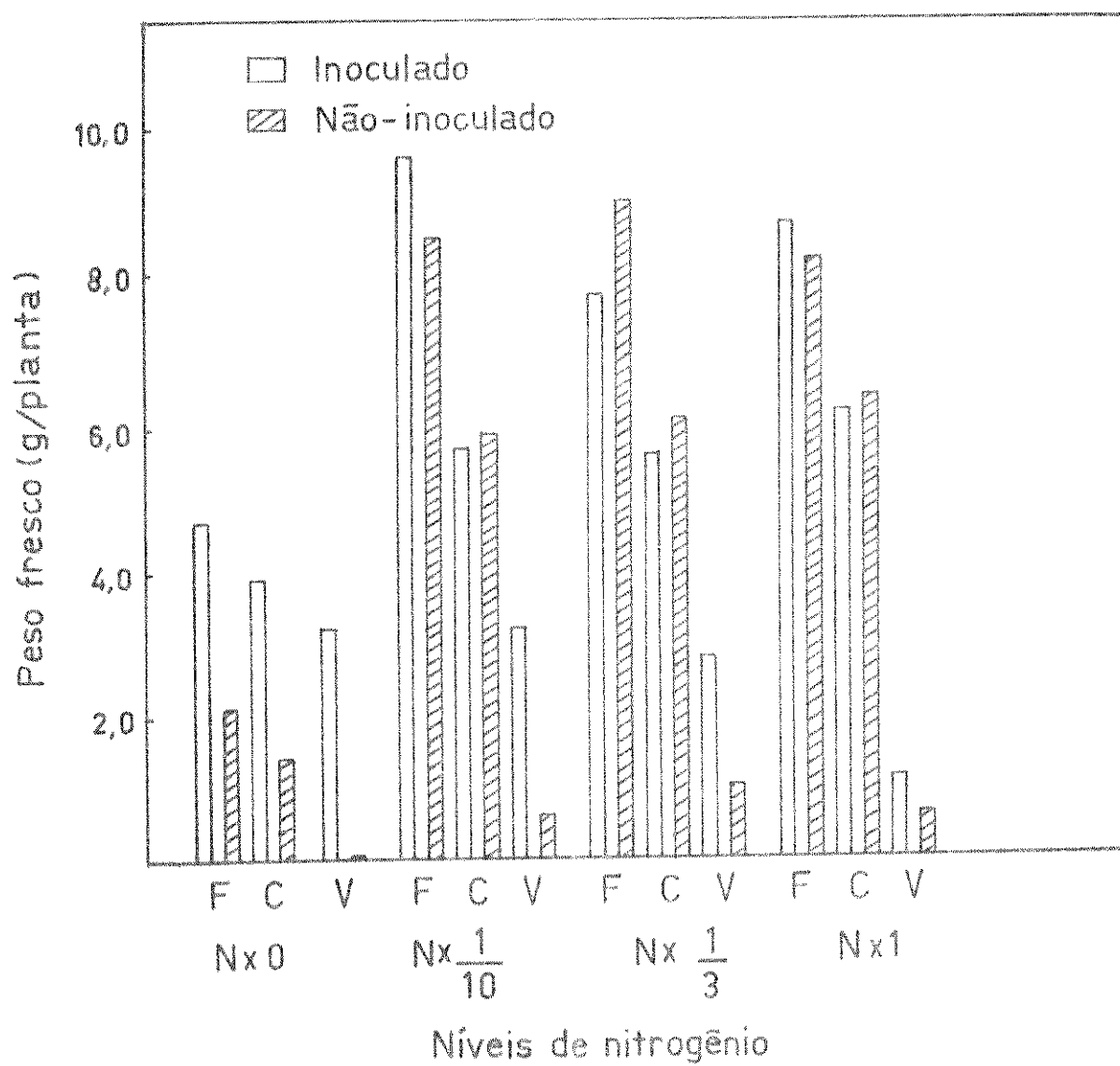
Níveis de nitrogênio:

N x 1 solução normal ($\text{NO}_3^- = 15 \text{ mM}$).

N x $\frac{1}{3}$ nitrogênio $\frac{1}{3}$ do normal.

N x $\frac{1}{10}$ nitrogênio $\frac{1}{10}$ do normal.

N x 0 solução deficiente de nitrogênio.



tiva, retardando portanto, o desenvolvimento da planta. Não se pode também, afastar a possibilidade de que a planta tenha utilizado o nitrato com maior eficiência do que o nitrogênio atmosférico. Entretanto, esta possibilidade parece menos provável, uma vez que o tratamento com 1/10 de nitrogênio, possivelmente numa concentração limite, julgando-se pela senescência precoce de algumas folhas (ver Figura 1), não ter ocasionado diminuição do peso da planta.

Nas plantas não-inoculadas, também os tratamentos contendo 1/10, 1/3 de nitrogênio e nitrogênio normal foram equivalentes entre si e semelhantes às plantas noduladas, indicando que os níveis de nitrogênio foram suficientes, mesmo no tratamento com 1/10 de nitrogênio. Entretanto, o tratamento deficiente de nitrogênio (-N), mostrou plantas mal desenvolvidas, com menor peso, folhas cloróticas e não chegando a formar fruto.

c) Dosagem de Ureídeos

O resultado da dosagem de ureídeos nas partes aéreas da planta (caule - folha - vagem) para os vários tratamentos, estão representados na figura 4.

FIGURA 4 - INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES NÍVEIS DE NITROGÊNIO NA QUANTIDADE DE UREÍDEOS DE PLANTAS DE SOJA INOCULADAS E NÃO-INOCULADAS.

O número de nódulos está indicado no interior da coluna.

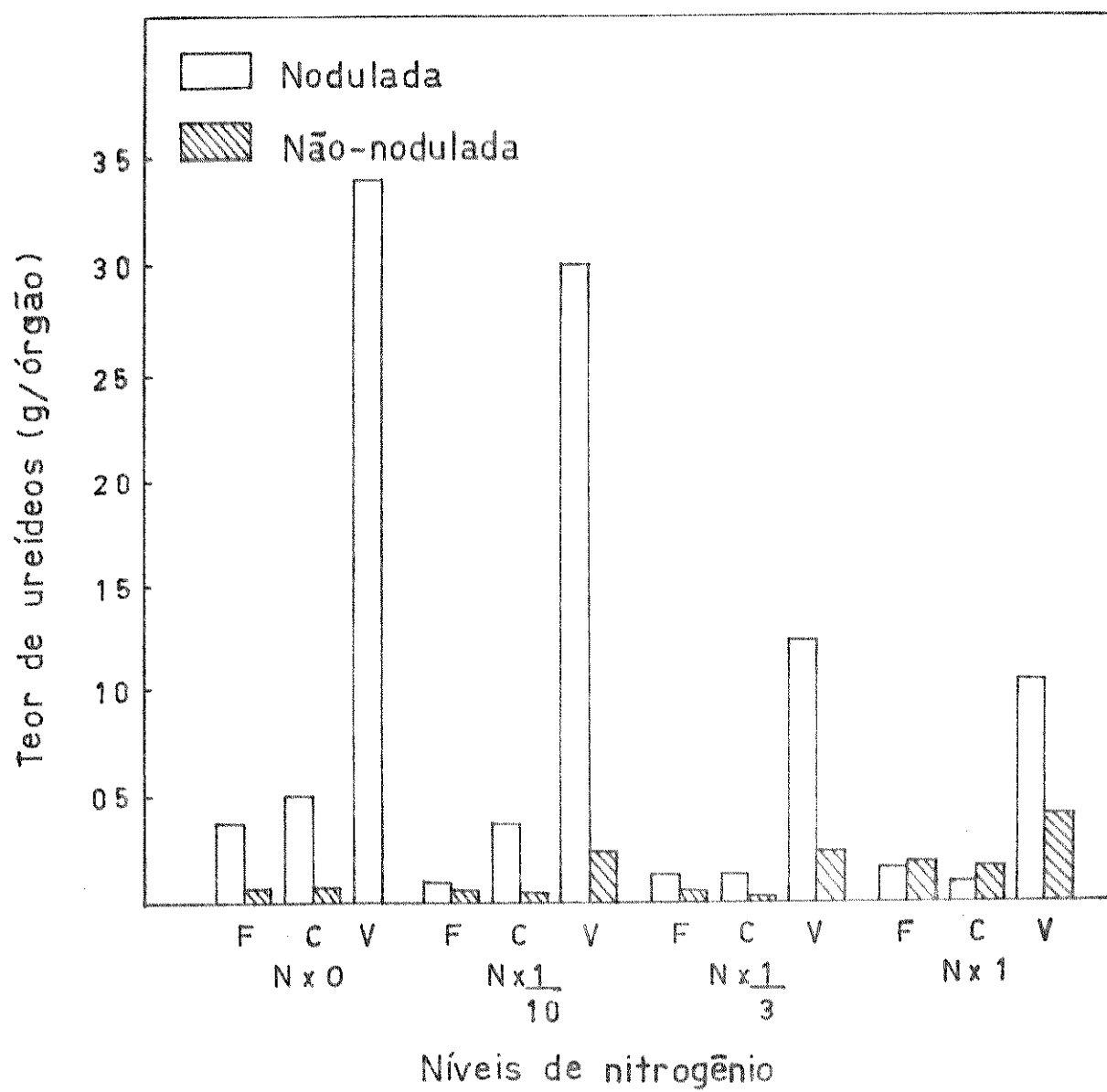
Níveis de nitrogênio:

N x 1 solução normal ($\text{NO}_3^- = 15 \text{ mM}$).

N x $\frac{1}{3}$ nitrogênio $\frac{1}{3}$ do normal.

N x $\frac{1}{10}$ nitrogênio $\frac{1}{10}$ do normal.

N x 0 solução deficiente de nitrogênio.



De todos os tecidos analisados, os nodulados foram os que apresentaram níveis mais altos de ureídeos, contrastando assim com os não-nodulados. No tratamento não-inoculado, e totalmente deficiente em nitrogênio, as plantas não chegaram a formar vagem. O experimento mostrou que houve uma tendência de aumento do nível de ureídeos nos tratamentos que receberam quantidades maiores de nitrogênio apesar da não formação de nódulos. No tratamento com solução normal, por exemplo, o nível de ureídeos na folha e no caule foi semelhante ao das plantas noduladas, embora o número tenha sido menor (Fig. 4), assim como para as plantas não-noduladas. Portanto, ficou evidenciada a existência de uma relação entre nodulação e formação de ureídeos, embora na ausência de nódulos não se tenha observado total ausência de ureídeos.

2.2.- Experimento 2

O experimento anterior demonstrou a formação de ureídeos na ausência aparente de nódulos, embora em níveis muito baixos. Para se verificar a possibilidade se tais plantas apresentam algum nível de nodulação, talvez abaixo do nível de detecção visual, o experimento foi repetido com a finalidade de dosar a capacidade de fixação de nitrogênio através da redução de acetileno, método este muito sensível e mais apropriado para a

avaliação da fixação de nitrogênio, comparado com a observação da nodulação. Com esta finalidade foram utilizados os tratamentos extremos ou sejam plantas inoculadas, tratadas com e sem nitrogênio, e plantas não-inoculadas tratadas com solução nutritiva normal.

a) Número e Peso de Nódulos

Assim como no primeiro experimento, as plantas não-inoculadas não formaram nódulos, enquanto que as inoculadas nodularam bem como pode-se constatar na tabela II.

b) Peso da Planta

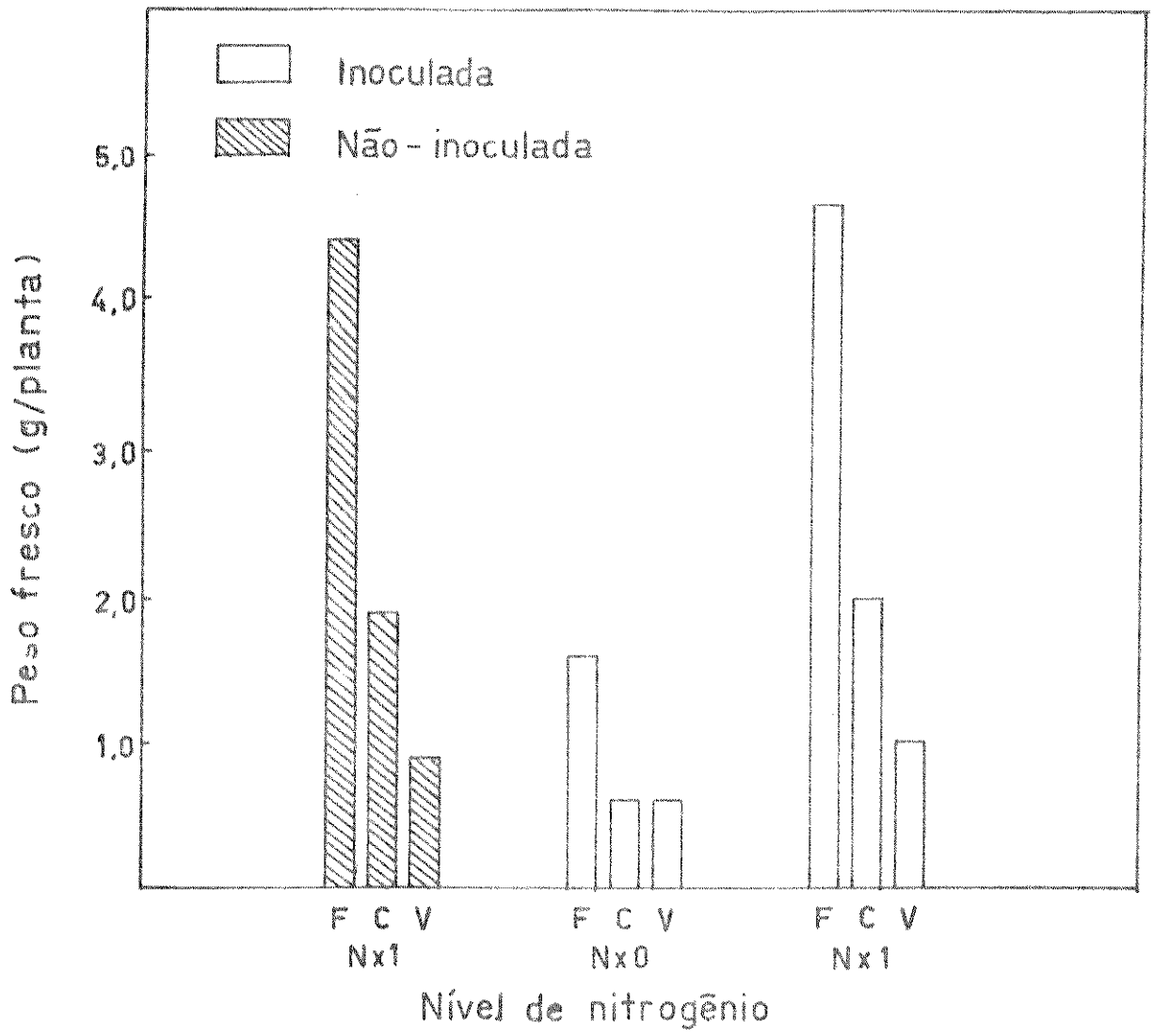
Foram observados resultados semelhantes àqueles obtidos no experimento anterior (Fig. 5) onde as plantas inoculadas, tratadas com solução deficiente em nitrogênio, mostraram pesos menores comparadas às não-inoculadas tratadas com solução normal. O mesmo pode ser observado com as plantas inoculadas tratadas com solução nutritiva normal, onde o peso destas foi bem maior. Portanto, em termos de peso fresco, as plantas noduladas e não-noduladas comportaram-se de maneira semelhante ao experimento anterior.

TABELA II - INFLUÊNCIA DO NITROGÊNIO NA FORMAÇÃO DE NÓDULOS EM PLANTAS DE SOJA INOCULADAS.

NÍVEL DE NITROGÊNIO	PESO FRESCO (g /planta)	NÚMERO DE NÓDULOS
Deficiente em nitrogênio	0,40	59
Solução normal ($\text{NO}_3^- = 15 \text{ mM}$)	0,05	22

FIGURA 5 - INFLUÊNCIA DA NITROGÊNIO NO PESO FRESCO DA PARTE AÉREA DE PLANTAS DE SOJA INOCULADAS E NÃO-INOCULADAS.

Parte aérea separada em folha (F), caule (C) e vagem (V).



c) Redução de Acetileno

As taxas de redução de acetileno (Fig. 6) foram obtidas de acordo com o grau de nodulação. Através deste experimento observou-se que plantas não-inoculadas não reduziram acetileno, confirmando desse modo a ausência de nódulos nestas plantas. Plantas inoculadas, ao contrário, reduziram acetileno, embora em um nível muito baixo nas plantas que foram tratadas com nitrato, o que está de acordo com o grau de nodulação destas.

d) Ureídeos

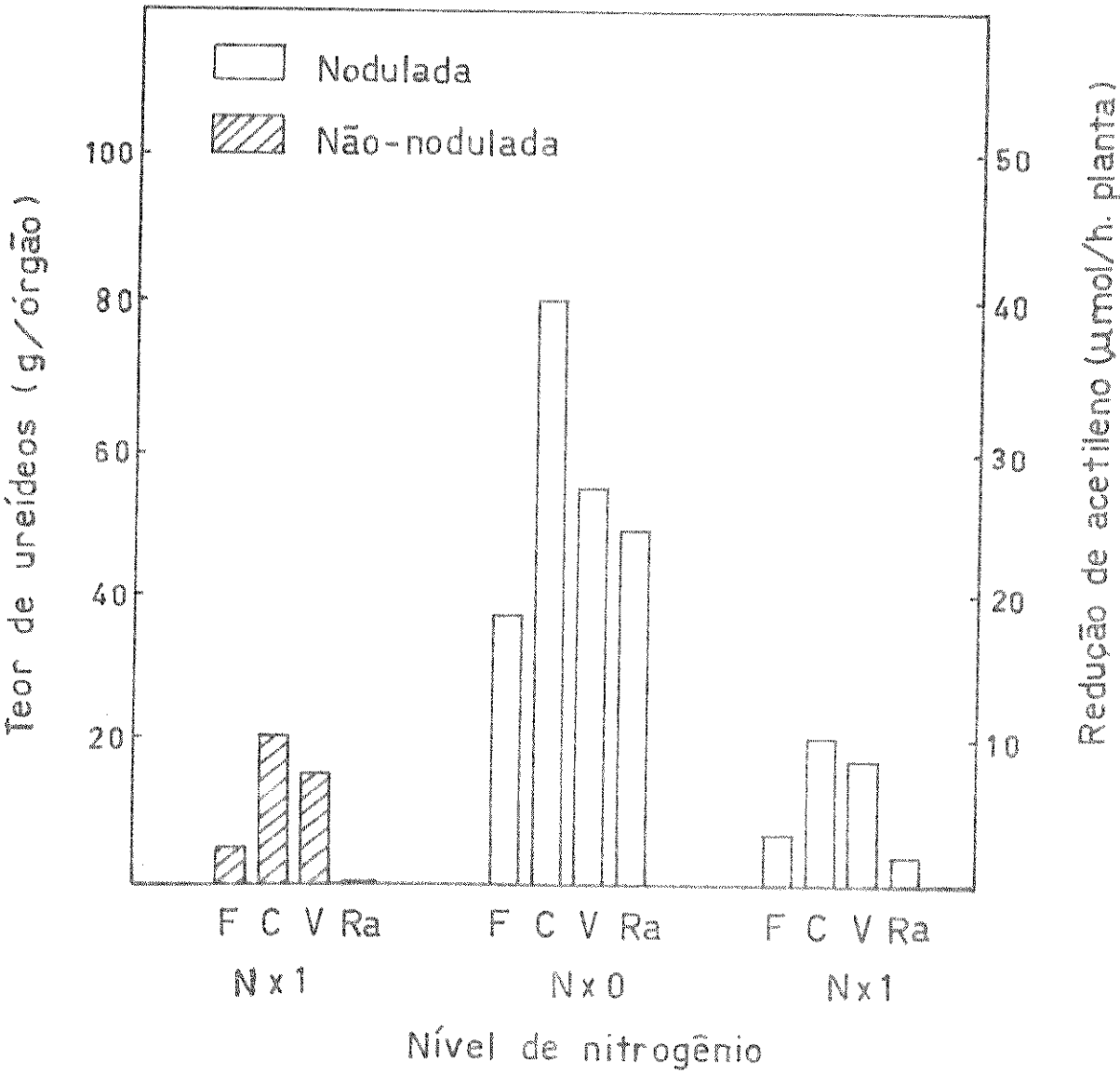
Neste experimento foi também dosada a quantidade de ureídeos nos tecidos da parte aérea (caule - folha - vagem), e os resultados estão apresentados na figura 6.

O alto nível de ureídeos nas plantas noduladas, cultivadas na ausência de nitrogênio está de acordo com os altos níveis de nodulação e redução de acetileno.

Da mesma forma, os reduzidos níveis de ureídeos nas plantas inoculadas e cultivadas na presença de NO_3^- podem ser relacionados com os baixos ní-

FIGURA 6 - INFLUÊNCIA DO NITROGÊNIO NA QUANTIDADE DE UREÍDEOS E NA TAXA DA REDUÇÃO DE ACETILENO EM PLANTAS DE SOJA NODULADAS E NÃO-NODULADAS. Parte aérea separada em folha (F), caule (C) e vagem (V).

Avaliação da fixação de nitrogênio no sistema radicular, pela taxa de redução de acetileno (Ra).



veis de nodulação e redução de acetileno. Entretanto, as plantas não-inoculadas, que não produziram nódulos e não foi detectada atividade de nitrogenase, produziram ureídeos em quantidade equivalente àquela como do tratamento anterior. Portanto, a produção de um nível mínimo de ureídeos parece ser uma ocorrência normal, mesmo na ausência de fixação de nitrogênio. Isto de certa forma contraria a hipótese inicialmente formulada neste trabalho, uma vez que não foi possível eliminar totalmente a formação de ureídeos em plantas não-noduladas.

3. Experimentos Preliminares com as Enzimas

3.1 - Extração

O desenvolvimento deste trabalho envolveu a dosagem das enzimas alantoinase, asparaginase e glutamina sintetase nos tecidos do fruto de soja durante sua ontogênia. O objetivo inicial foi estabelecer um único meio de extração para as três enzimas, o que seria muito conveniente em termos operacionais. De acordo com a literatura, observa-se que a atividade de cada uma das enzimas consideradas é normalmente determinada em meios de extração diferentes, como mostra a tabela III.

A seguir são descritos os experimenen

TABELA III - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE EXTRAÇÃO NORMALMENTE USADOS PARA AS ENZIMAS ALANTOINASE, ASPARAGINASE E GLUTAMINA SINTETASE.

Asparaginase (SODEK *et al.*, 1980).

Glutamina sintetase (RHODES *et al.*, 1975).

Alantoinase (TRIJBELS e VOGELS, 1966).

COMPOSIÇÃO MEIO DE EXTRAÇÃO	GLUTAMINA		
	ALANTOINASE	ASPARAGINASE	SINTETASE
Tampão	Tris	Tris	Imidazol
pH	8,0	8,0	7,0
KCl	-	-	-
Triton X-100	+	-	-
2ME/DTT	+	+	+

+ PRESENTE

- AUSENTE

tos visando a otimização do método de determinação da atividade das três enzimas simultaneamente.

3.1.1 - O tampão tris é utilizado para a dosagem das enzimas alantoinase e asparaginase, e o imidazol para a enzima glutamina sintetase. Os primeiros testes indicaram que a presença de tris inibe totalmente a atividade da enzima glutamina sintetase. Diante desta indicação considerou-se a possibilidade de substituir o tampão tris, pH 8,0 pelo imidazol pH 7,0, na extração da alantoinase. Os resultados estão apresentados na tabela IV.

Os dados mostram que a alantoinase apresentou atividade nos dois extratos preparados com tris e com imidazol, embora a atividade com o imidazol tenha sido menor. Por este motivo fez-se um outro ensaio para verificar se a presença de imidazol causava inibição sobre a atividade da alantoinase. Neste experimento foi utilizado o extrato enzimático preparado com tris, e uma alíquota de 0,1 ml do tampão imidazol incluído no ensaio. O resultado (Tabela V) mostra que houve pouca influência na atividade da alantoinase quanto à presença ou ausência do imidazol. O conflito entre os resultados possivelmente deveu-se a uma diferença na extração, mais do que um efeito do imidazol sobre a enzima.

TABELA IV - ATIVIDADE DA ENZIMA ALANTOINASE EM COTILÉDONES UTILIZANDO-SE DOIS MEIOS DE EXTRAÇÃO.

Imidazol 50 mM 7,0 + DTT 1 mM.

Tris 50 mM pH 8,0 + 2ME 5 mM.

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO	ALANTOINASE ($\mu\text{mol/h. ml}$)
Tris HCl	27,72
Imidazol	19,36
Imidazol pH 7,0 + DTT ou Tris pH 8,0 + 2ME	

TABELA V - EFEITO DO IMIDAZOL NA ATIVIDADE DA ENZIMA ALANTOINASE EM COTILÉDONES.

Extração feita em Tris HCl 50 mM pH 8,0 + 2ME 15 mM e alantoinase dosada na presença e na ausência de 0,1 ml de Imidazol 50 mM.

ENSAIO	ALANTOINASE ($\mu\text{mol/h.ml}$)
Sem imidazol	22,88
Com imidazol	20,02

De qualquer forma, a conclusão foi que não haveria nenhuma contra-indicação quanto ao uso de imidazol no tampão de extração para a dosagem de alantoinase.

3.1.2 - KCl

A asparaginase é uma enzima dependente do íon potássio, daí ser necessária sua inclusão (50 mM) na dosagem desta enzima em muitas espécies de leguminosas, não só no meio de ensaio, mas também durante a extração, visando estabilizar a enzima (SODEK *et al.*, 1980). Assim, testou-se o uso de KCl no meio de extração da alantoinase e glutamina sintetase. Os resultados deste experimento estão apresentados na tabela VI.

Como pode-se observar pelos dados, o uso de KCl não causou nenhum efeito inibidor na atividade das duas enzimas sugerindo, ao contrário, que ocorreu maior eficiência na extração da glutamina sintetase. Desta maneira, ficou estabelecido a adição de KCl durante a extração das três enzimas, considerando que sua presença é indispensável para a enzima asparaginase.

3.1.3 - Triton X-100

A inclusão do triton X-100 pode provocar aumento na eficiência da alantoinase dos te

cidos, pois sua ação como detergente, atuando na desintegração das membranas, iria facilitar a extração das enzimas associadas com tais estruturas. Entretanto, verificou-se que a inclusão daquele composto no meio de extração não propiciou nenhum aumento da atividade da alantoinase, que atingiu 14,0 $\mu\text{mol/h.ml}$ em presença do detergente, e 15,4 $\mu\text{mol/h.ml}$ no tratamento sem nenhuma adição. É provável que a enzima de cotilédones de soja não esteja associada a nenhuma estrutura membranosa, como é o caso da enzima de tecidos de folha. Por este motivo optou-se pela não inclusão de triton X-100 no meio de extração.

3.1.4 - Atividade da Asparaginase

Neste experimento foram comparados os meios de extração Imidazol-KCl-DTT e Tris-KCl-2ME para o ensaio da enzima asparaginase. Foi verificado que a atividade da enzima foi semelhante com a utilização dos dois meios de extração (Tabela VII), e decidiu-se pelo uso do tampão imidazol + KCl + DTT para a extração e dosagem simultânea das enzimas alantoinase, asparaginase e glutamina sintetase.

TABELA VI - INFLUÊNCIA DO KCl NO MEIO DE EXTRAÇÃO PARA AS ENZIMAS ALANTOINASE E GLUTAMINA SINTETASE.

Enzimas extraídas de cotilédones com imidazol 50 mM pH 8,0 + DTT 1 mM.

MEIO DE EXTRAÇÃO	ALANTOINASE ($\mu\text{mol/h.ml}$)	GLUTAMINA SINTETASE ($\mu\text{mol/h.ml}$)
Com KCl	33,88	2,20
Sem KCl	31,24	1,30

TABELA VII - ATIVIDADE DA ENZIMA ASPARAGINASE EM COTILÉDONES UTILIZANDO-SE DOIS MEIOS DE EXTRAÇÃO.

Tris.HCl 50 mM pH 8,0 + 2ME 15 mM.

Imidazol 50 mM pH 7,0 + DTT 1 mM.

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO	ASPARAGINASE ($\mu\text{mol/h.ml}$)
Tris HCl	0,117
Imidazol	0,110

3.2 - Características Cinéticas

3.2.1 - Alantoinase

a) pH Ótimo

Para a determinação do pH ótimo, a atividade da enzima alantoinase foi determinada usando uma faixa de pH entre 5,0 e 9,0. Entre os valores de pH de 5,0 a 7,0 utilizou-se o tampão MES - KOH e entre 7,0 e 9,0 o tampão Tris-HCl. O pH ótimo para a determinação da atividade da enzima, ocorreu em valores próximos de 8,0, como pode ser verificado na figura 7.

b) Concentração do Substrato

Os valores incluídos na figura 8, mostram o efeito de diferentes concentrações do substrato, alantoina, sobre a atividade enzimática. Pelos resultados ficou estabelecido o uso da concentração de 15 mM, nos experimentos seguintes com esta enzima. A curva sugere cinética de Michaelis-Menten até concentrações de 15 mM de substrato.

Acima desse ponto, embora a atividade se eleve de forma mais acentuada, as con-

FIGURA 7 - INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE DA ENZIMA ALAN-
TOINASE.

MES KOH (● — ●), TRIS.HCl (○ — ○).

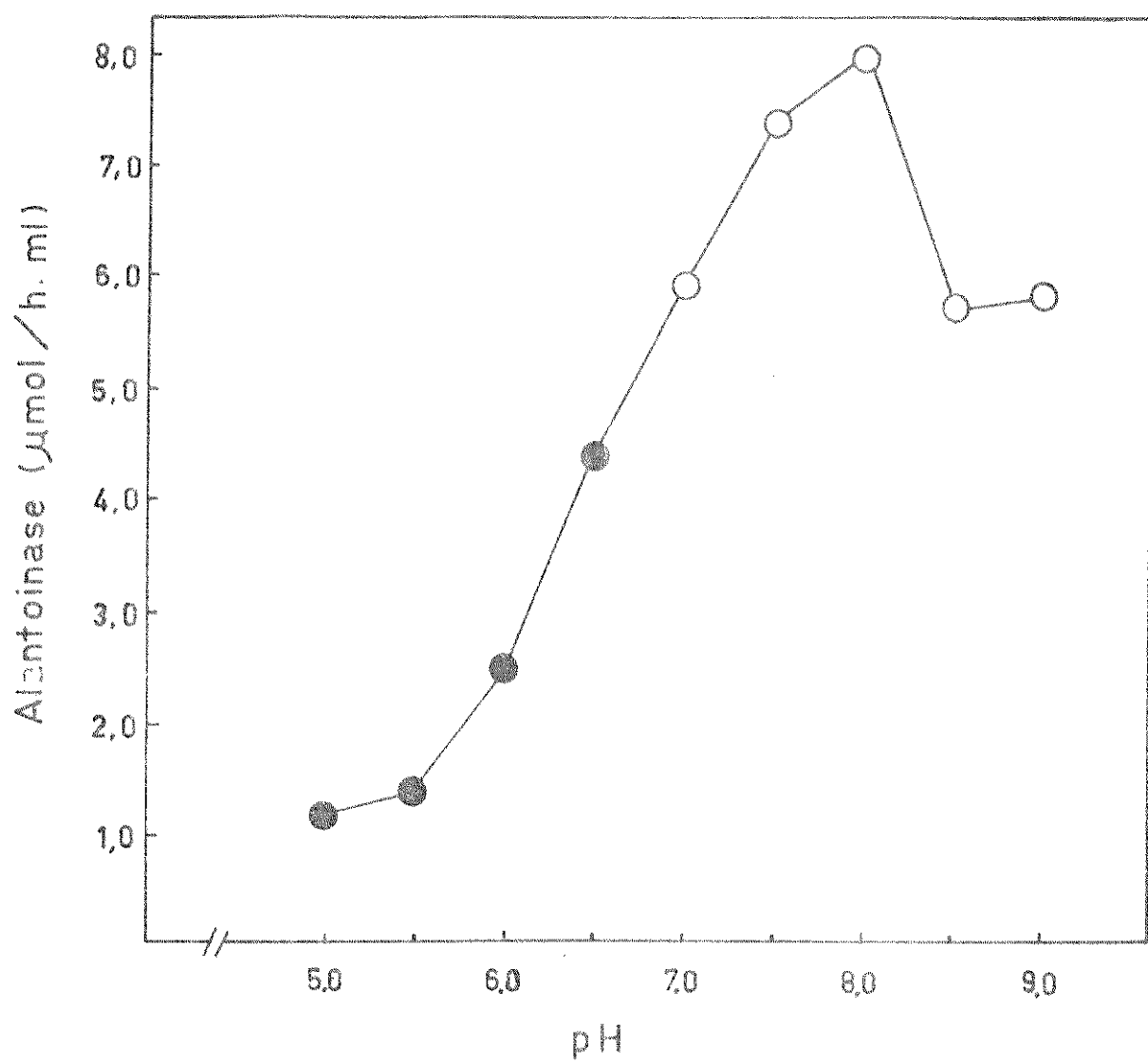
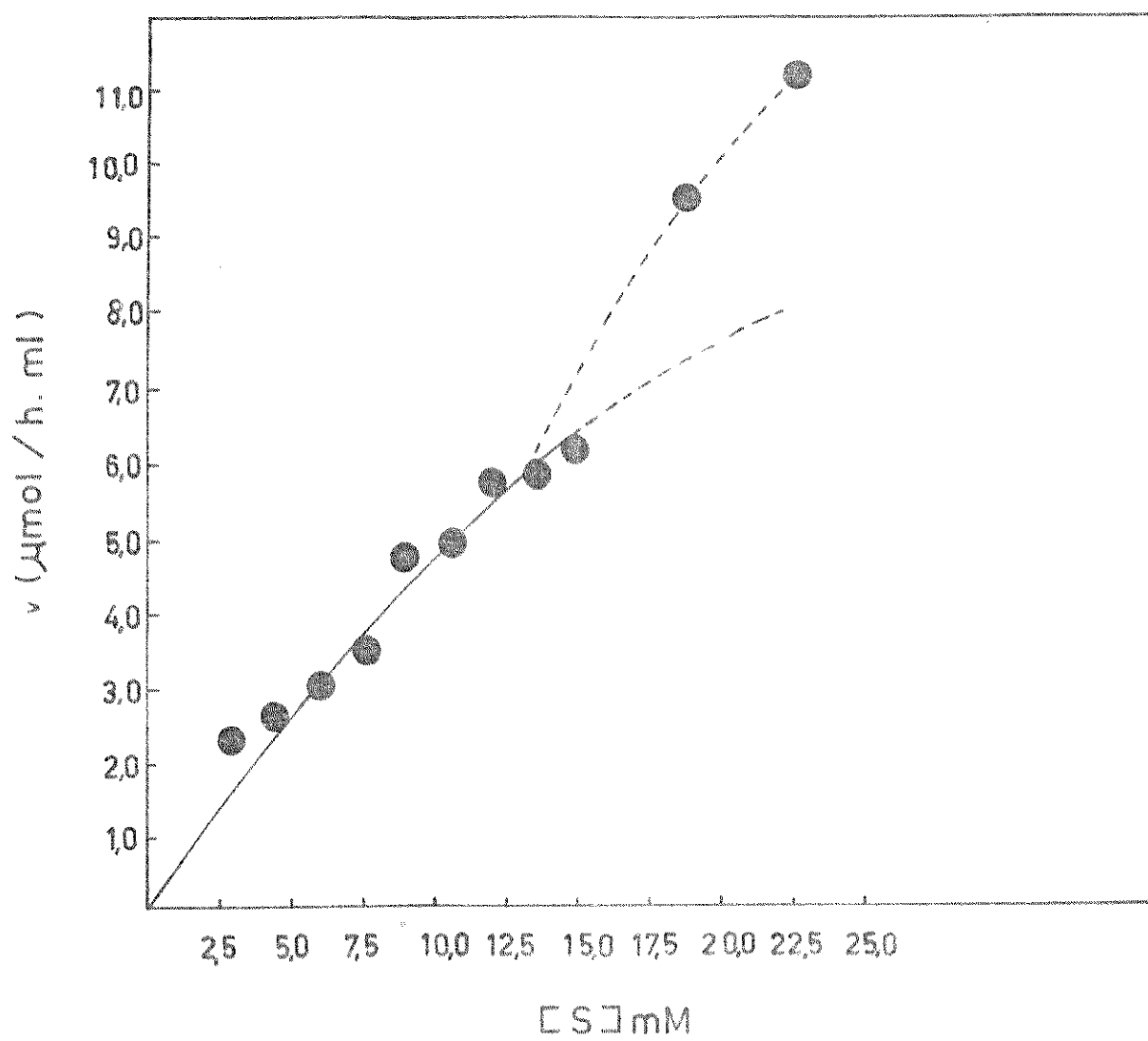


FIGURE 1
ALANTOINASE

FIGURA 8 - VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ALANTOINASE EM
FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO.



dições do ensaio foram dificultadas pela diminuição da solubilidade do substrato.

Esta curva aparentemente bifásica, se repetiu em duas outras ocasiões em que este experimento foi repetido, mas seu significado é desconhecido.

Ainda neste experimento foi determinado o valor do K_m para alantocina a partir do gráfico de Lineweaver e Burk (Fig. 9). O valor encontrado para o K_m aparente foi de 15,0 mM, sem considerar as duas concentrações maiores.

c) Tempo de Reação

Foi realizado um experimento com a finalidade de determinar a velocidade da reação em função do tempo de incubação. Como pode-se observar pela figura 10, a reação foi linear com o tempo até o tempo máximo testado, que foi de 60 minutos. Isto demonstrou que a concentração do substrato não está limitando a reação. Utilizou-se, então, este tempo de reação para as determinações rotineiras da atividade da enzima alantoinase.

FIGURA 9 - DETERMINAÇÃO DO K_m DA ENZIMA ALANTOINASE SEGUNDO
DO LINEWEAVER-BURK.

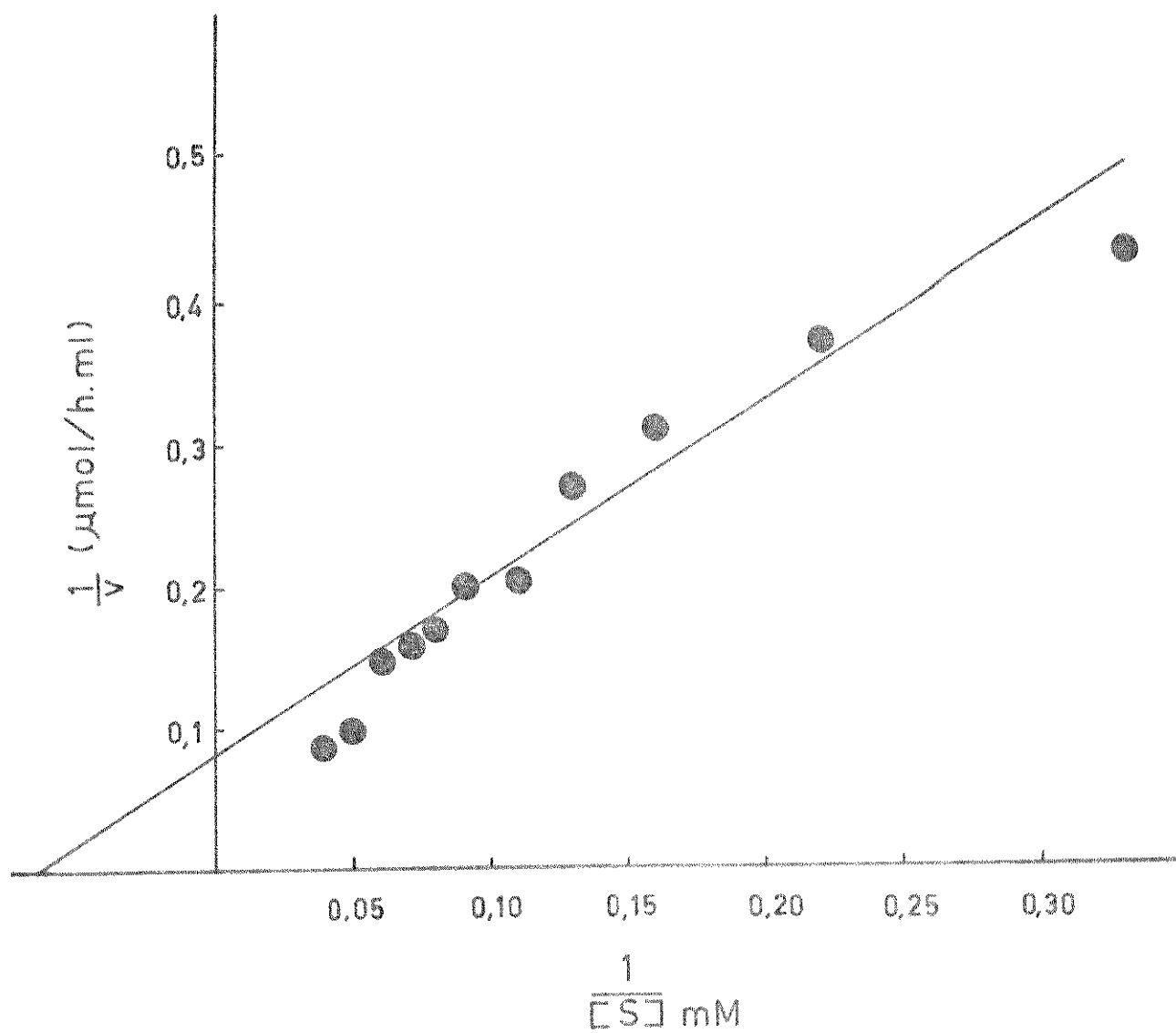
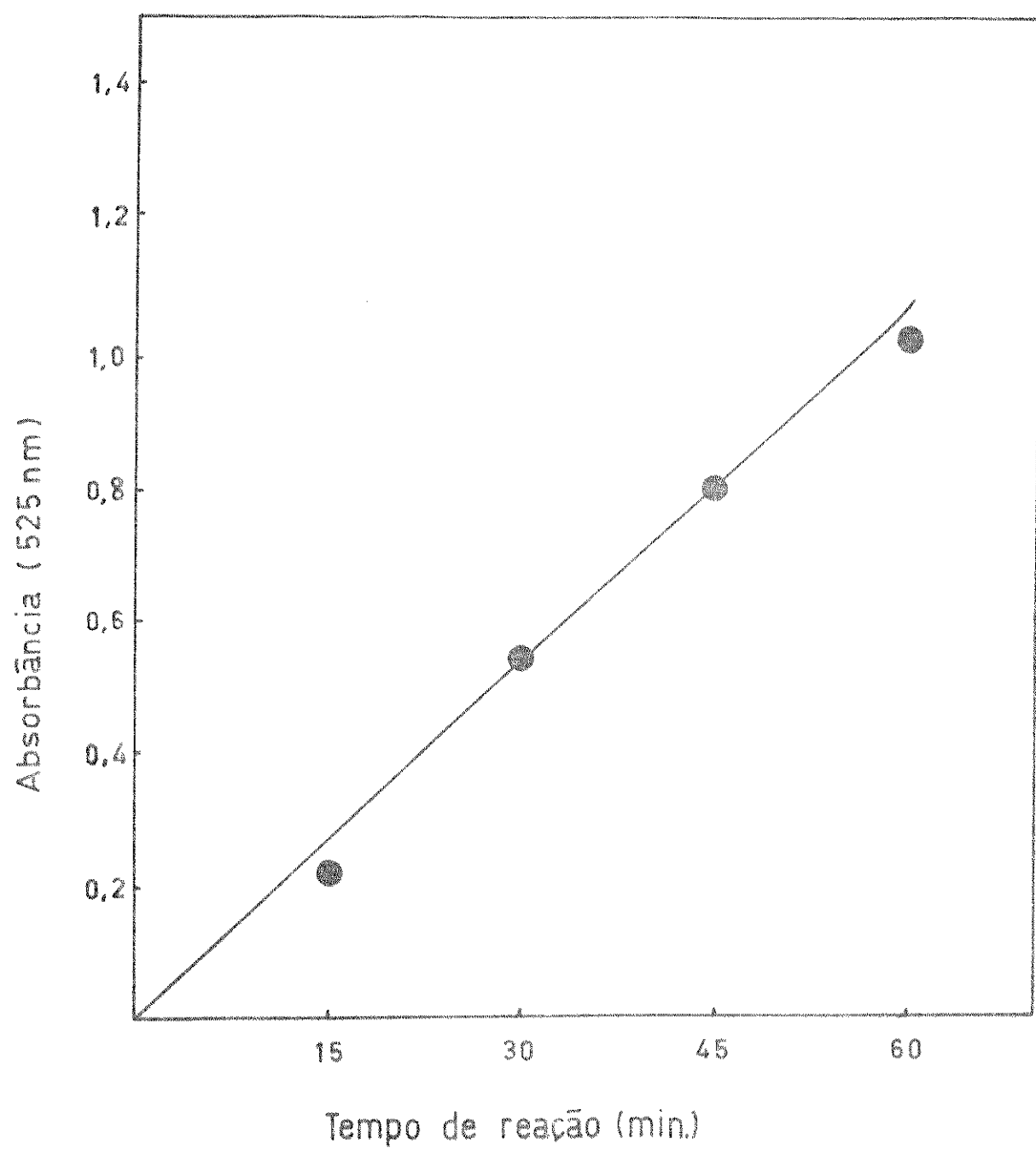


FIGURA 10 - FORMAÇÃO DE PRODUTO EM RELAÇÃO AO TEMPO PARA
A ENZIMA ALANTOINASE.



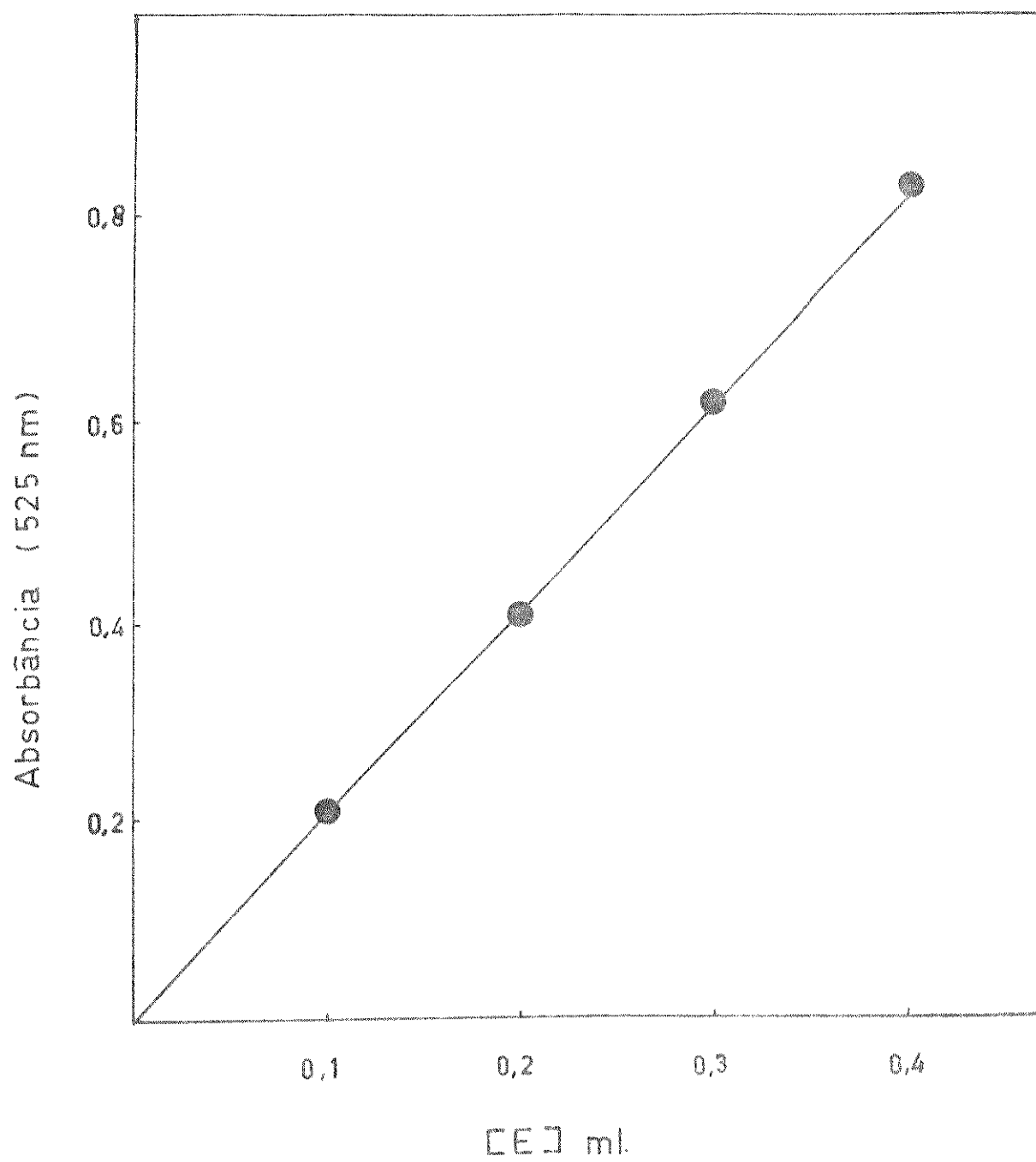
d) Concentração da Enzima

Os resultados do experimento que relacionou a atividade da alantoinase com a quantidade de enzima são mostradas na figura 11. Foram utilizadas quatro quantidades de extrato no meio, e os valores mostraram que a atividade é proporcional à quantidade de alantoinase, até a absorbância de 0,8. Ficou assim estabelecido que o ensaio nessas condições está perfeitamente adequado para a dosagem da enzima em diferentes extratos.

3.2.2 - Glutamina Sintetase e Asparaginase

Os parâmetros cinéticos destas enzimas são bem conhecidos (LEA *et al.*, 1978; STEWART *et al.*, 1980; SODEK *et al.*, 1980) e por isso, não foi feita nenhuma modificação nos métodos descritos na literatura. Apenas no caso da glutamina sintetase, cujo ensaio é muito sensível à presença de ATPases endógenas, foi julgado aconselhável verificar a linearidade da reação com o tempo e a relação atividade e concentração da enzima.

FIGURA 11 - ATIVIDADE DA ALANTOINASE EM DIFERENTES QUANTIDADES DE ENZIMA.



a) Reação da Glutamina Sintetase com o Tempo

A atividade da enzima foi determinada em intervalos de tempo de 10 minutos até 40 minutos. Diante dos resultados apresentados na figura 12 observou-se que a reação foi linear para esta enzima até o tempo máximo testado (40 minutos). Ficou então estabelecido que o tempo usado para os ensaios de rotina seria de 15 e 30 minutos, para assegurar a linearidade da reação em qualquer extrato.

b) Concentração para a Enzima Glutamina Sintetase

Os resultados apresentados na figura 13 mostram que a atividade da glutamina sintetase é proporcional à concentração da enzima, até valores de absorbância de 0,32.

4. Peso Fresco

O peso fresco de cada tecido foi determinado durante todo o transcorrer do experimento e feitas comparações com as variações na atividade das enzimas,

FIGURA 12 - FORMAÇÃO DE PRODUTO EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA A
ENZIMA GLUTAMINA SINTETASE.

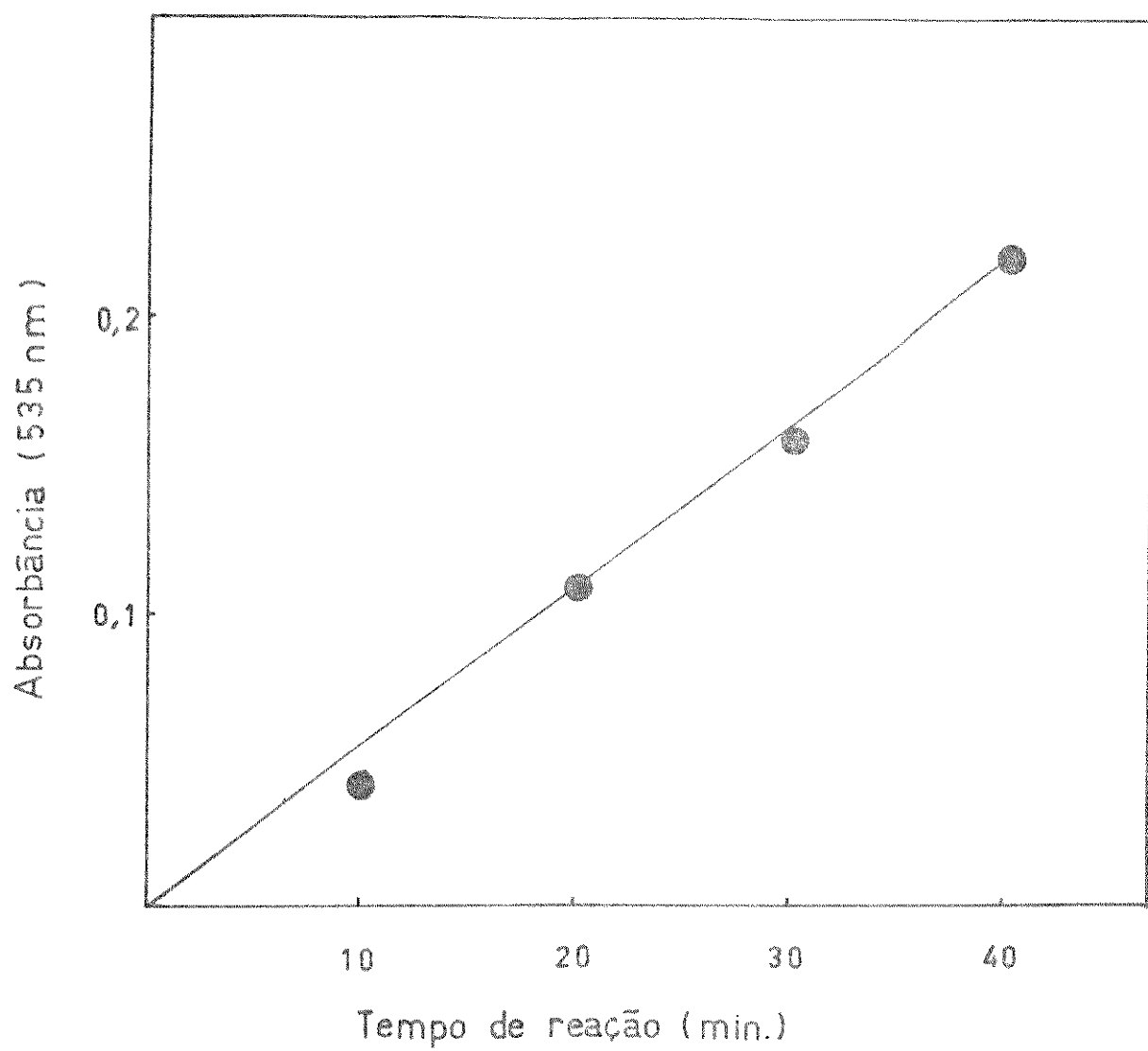
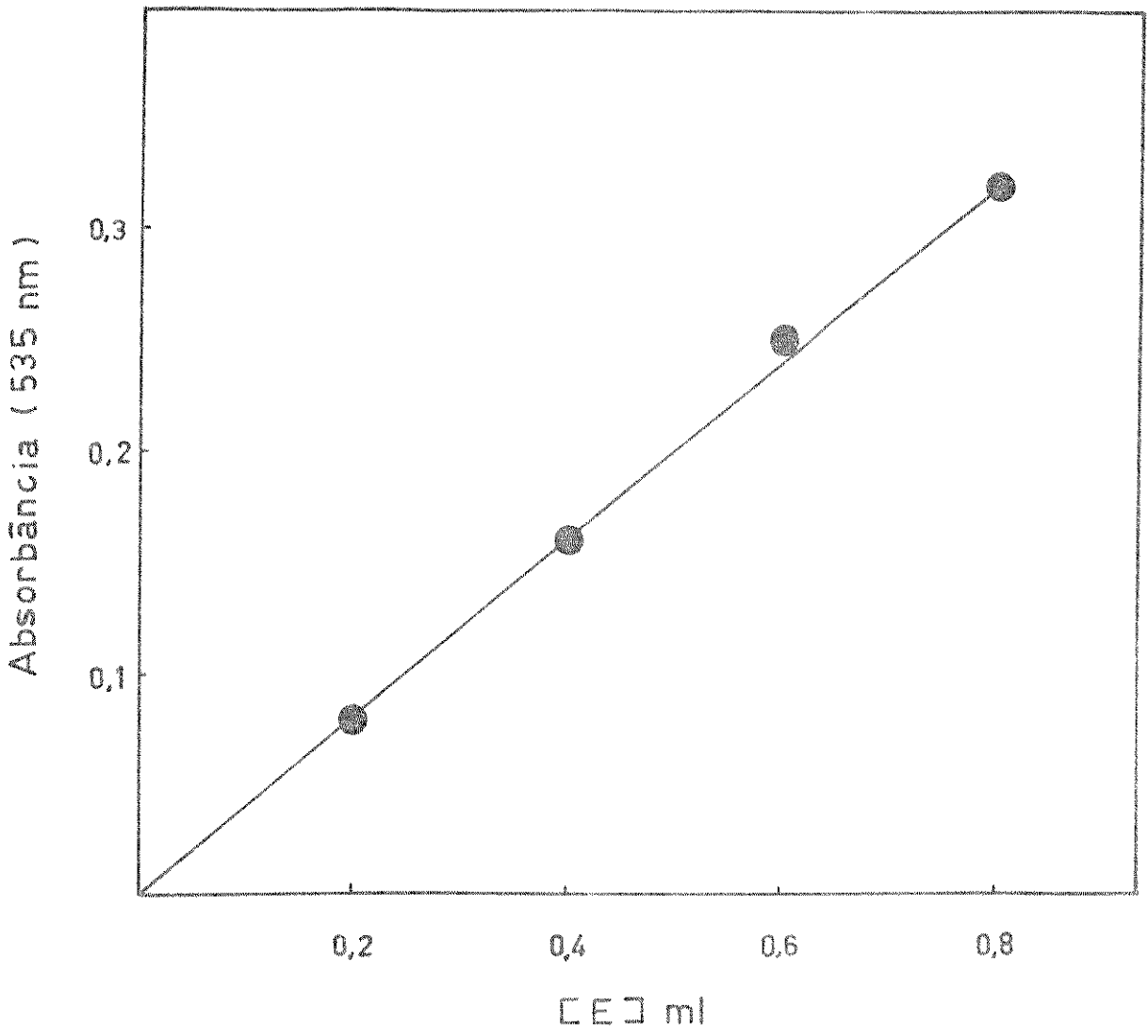


FIGURA 13 - ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE EM DIFEREN-
TES QUANTIDADES DE ENZIMA.



com a finalidade de estabelecer possíveis correlações.

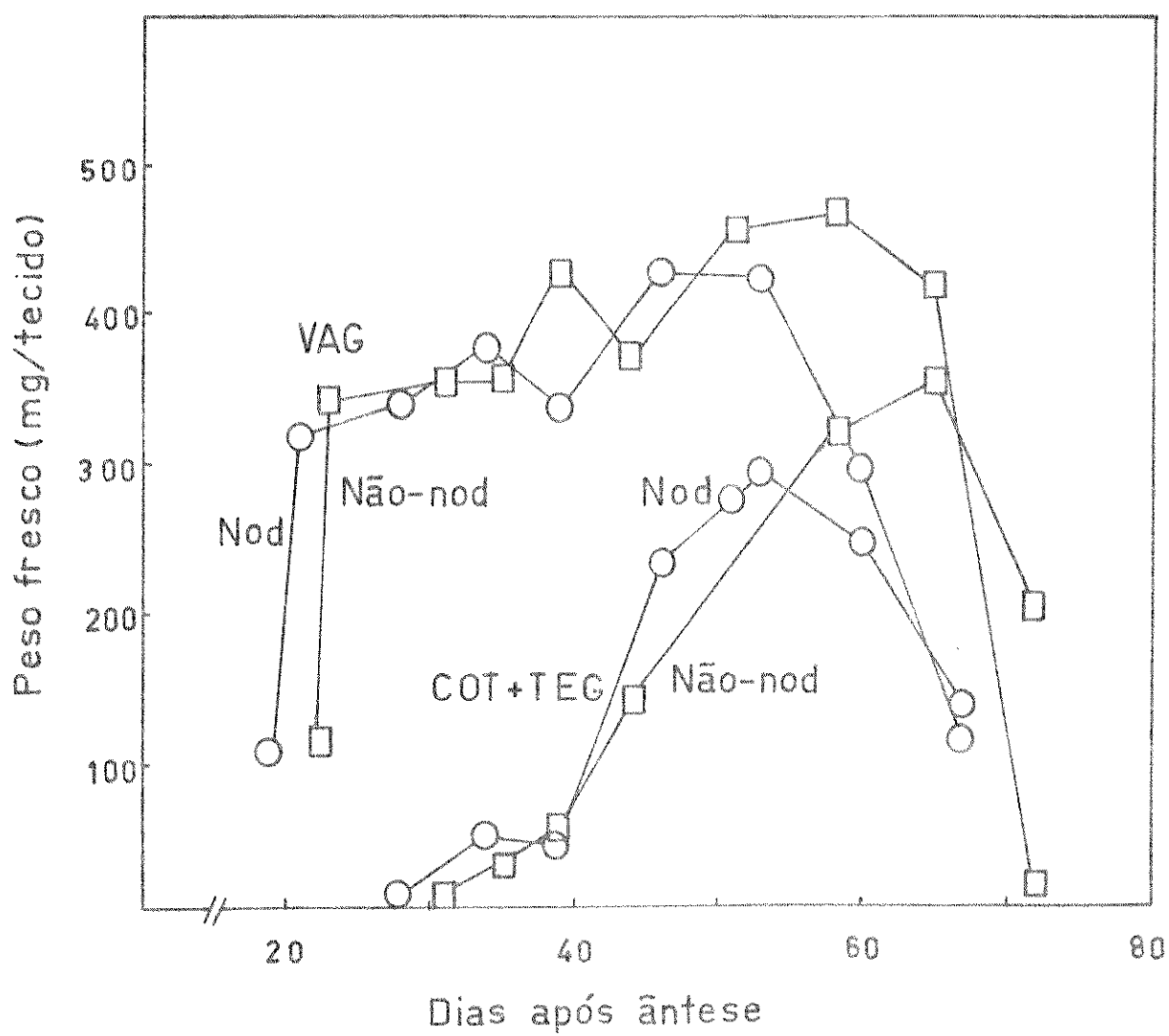
Os valores de peso fresco de cada tecido estão representados na figura 14.

As vagens iniciaram o processo de crescimento a partir do 19º dia, no caso de plantas noduladas e no 21º dia para plantas não-noduladas, atingindo aproximadamente 350 mg antes do 30º dia. A partir desse ponto o aumento foi lento nos dois casos. Após atingir o peso máximo, que foi de 425 mg no 53º dias para plantas noduladas, as vagens iniciaram a perda de peso, o que ocorreu até a última pesagem. Nas plantas não-noduladas o peso máximo foi de 470 mg, no 58º dias, e a queda acentuada ocorreu mais tarde entre, o 60º e 65º dias.

Quanto às sementes, as plantas noduladas iniciaram o seu desenvolvimento no 28º dia após a ântese, atingindo o seu peso máximo, de 298 mg, no 53º dia. A partir desse ponto as sementes começaram a perder peso até o 67º dia, quando se fez a última pesagem. Sementes de plantas não-noduladas iniciaram seu desenvolvimento no 31º dia, atingindo o peso máximo de 360 mg no 65º dia após a ântese. A partir desse ponto o peso caiu até o mínimo encontrado no 72º dia, quando foi feita a última pesagem.

A diferença entre plantas noduladas e

FIGURA 14 - ALTERAÇÕES DO PESO FRESCO DURANTE A ONTOGENIA
DO FRUTO DE SOJA NODULADA (○ — ○) E NÃO-
-NODULADA (□ — □).



não-noduladas, mostra um período de maturação mais curto nos frutos de plantas noduladas, pelo menos quando cultivadas nas condições usadas neste trabalho.

5. Atividade das Enzimas Durante a Fase de Desenvolvimento do Fruto

5.1 - Alantoinase

A atividade da alantoinase foi determinada nos tecidos da vagem, dos cotilédones e do tegumento dos frutos de plantas noduladas e não-noduladas durante sua ontogenia. Foram feitas dosagens utilizando-se extrato cru e dessalinizado, cujos resultados estão na Tabela IX (apêndice, página 136). Destes resultados, foram apresentados em forma de gráfico (Fig. 15 e 16) apenas os dados do extrato dessalinizado, uma vez que os mesmos não apresentaram diferenças marcantes em relação ao extrato cru.

Na vagem, a atividade começou a aumentar a partir do 20º dia, chegando ao máximo de 17 $\mu\text{mol/h.vagem}$ no 35º dia, nas plantas não-noduladas, e cerca de 22 $\mu\text{mol/h.vagem}$ no 47º dia nas noduladas. A partir desses pontos a atividade nos dois casos, decresceu e

FIGURA 15 - ATIVIDADE DA ENZIMA ALANTOINASE NA VAGEM
(O ——— O), COTILÉDONES (□ ——— □) E TEGU-
MENTO (△ ——— △) DURANTE A ONTOGENIA DO
FRUTO DE SOJA NÃO-NODULADA.

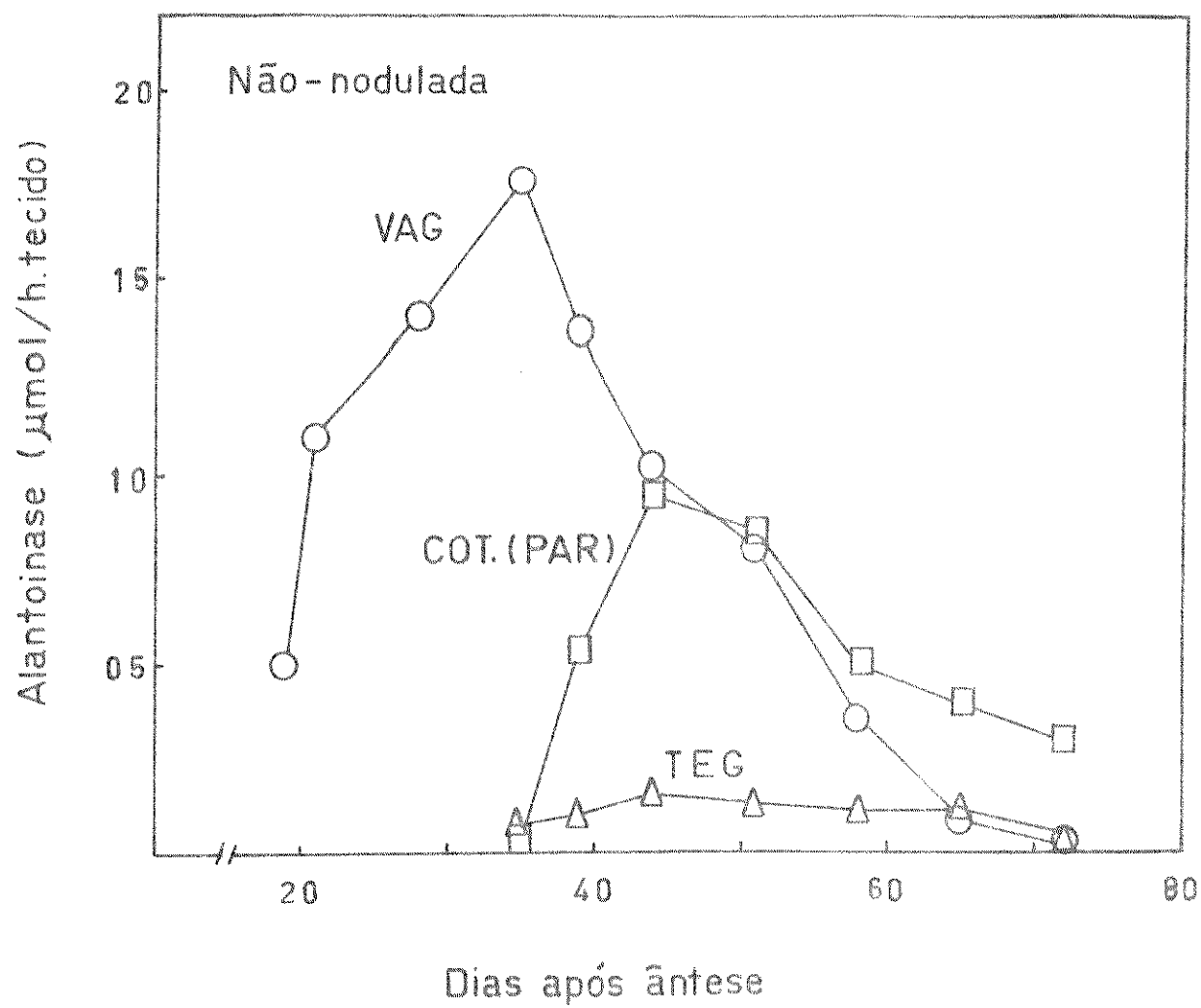
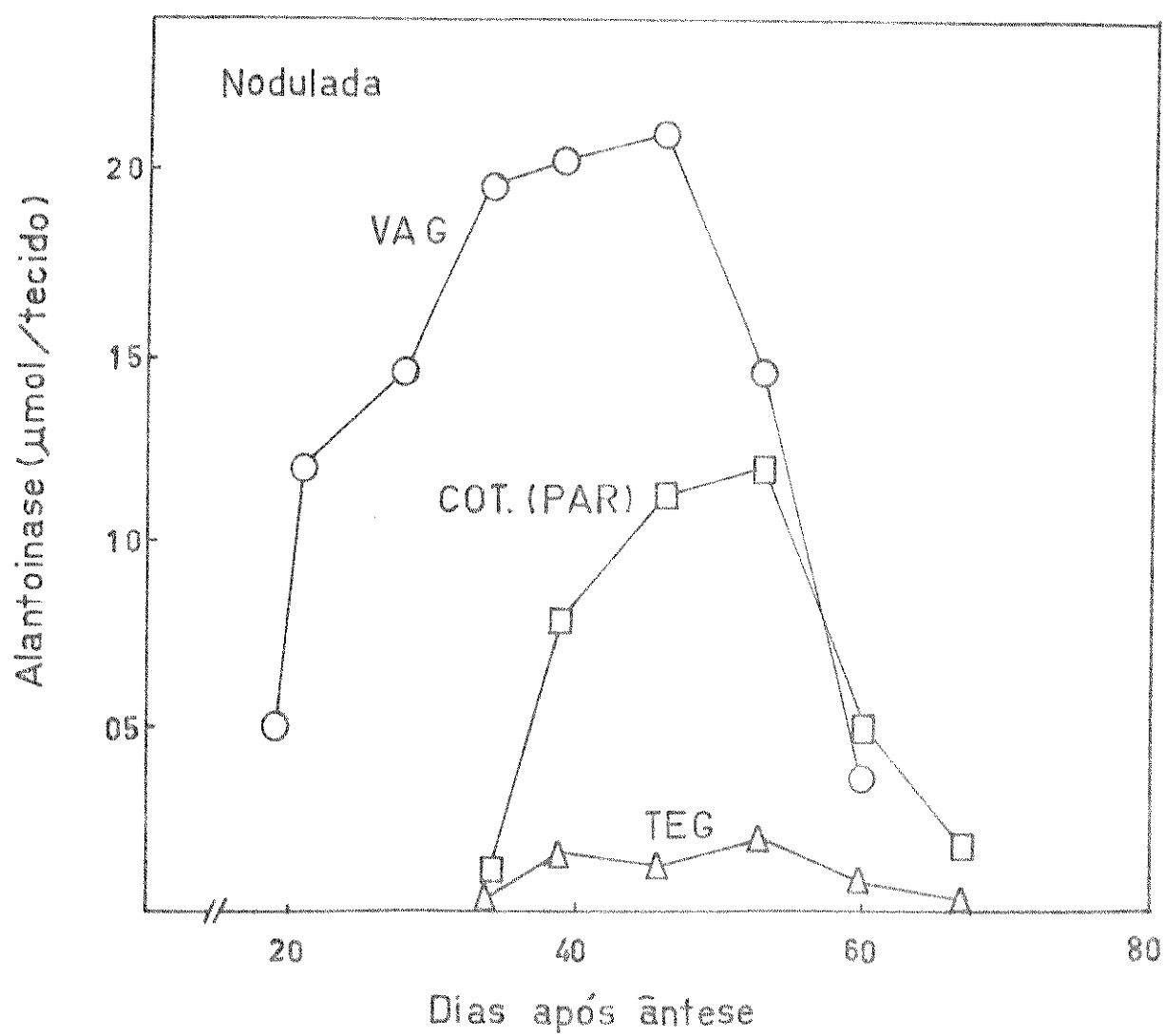


FIGURA 16 - ATIVIDADE DA ENZIMA ALANTOINASE NA VAGEM
(O — O), COTILÉDONES (□ — □) E TEGU-
MENTO (△ — △) DURANTE A ONTOGENIA DO
FRUTO DE SOJA NODULADA.



atingiu valores muito baixo no 65º dia.

Nos cotilédones da semente, cujo desenvolvimento iniciou-se no 35º dia, a atividade começou a aumentar a partir do 40º dia, atingindo a atividade máxima no 44º dia, nas plantas não-noduladas, e em torno do 54º dia para as noduladas. Nos dois casos, a partir desses pontos, a atividade começou a cair até a fase final de desenvolvimento.

O tegumento da semente, tanto de plantas não-noduladas como de noduladas, apresentaram baixa atividade durante todo o desenvolvimento. Entretanto, quando expressa em termos de peso fresco (veja Tabela IX apêndice página 136) a atividade de modo geral foi semelhante à dos cotilédones.

5.2 - Glutamina Sintetase

A atividade da glutamina sintetase foi determinada em extratos dessalinizados nos tecidos do fruto de plantas noduladas e não-noduladas. Os resultados são apresentados na tabela X (apêndice página 137). Observa-se pela tabela que:

a) Os dados de 15 e 30 minutos mostraram que a reação nem sempre é linear. Para a representa-

ção dos dados em forma de gráfico foram escolhidos os resultados do extrato dessalinizado de 15 minutos.

b) O extrato dessalinizado quase sempre mostrou atividades mais altas comparadas com o extrato cru, principalmente nos tecidos mais maduros. Nas figuras 17 e 18 estão apresentados os resultados de atividade para esta enzima encontrados no extrato dessalinizado.

Nas vagens de plantas noduladas e não-noduladas, tecidos onde a atividade para esta enzima foi maior do que os demais, os valores apresentaram um aumento a partir do 19º dia do seu desenvolvimento, seguido de um ligeiro decréscimo nos dois casos, nodulados e não-nodulados. Em seguida, nas plantas noduladas, ocorreu um novo aumento da atividade, atingindo no 34º dia, valores máximos, de 24 $\mu\text{mol/h.tecido}$ os quais mantiveram-se menos constantes até o 46º dia, decrescendo a seguir até um mínimo encontrado no 67º dia. Para vagens de plantas não-noduladas, o pico de atividade máxima ocorreu no 39º dia, com cerca de 37 $\mu\text{mol/h.tecido}$, decrescendo rapidamente a partir desse ponto até ao 72º dia, quando se fez a última dosagem.

Quanto aos cotilédones e tegumento, estes tecidos apresentaram menor variação na atividade da enzima, tanto para plantas noduladas como não-no-

FIGURA 17 - ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTAMINA SINTETASE NA
VAGEM (○ — ○) COTILÉDONES (△ — △) E
TEGUMENTO (□ — □) DURANTE A ONTOGENIA DO
FRUTO DE SOJA NÃO-NODULADA.

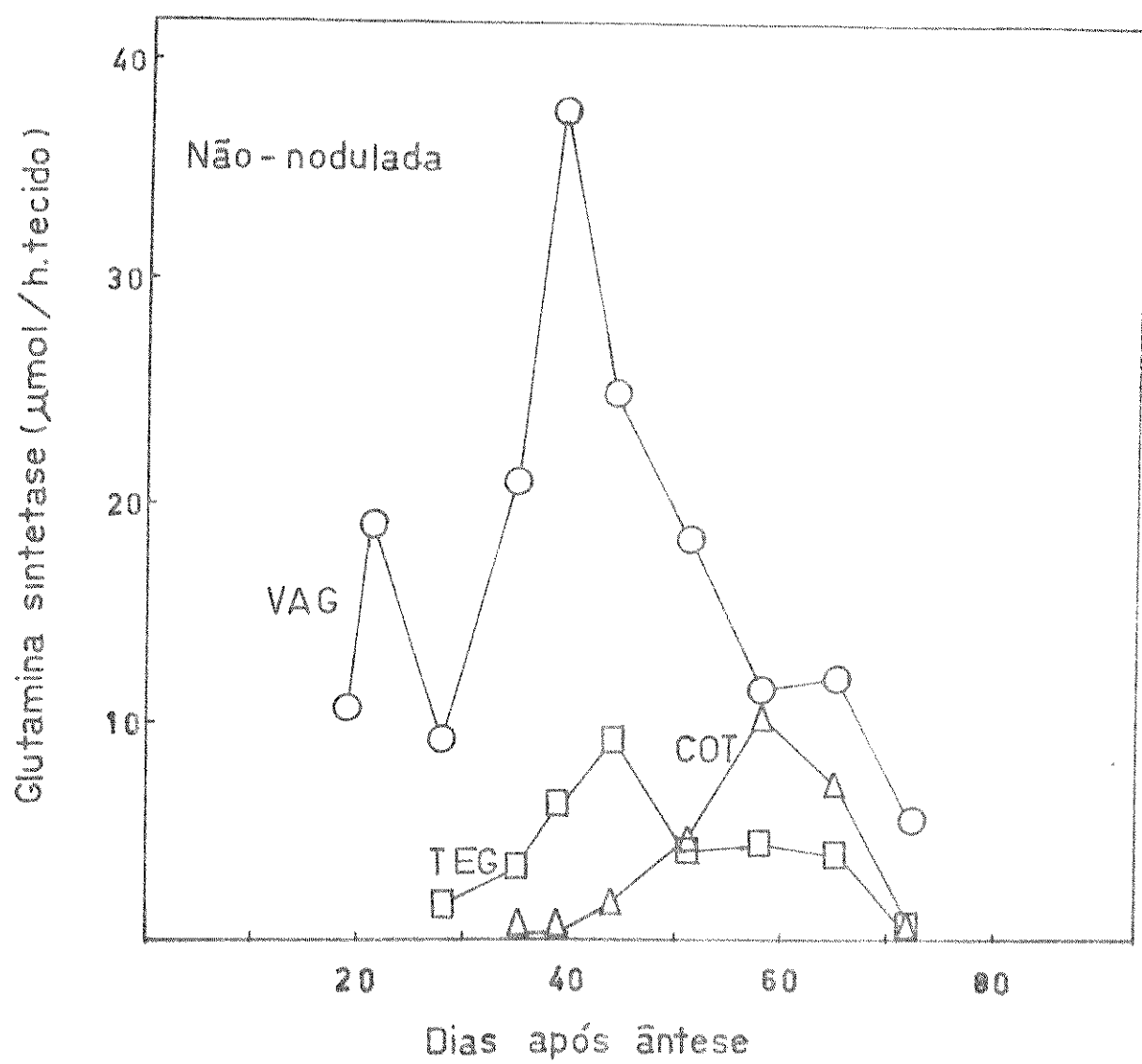
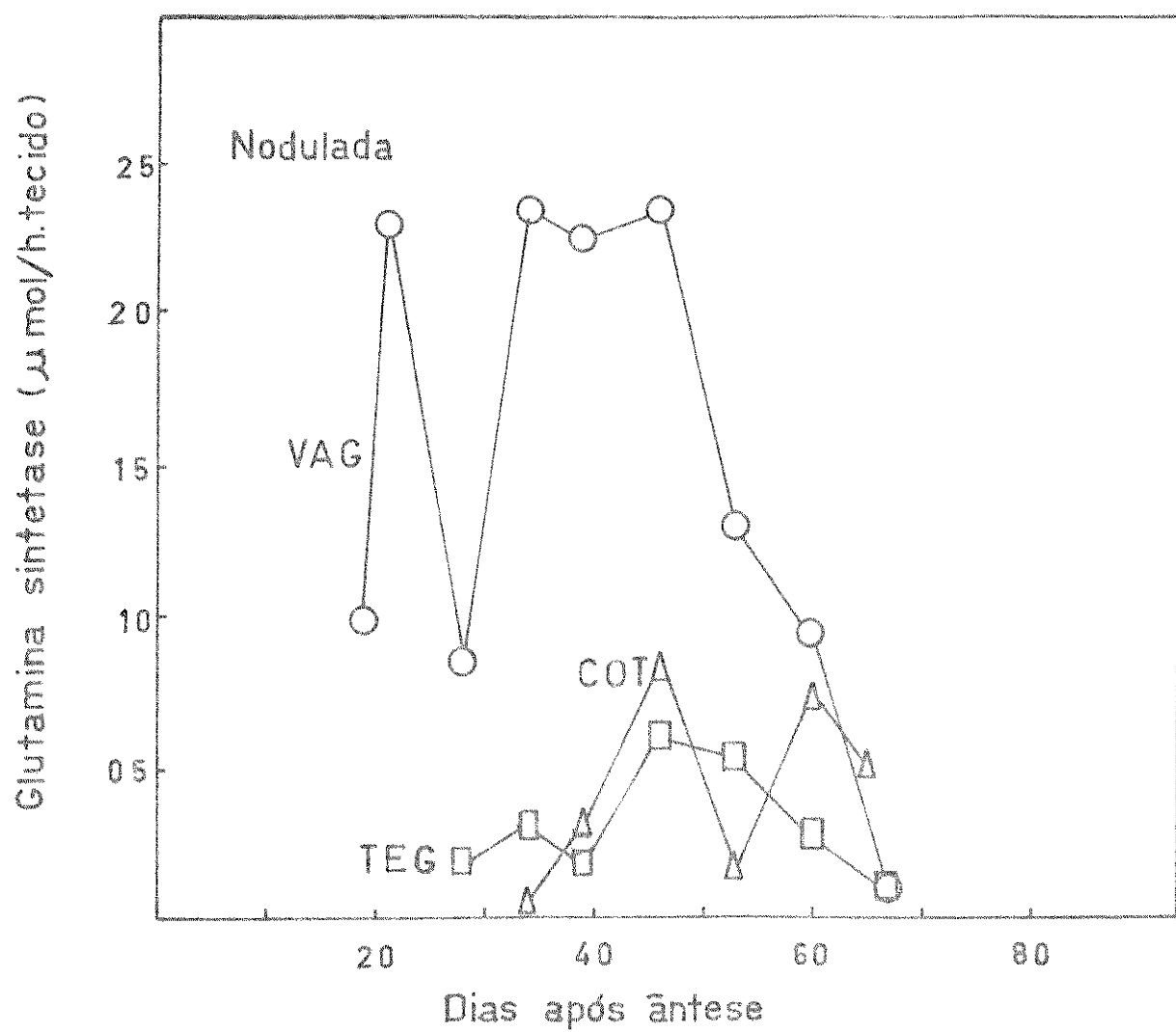


FIGURA 18 - ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTAMINA SINTETASE DURANTE
TE A ONTOGENIA DO FRUTO DE SOJA NODULADA.
Vagem (O — O), cotilédones ($\triangle$ — $\triangle$) te-
gumento ($\square$ — $\square$).



duladas. Os cotilédones de plantas noduladas atingiram atividade máxima de 9 $\mu\text{mol/h.tecido}$ no 46º dia após a antese e nas plantas não-noduladas o pico de atividade máxima ocorreu no 58º dia, e foi de 10 $\mu\text{mol/h.tecido}$. A partir desses pontos a atividade diminuiu para os dois casos até o último estágio dosado, 68º dia nas plantas noduladas, e 72º dia para plantas não-noduladas. No tegumento a atividade máxima no 46º dia foi de 6 $\mu\text{mol/h.tecido}$ nas plantas noduladas, e 4,5 $\mu\text{mol/h.tecido}$ no 58º dia para plantas não-noduladas.

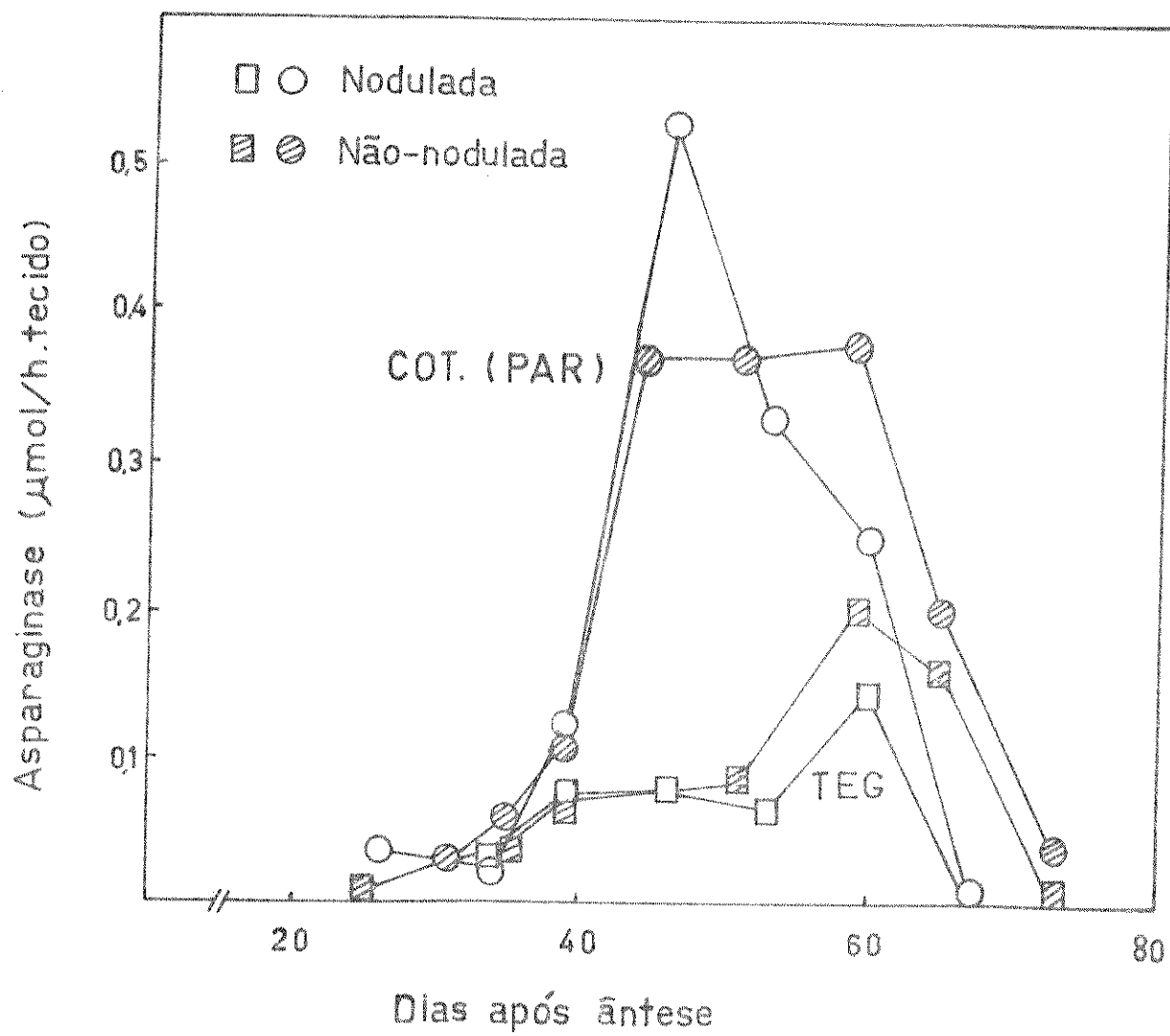
5.3 - Asparaginase

Foi determinada a atividade da enzima asparaginase, dependente do ion K^+ , nos tecidos de vagens, cotilédones e tegumento de plantas noduladas e não-noduladas, em extrato dessalinizado. Os resultados estão apresentados na tabela XI (apêndice página 138), expressos em grama e por unidade de tecido.

Na figura 19 estão representados os resultados de atividade enzimática por unidade de tecido. Como pode-se observar, não foi detectada atividade da enzima nas vagens, tanto de plantas noduladas como não-noduladas.

Nos cotilédones da semente de plan

FIGURA 19 - ATIVIDADE DA ENZIMA ASPARAGINASE NO COTILÉ-
DONES E TEGUMENTO DURANTE A ONTOGENIA DO FRU-
TO DE SOJA NODULADA () E NÃO-NODULA-
DA ().



tas não-noduladas a enzima atingiu sua atividade máxima, 0,37 $\mu\text{mol/h.tecido}$, no 43º dia, valor este que se manteve até o 58º dia, diminuindo a seguir e atingindo valores próximos de zero no 73º dia, quando foi feita a última do sagem nesse experimento.

Quanto aos cotilédones de plantas noduladas, a atividade máxima, 0,53 $\mu\text{mol/h.tecido}$ foi determinada no 46º dia, caindo a partir desse ponto até o 67º dia, quando ocorreu a atividade mínima. A forma geral das curvas é semelhante entre as plantas noduladas e não-noduladas, sendo a principal diferença a queda mais tardia da atividade nos cotilédones.

Quanto aos tegumentos de plantas não-noduladas, a atividade foi relativamente igual ao das plantas noduladas. A atividade máxima nestes tecidos ocorreu próximo do estágio final de maturação do fruto, no 60º dia, quando foi encontrado valor de 0,2 $\mu\text{mol/h.tecido}$, para plantas não-noduladas, e de 0,18 $\mu\text{mol/h.tecido}$ para as noduladas.

5.4 - Glutamina Oxo-glutarato Amida Transferase

A atividade desta enzima, foi determinada em extratos dessalinizados nos tecidos da vagem,

cotilédones e tegumento de plantas não-noduladas. A dosagem foi feita apenas em uma idade, 44º dia após ântese, uma vez que o objetivo foi de simplesmente demonstrar a sua presença nestes tecidos. Os resultados desta análise estão na tabela VIII, expressos em $\mu\text{mol/h.tecido}$.

Nos cotilédones e tegumento a atividade da enzima foi semelhante e um pouco mais alto do que nas vagens. A atividade máxima foi de $0,4 \mu\text{mol/h.tecido}$ para os cotilédones e tegumento enquanto que na vagem foi de $0,32 \mu\text{mol/h.tecido}$.

6. Conteúdo de Ureídeos, Aminoácidos e Proteínas

6.1 - Ureídeos

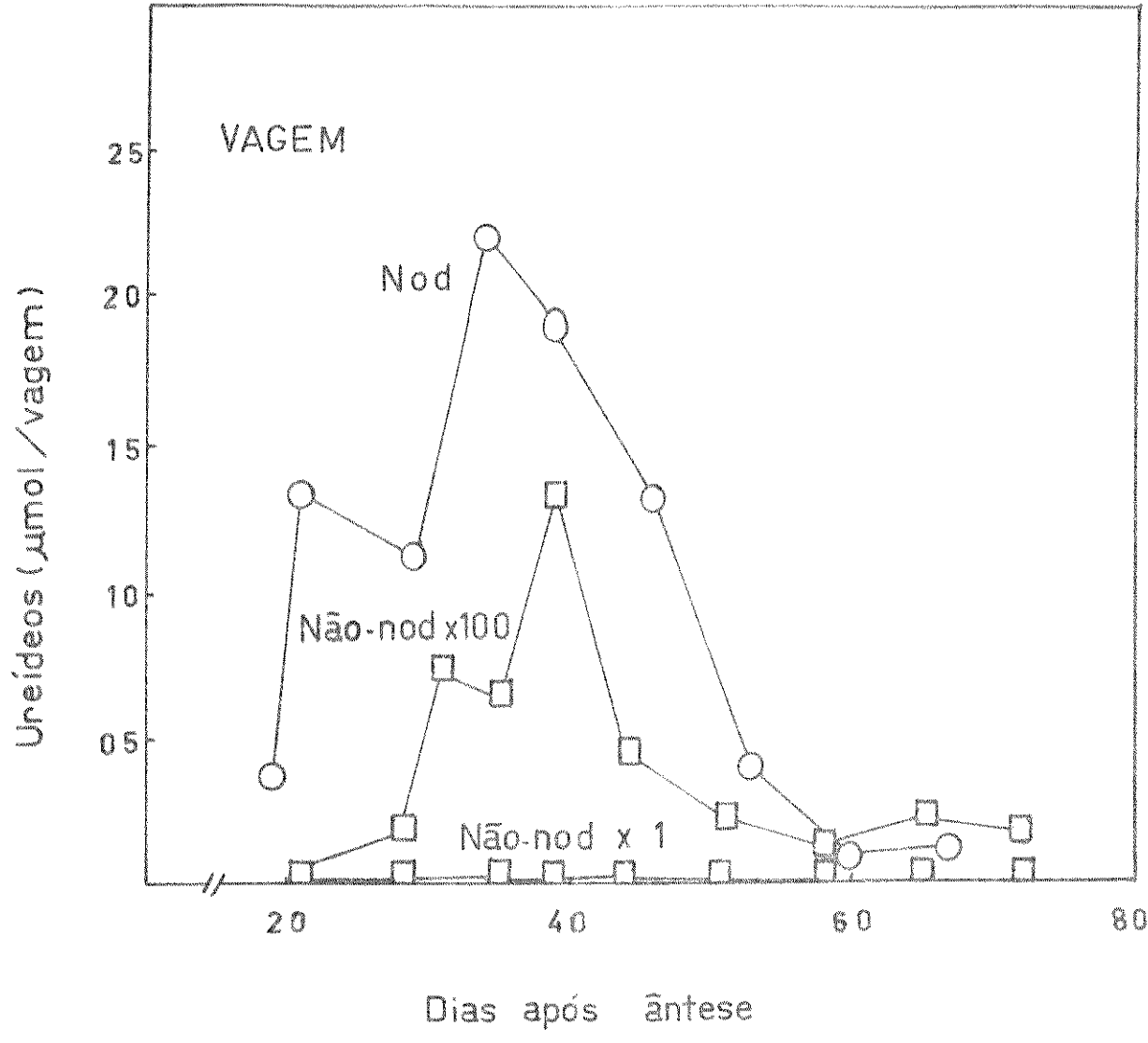
Os resultados mostrados nas figuras 20, 21 e 22 mostram variações da quantidade de ureídeos (alantoina e ácido alantóico) nas vagens, cotilédones e tegumento durante o período de desenvolvimento dos frutos. O material utilizado foi colhido simultaneamente com aquele usado na dosagem de enzimas. Pelos dados obtidos constatou-se que vagens de plantas não-noduladas têm ureídeos em quantidades muito pequenas em relação as vagens de plantas noduladas (Fig. 20).

TABELA VIII - ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTAMINA OXO-GLUTARATO
AMIDATRANSFERASE NOS TECIDOS DO FRUTO DE
SOJA.

Medida realizada com 44 dias após ântese.

TECIDOS	ATIVIDADE ($\mu\text{mol/h.tecido}$)
Vagem	0,32
Cotilédones	0,40
Tegumento	0,40

FIGURA 20 - TEOR DE UREÍDEOS ENCONTRADO NA VAGEM DURANTE
A ONTOGENIA DO FRUTO DE SOJA NODULADA
(○ — ○) E NÃO-NODULADA (□ — □).



Com o desenvolvimento da vagem o teor de ureídeos aumentou rapidamente, alcançando quantidade máxima, 22 $\mu\text{mol/vagem}$ no 34º dia após a ântese nas plantas noduladas e de 0,13 $\mu\text{mol/vagem}$ no 39º dia, nas plantas não-noduladas. Este valor representa uma diferença de quase 200 vezes menor do que a quantidade encontrada nas plantas noduladas.

Na figura 21, estão representadas quantidades de ureídeos encontradas nos cotilédones de plantas noduladas e não-noduladas. Nestes tecidos, a quantidade de ureídeos quase não variou, porém, ocorreu diferença quanto à forma das curvas para os dois casos. Nos cotilédones de plantas não-noduladas a quantidade de ureídeos continua aumentando durante o período de desenvolvimento do fruto, até o 72º dia, quando se fez a última dosagem. Este comportamento, não foi observado nos cotilédones de plantas noduladas, onde a maior quantidade de ureídeos foi determinada no 63º dia após a ântese, caindo em seguida a praticamente zero no 67º dia, quando se fez a dosagem final.

Na figura 22 está representada a quantidade de ureídeos encontrada nos tegumentos de plantas noduladas e não-noduladas. Verificaram-se níveis de ureídeos bem baixos no tegumento de plantas não-noduladas, quando comparado com as noduladas. A quantidade má-

FIGURA 21 - TEOR DE UREÍDEOS ENCONTRADO NOS COTILÉDONES
DURANTE A ONTOGENIA DO FRUTO DE SOJA NODULADA
DA (○ — ○) E NÃO-NODULADA (□ — □).

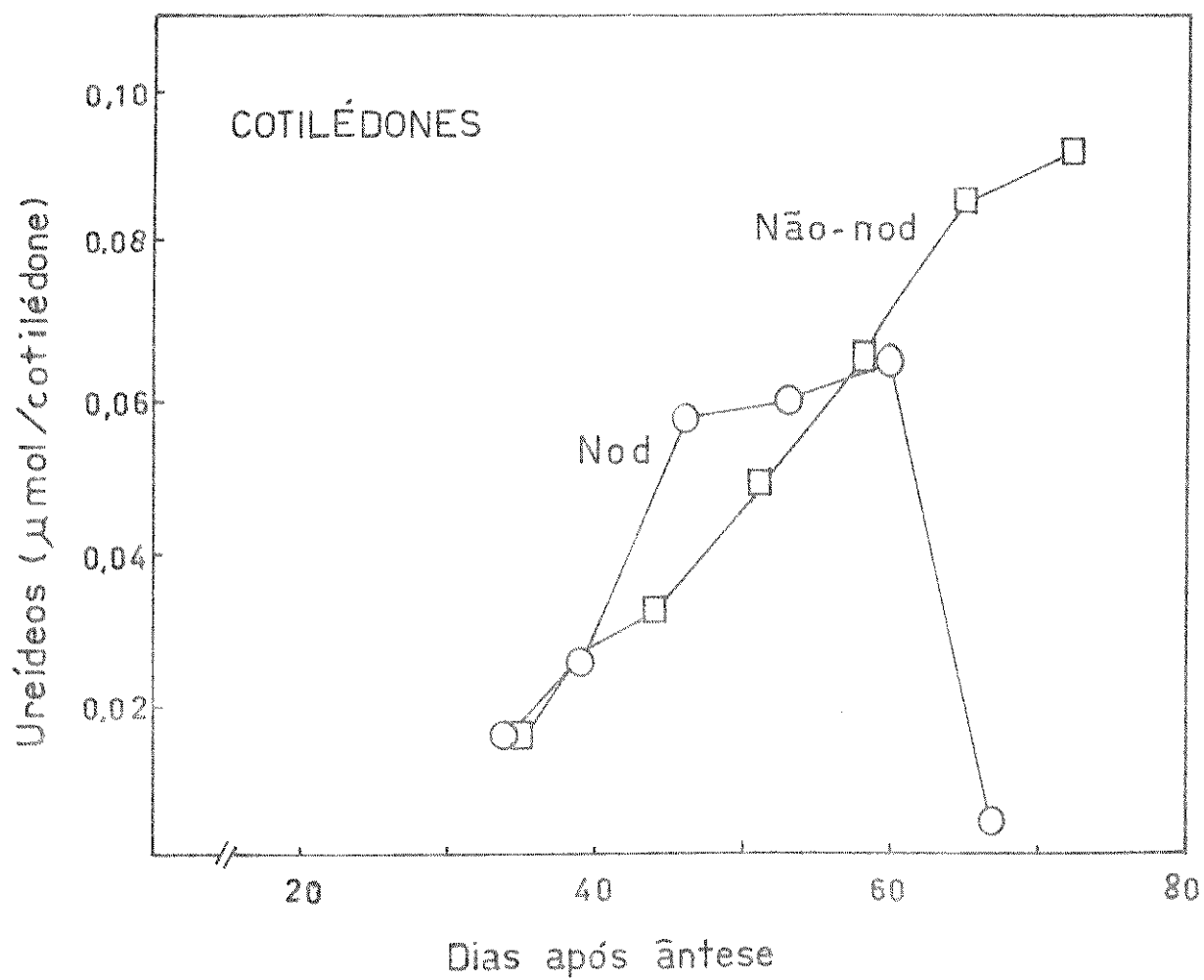
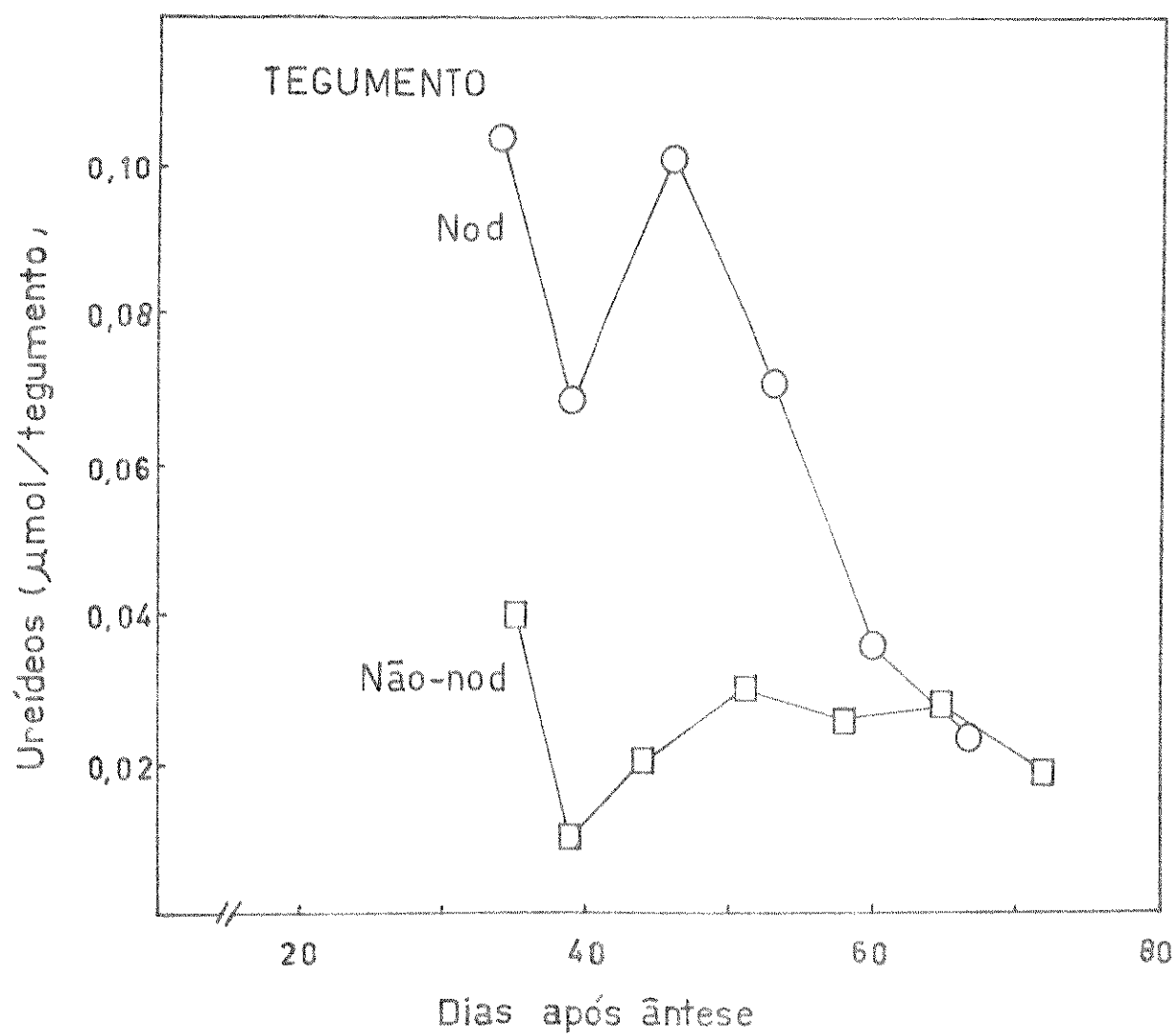


FIGURA 22 - TEOR DE UREÍDEOS ENCONTRADO NOS TEGUMENTOS DU
RANTE A ONTOGENIA DO FRUTO DE SOJA NODULADA
(O ——— O) E NÃO-NODULADA (□ ——— □).



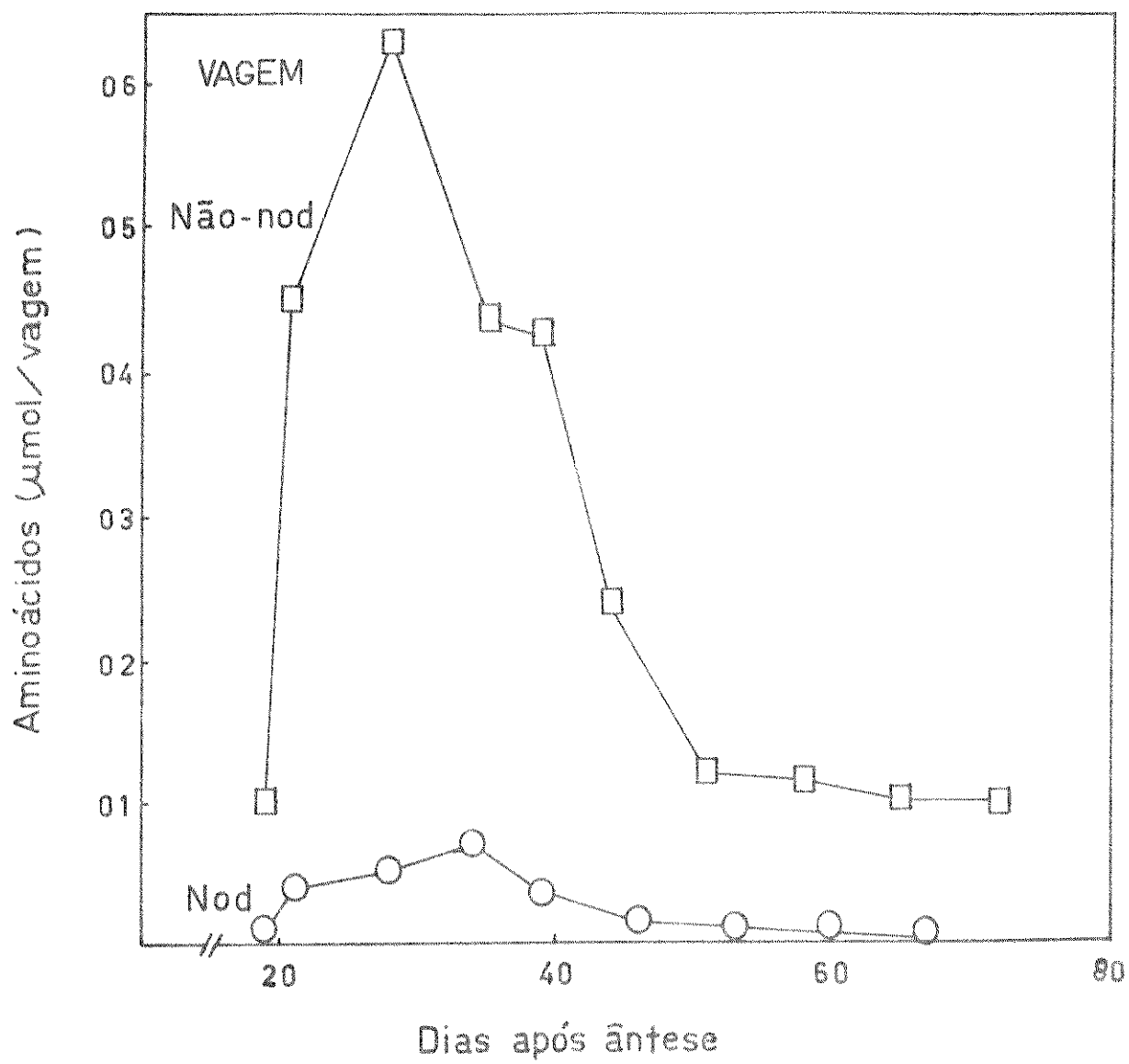
xima de ureídeos encontrada no tegumento de plantas não-noduladas foi de 0,04 μmol por tegumento no 35º dia, ocorrendo logo após uma queda seguida de um aumento até 0,03 μmol , estabilizando-se até o 65º dia, e finalmente uma queda no 73º dia, quando fêz-se a última dosagem. Nos tegumentos de plantas noduladas o teor máximo de ureídeos ocorreu no 34º dia, com cerca de 0,14 μmol , caindo após e logo aumentando para cerca de 0,1 μmol . A partir desse ponto caiu até o 67º dia, quando fêz-se a última dosagem.

Comparando os tecidos de plantas noduladas e não-noduladas a vagem de plantas noduladas foi aquele que apresentou o maior teor de ureídeos.

6.2 - Aminoácidos

A quantidade de aminoácidos existente nos tecidos de frutos imaturos de plantas noduladas e não-noduladas estão representados nas figuras 23, 24, 25, onde pode-se observar os seguintes resultados: na vagem de plantas não-noduladas o nível de aminoácidos foi bem mais alto do que na vagem de plantas noduladas, onde este nível foi cerca de 10 vezes menor (Fig. 23). O teor de aminoácidos em vagens de plantas não-noduladas atingiu um máximo de 6,7 $\mu\text{mol/vagem}$ no 31º dia após a ântese caindo

FIGURA 23 - NÍVEL DE ANIMOÁCIDOS ENCONTRADO NA VAGEM DU-
RANTE A ONTOGENIA DO FRUTO DE SOJA NODULADA
(○ — ○) E NÃO-NODULADA (□ — □).



a partir desse ponto até o nível mínimo, que ocorreu no 73º dia, quando foi realizada a última dosagem. Em contraste, o teor de aminoácidos determinado na vagem de plantas noduladas atingiram nível máximo de $0,7 \mu\text{mol} / \text{vagem}$, no 34º dia caindo a partir desse ponto. Como pode-se observar, nestas plantas o nível de aminoácidos foi bem inferior do que aquele encontrado na vagem de plantas não-noduladas. A figura 24 mostra o teor de aminoácidos existentes nos cotilédones de plantas noduladas e não-noduladas. Para os dois grupos de plantas o nível de aminoácidos não foi muito diferente até o 50º dia. Entretanto, a partir do 52º dia o nível de aminoácidos nos cotilédones de plantas não-noduladas foi sempre maior, chegando a atingir o nível máximo de $5,2 \mu\text{mol}$ em contraste com $4,3 \mu\text{mol}$ nas plantas noduladas.

Na figura 25 são mostrados os resultados das determinações do teor de aminoácidos encontrado nos tegumentos de plantas noduladas e não-noduladas. O nível de aminoácidos não foi muito diferente nos dois grupos de plantas, os quais atingiram seus níveis máximos na época de maturação do fruto, por volta do 52º dia, com um teor de $0,9 \mu\text{mol}/\text{tegumento}$, tanto de plantas noduladas como não-noduladas. Estes resultados foram coerentes com o teor de ureídeos, que também foi baixo nestes tecidos, embora com níveis menores nas plantas não-noduladas.

FIGURA 24 - NÍVEL DE AMINOÁCIDOS ENCONTRADO NOS COTILÊDO-
NES DURANTE A ONTOGENIA DO FRUTO DE SOJA
NODULADA (○ — ○) E NÃO -NODULADA (□ — □)

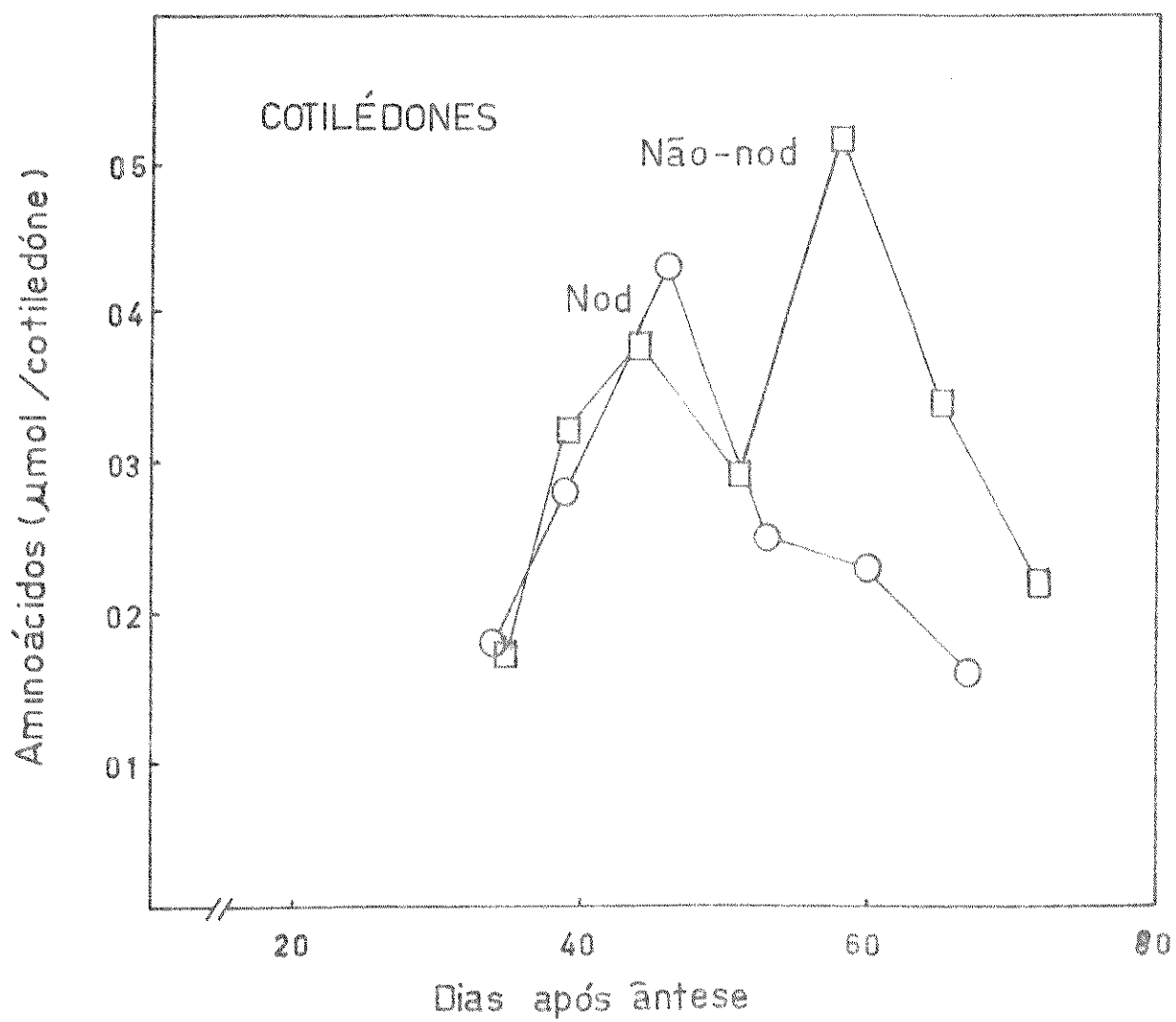
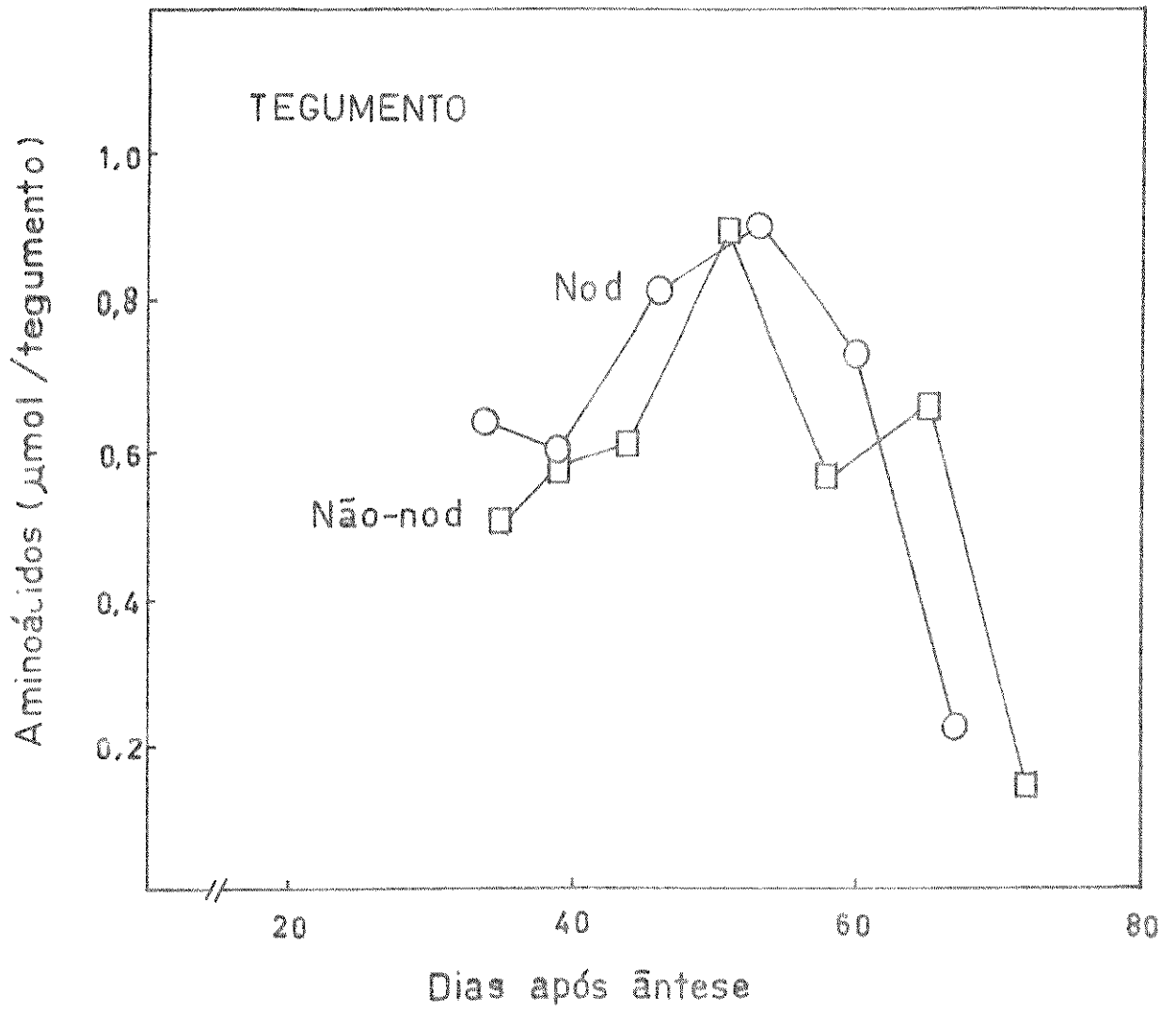


FIGURA 25 - NÍVEL DE AMINOÁCIDOS ENCONTRADO NOS TEGUMEN-
TOS DURANTE A ONTOGENIA DO FRUTO DE SOJA NO-
DULADA (○ — ○) E NÃO-NODULADA (□ — □)



6.3 - Proteínas

As variações no conteúdo de proteínas encontradas nos tecidos de plantas noduladas e não-noduladas estão graficamente representadas nas figuras 26, 27 e 28.

O teor de proteínas nas vagens não variou muito entre os dois grupos de plantas, com diferença de aproximadamente 100 μ g (Fig. 26). O aumento no teor de proteína ocorreu nas fases iniciais de desenvolvimento da vagem, entre o 19º dia para plantas noduladas e 21º dia para plantas não-noduladas, o que está de acordo com os dados de peso fresco (ver Fig. 14). Nos dois casos, o nível de proteína permaneceu alto durante o período entre o 25º ao 40º dias aproximadamente, caindo em seguida até o final do período estudado aos 68 dias para plantas noduladas e 73º dia para plantas não-noduladas.

A figura 27 representa as variações encontradas no teor de proteína dos cotilédones de plantas noduladas e não-noduladas. O nível de proteína atingido foi mais alto nos cotilédones de plantas não-noduladas do que nas noduladas, atingindo 15,5 mg no 65º dia nas plantas não-noduladas, e 12,5 mg no 60º dia nas plantas noduladas. O início de acúmulo de proteína ocorreu no 35º dia, correspondente a fase inicial de crescimento

FIGURA 26 - TEOR DE PROTEÍNA DETERMINADO NA VAGEM DURANTE
A ONTOGENIA DO FRUTO DE SOJA NODULADA
(○ ——— ○) E NÃO-NODULADA (□ ——— □).

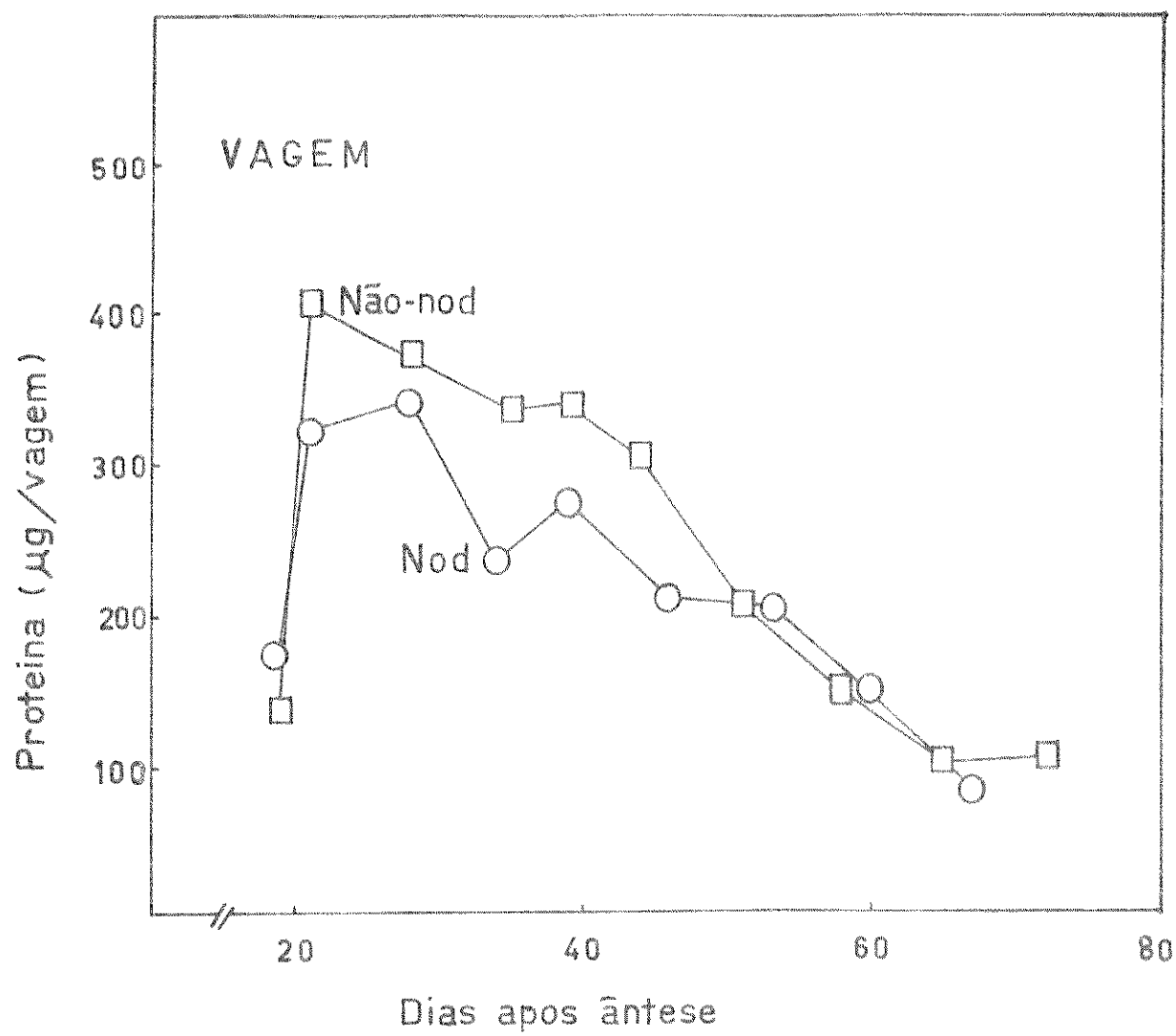
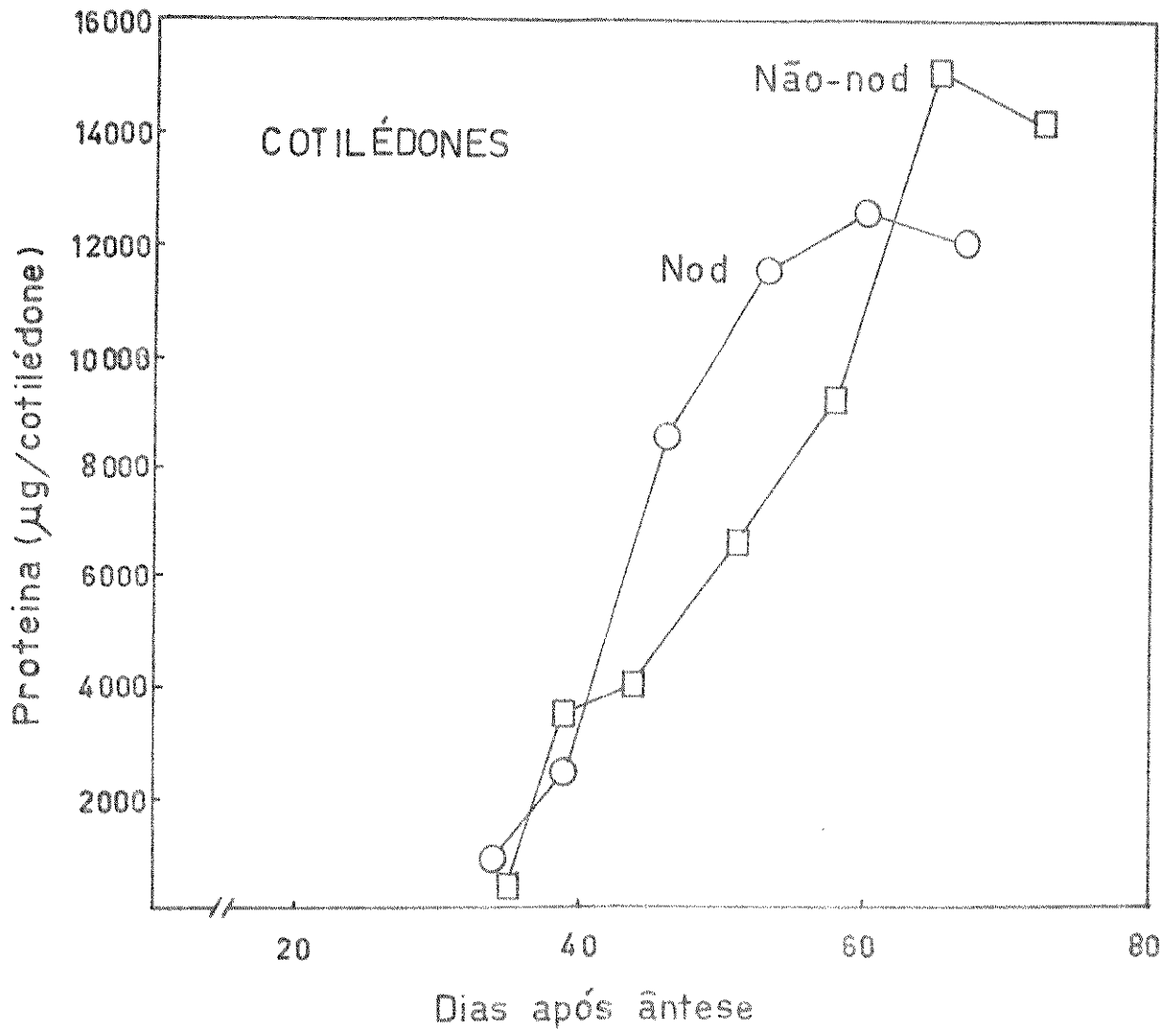
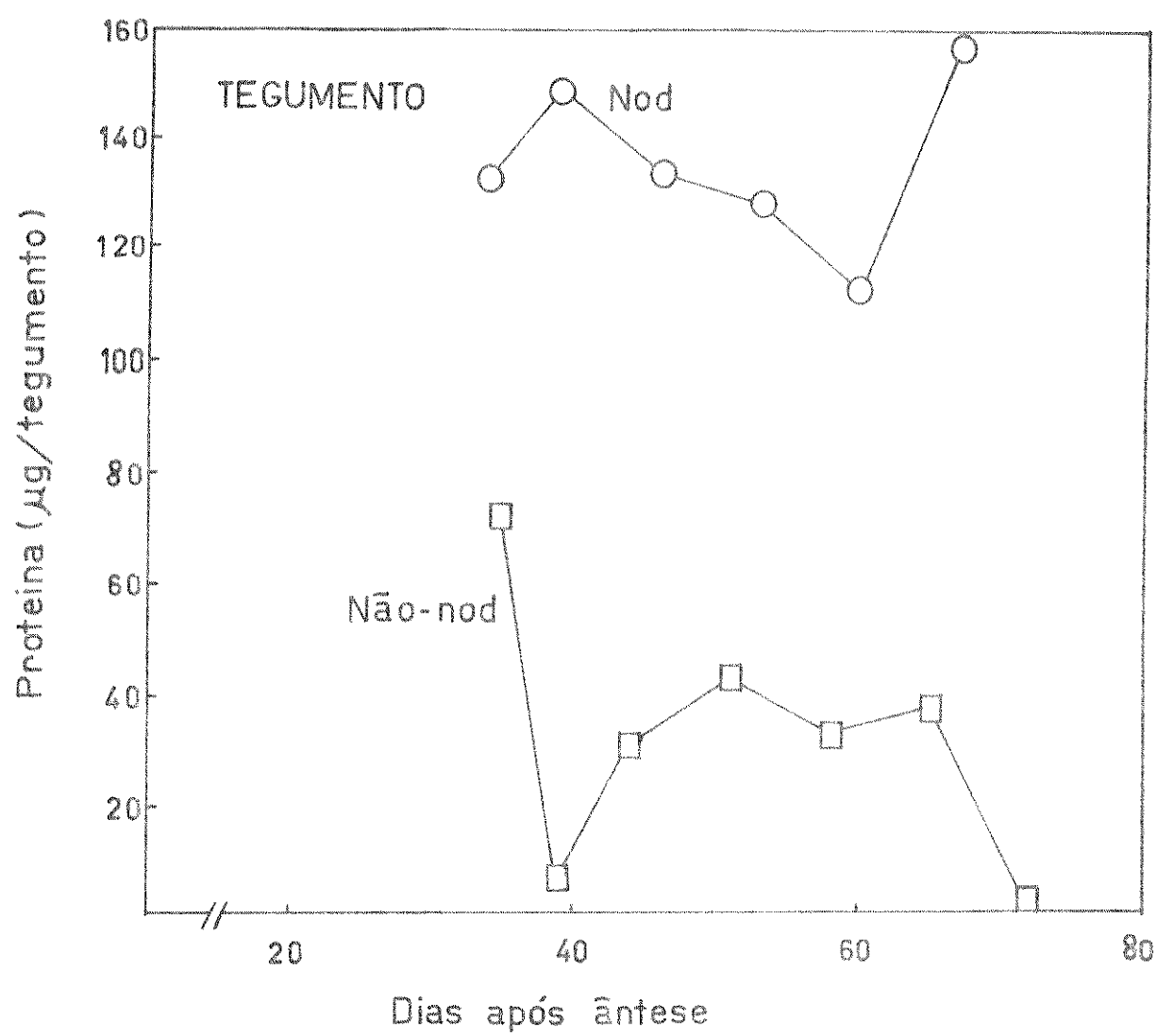


FIGURA 27 - TEOR DE PROTEÍNA DETERMINADO NOS COTILÉDONES
DURANTE A ONTOGENIA DO FRUTO DE SOJA NODULADA
(○ — ○) E NÃO-NODULADA (□ — □).



dos cotilédones (c. f. Fig. 14), e prosseguiu com uma taxa alta de acúmulo de proteína, chegando a 1 mg/dia na fase de acumulação máxima (Fig. 27). Ao final do período de maturação dos frutos (67º dia) ocorreu uma pequena queda no conteúdo de proteína, para ambos os casos. A figura 28 representa a concentração de proteína encontrada no tegumento de plantas noduladas e não-noduladas. Nesse caso as variações no teor de proteína mostraram um comportamento irregular, evidenciando, entretanto, que o tegumento de plantas noduladas apresentaram níveis de proteína mais altos do que os de plantas não-noduladas.

FIGURA 28 - TEOR DE PROTEÍNA DETERMINADO NOS TEGUMENTOS
DURANTE A ONTOGENIA DO FRUTO DE SOJA NODULA-
DA (O — O) E NÃO-NODULADA (□ — □).



IV. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou a presença das enzimas alantoinase e asparaginase nos tecidos do fruto de soja. Analisando-se os tecidos separadamente, da vagem, dos cotilédones e do tegumento, detectou-se a presença da alantoinase em todos eles contrastando com a asparaginase que não foi detectada na vagem, apenas nos cotilédones e tegumento.

A ausência de asparaginase na vagem está de acordo com os dados de IRELAND e JOY (1981). Estes autores demonstraram a presença de duas enzimas em ervilha capazes de metabolizar asparagina, asparaginase e a asparagina aminotransferase, e observaram altos níveis da segunda enzima em folhas e vagens, e da primeira em sementes imaturas. Os dados deste estudo com ervilha sugerem que tecidos que possuem altos níveis de uma dessas enzimas, apresentam apenas traços de outra.

Foi detectada, pela primeira vez neste trabalho, a presença da enzima asparaginase em cotilédone e tegumento de frutos de soja, embora seja conhecida sua presença em sementes imaturas de várias outras leguminosas (ATKINS *et al.*, 1975; LEA *et al.*, 1978; SODEK *et al.*, 1980; IRELAND e JOY, 1981). As altas atividades

encontradas na semente de ervilha sugere que esta enzima seria responsável pela metabolização de grande quantidade de asparagina translocada para os frutos, uma vez que a asparagina transaminase apresenta atividade muito baixa nesses tecidos (IRELAND e JOY, 1981).

Uma outra evidência de que esta enzima desempenha papel importante no metabolismo da asparagina translocada para o fruto prende-se ao fato de que a concentração de asparagina presente no floema, que supre os frutos, foi calculada em 30 mM para *Lupinus* (ATKINS *et al.*, 1975), valor este bem superior ao K_m da enzima que ocorre nas sementes. Portanto, os níveis de asparagina encontrados no floema permitirá a enzima funcionar com grande eficiência.

A presença da enzima alantoinase nos tecidos da vagem, dos cotilédones e do tegumento de soja também não havia sido constatada. Após a realização deste trabalho, THOMAS e SCHRADER (1981) relataram sua presença em tecidos do fruto de soja. A existência dessa enzima já era conhecida na folha e caule de soja (TAJIMA e YAMAMOTO, 1975 e TAJIMA *et al.*, 1977), e de outras espécies (VOGELS *et al.*, 1966; SINGH, 1968; ORY *et al.*, 1969), como também nos frutos de *Vigna unguiculata* (HERRIDGE *et al.*, 1978). Em alguns desses tecidos foi constatada a associação de alantoinase com microcorpusculos (ORY *et*

al., 1969; ST. ANGELO e ORY, 1970; THEIMER e BEEVERS, 1971). THOMAS e SCHRADER (1980, 1981) acreditam que a enzima pode estar associada com membranas ou organelas desses tecidos. Entretanto, neste estudo com soja não se observou maior atividade quando triton X-100 foi incluído no tampão de extração, o qual aumenta a solubilidade de estruturas membranosas.

A alantoinase extraída de sementes de soja tem um K_m para alantoina de 6,7 mM (FRANK *et al.*, 1965) e 14 mM (VOGELS *et al.*, 1966), enquanto que este valor foi de 46 mM para a enzima de *Phaseolus* (VOGELS *et al.*, 1966), 13,8 mM para *Ricinus* (ORY *et al.*, 1969) e 3,8 mM para ervilha (SINGH, 1968). O valor do K_m encontrado no presente trabalho, 15 mM está na mesma ordem de grandeza daqueles citados na literatura. Através dos resultados das determinações da atividade em função da concentração (Fig. 8) pode-se observar que a curva é bifásica, característica esta que se repetiu várias vezes. Uma possível explicação para tal comportamento pode ser a existência de duas isoenzimas, uma com alto e outra com baixo K_m , embora não se tenha nenhuma evidência na literatura que sustente esta hipótese. As grandes discrepâncias nos valores encontrados na literatura podem refletir diferentes quantidades das supostas isoenzimas nos diferentes tecidos. No caso deste trabalho, o traçado

usado para achar o K_m (Fig. 9) não levou em conta os pontos da segunda parte da figura 8 o que pode elevar em muito o valor do K_m . Um K_m alto para alantoinase, poderia significar uma baixa eficiência da enzima *in vivo*. THOMAS e SCHRADER (1981) calcularam a concentração da alantoina em folhas de soja em torno de 1 mM e sugeriram que a enzima pode não estar operando com eficiência máxima, a não ser que o substrato esteja compartimentalizado numa organela, por exemplo, juntamente com a enzima. A concentração de alantoina no floema é desconhecida, mas se for da mesma ordem da asparagina, 30 mM (ATKINS *et al.*, 1975), a enzima do fruto poderia funcionar com grande eficiência.

Quanto ao pH ótimo da enzima alantoinase não encontrou-se, pelo menos na literatura consultada, um estudo sobre este parâmetro. A maioria dos trabalhos sobre o assunto cita a metodologia do grupo de Vogels, que utiliza tampão com pH 7,8 para o ensaio dessa enzima. Recentemente, THOMAS *et al.* (1981) descreveram alguns detalhes para a purificação da alantoinase de folhas de soja, e verificaram um pH ótimo de 8,0. Valor igual foi encontrado no presente trabalho.

O padrão de atividade para alantoinase e asparaginase nos vários tecidos analisados durante a ontogenia do fruto de soja foi basicamente semelhante para

plantas noduladas e não-noduladas. Os substratos, alantoina e asparagina, para estas duas enzimas são os principais compostos nitrogenados translocados para o fruto desta espécie. No caso de plantas noduladas é bem conhecido que os compostos predominantes são os ureídeos (alantoina e ácido alantóico) representando 86% do nitrogênio translocado (MATSUMOTO *et al.*, 1975; MATSUMOTO *et al.*, 1977; FUJIHARA *et al.*, 1977; MATSUMOTO *et al.*, 1978). Por outro lado, pelo fato de haver muitas evidências mostrando que os ureídeos são produtos da fixação de nitrogênio (ISHIZUKA, 1977), em plantas não-noduladas, cultivadas com NO_3^- , seu nível no translocado é reduzido a traços, ficando a asparagina como o composto nitrogenado predominante.

Entretanto, esta mudança drástica na nutrição dos frutos, constituída de principalmente ureídeos, em plantas noduladas, para asparagina com traços de ureídeos, em plantas não-noduladas, não interferiu sobre o aparecimento das enzimas alantoinase e asparaginase nos tecidos de vagens, cotilédones e tegumento, durante a ontogênia do fruto.

Torna-se difícil retirar uma conclusão diante do resultado negativo pois pode significar que as duas enzimas são constitutivas, isto é, são produzidas independentemente da presença ou ausência do substrato, e portano

to a sua síntese não é induzida pelo mesmo. Por outro lado, as pequenas quantidades de ureídeos no translocado das plantas não-noduladas, e de asparagina em plantas noduladas, podem ser suficientes para efetuar a indução da enzima.

Embora o padrão de atividade para alantoinase e asparaginase, nos vários tecidos do fruto de soja, tenha sido semelhante para plantas noduladas e não-noduladas, houve diferenças em certos aspectos. O mais evidente ocorreu entre as curvas de atividade da alantoinase obtidas da vagem que, além de não alcançar o mesmo nível de atividade de plantas noduladas, o valor em plantas não-noduladas caiu no 35º dia, 11 dias antes da queda registrada para as noduladas.

Fenômeno semelhante ocorreu nos cotilédones, embora a diferença no momento em que se produziu a queda de atividade tenha sido menor. Isto pode significar que a diferença registrada para alantoinase, entre as plantas noduladas e não-noduladas, seja um reflexo real das quantidades de ureídeos translocados para o fruto. Entretanto, torna-se necessário uma certa cautela ao se tirar tal conclusão, uma vez que isto poderia também refletir uma taxa de desenvolvimento diferente entre os frutos dos dois regimes.

Embora o experimento com as plantas nodula-

das e não-noduladas tenha sido conduzido simultaneamente e, portanto, as condições de cultivo das plantas tenham sido os mesmos em termos de luz e temperatura, houve realmente diferenças na taxa de desenvolvimento dos frutos, que foi evidenciado pelas mudanças de peso fresco das várias partes do fruto durante sua ontogênia (Fig. 14). Ficou evidente que os aumentos de peso fresco no início do desenvolvimento do fruto ocorreram em épocas semelhantes, enquanto que o máximo (cotilédones), e a subsequente queda (vagens), ocorreram antes para os frutos de plantas noduladas. Este resultado é totalmente contrário a situação da enzima alantoinase, cuja atividade chegou ao valor máximo, e com subsequente queda, mais cedo para plantas não-noduladas. Portanto, é possível que, em termos de idade fisiológica, a diferença entre as curvas de atividade para alantoinase (cotilédones e vagens) seja maior do que uma simples comparação indicada pelas curvas.

No caso de cotilédones esta idéia é reforçada pelo fato de que as curvas de atividade para asparaginase são contrárias as de alantoinase, isto é, a atividade permanece alta durante mais tempo em plantas não-noduladas (Fig. 19). Este resultado sim, pode ser um reflexo da diferença na taxa de desenvolvimento do fruto. De qualquer forma, a inversão no padrão de atividade entre asparaginase e alantoinase é uma outra indicação que a

queda precoce da alantoinase em cotilédones de plantas não-noduladas não seja devido a um fenômeno não específico. Infelizmente os dados recentes de THOMAS e SCHRADER (1981) sobre a atividade da alantoinase em frutos de soja não ajudam neste caso, uma vez que estes autores não estudaram a soja não-nodulada.

O padrão de atividade da asparaginase em cotilédones e tegumentos do fruto de soja foi semelhante para as plantas noduladas e não-noduladas, porém houve algumas diferenças notáveis do padrão encontrado por SODEK *et al.* (1980) para ervilha. No caso de ervilha (SODEK *et al.*, 1980) foi constatada uma alta atividade de asparaginase no tegumento, no início do desenvolvimento dos cotilédones, justamente quando há presença do endosperma líquido. No tegumento de soja a atividade desta enzima foi extremamente baixa nesta fase, embora tenha ocorrido um aumento razoável no fim da ontogenia do fruto, quando o cotilédone se aproximava da fase de maturidade. É interessante notar que o desenvolvimento da semente de soja tem uma diferença marcante com aquele de ervilha, no sentido de não apresentar uma fase com volume grande de líquido (endosperma). Tal líquido, que é bastante evidente em ervilha e *Lupinus* por exemplo, é conhecido por possuir vários nutrientes como aminoácidos (FLINN e PATE, 1968; ATKINS *et al.*, 1975).

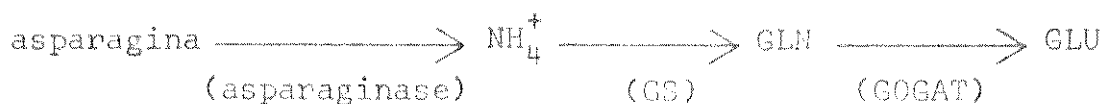
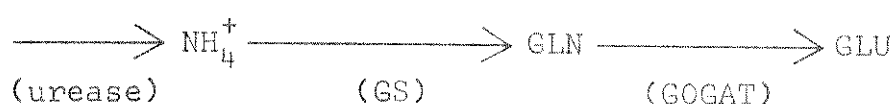
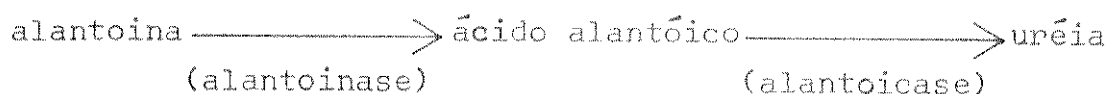
Uma característica de destaque desse líquido é o alto nível de amônia (LAWRENCE *et al.*, 1959; LEWIS e PATE, 1973; ATKINS *et al.*, 1975), podendo variar de 40 mM a 100 mM ou mais, e conseqüentemente, apresenta um pH ácido. MURRAY e KENNEDY (1981) sugeriram que a asparaginase do tegumento de ervilha funciona no metabolismo de asparagina translocada para a semente, sendo responsável pela formação de amônia encontrada no endosperma líquido.

De certa forma, os dados obtidos com soja neste trabalho, estão de acordo com esta hipótese. A baixa atividade da asparaginase no tegumento, ligado à ausência de uma fase com quantidades de líquido detectáveis, pode significar, de uma maneira indireta, que a asparaginase no tegumento de ervilha realmente desempenha a função proposta por MURRAY e KENNEDY (1981).

Em adição, SARASVATE (1982) encontrou um padrão de atividade para a asparaginase no tegumento da semente de *Phaseolus vulgaris* semelhante ao de soja, e essa espécie também não possui um endosperma líquido aparente.

Aceitando-se a evidência de que a alantoinase e a asparaginase sejam responsáveis pelo metabolismo de alantoina e asparagina no fruto de soja, é de se espe-

rar que essas enzimas levam a formação de amônia de acordo com os esquemas abaixo:



Observa-se que, em ambos os casos, a amônia é reassimilada via glutamina sintetase e GOGAT. Neste trabalho constatamos a presença dessas duas enzimas nos tecidos do fruto de soja, evidenciando que o metabolismo desses compostos pode funcionar da maneira representada no esquema acima. A reassimilação da amônia pelo sistema GS/GOGAT é importante para o aproveitamento desse nitrogênio na formação de aminoácidos para a síntese de proteína de reserva nos cotilédones. Embora a enzima glutamato desidrogenase possa também estar envolvida, ao invés de GS/GOGAT, uma revisão do assunto (MIPLIN e LEA, 1975), mostrou de que é o sistema GS/GOGAT, e não a glutamato desidrogenase, que normalmente desempenha esta função.

A taxa de acúmulo de proteína nos cotilédones calculada pelos dados expressos na figura 27 foi de 0,5 a 0,8 mg de proteína por dia. Isto representa um acúmulo de nitrogênio de ordem de 0,5 a 0,8 μmol por hora, por 2 cotilédones (expressa da mesma forma da atividade enzimática).

Todas as enzimas dosadas mostraram atividades acima ou próximas deste valor, levando em conta que as enzimas alantoinase, asparaginase e GOGAT catalizam reações envolvendo 4, 2 e 2 moles de nitrogênio por mole de substrato, respectivamente. Seguindo este raciocínio, a asparaginase e a GOGAT foram as enzimas que apresentaram atividades próximas à taxa de acúmulo de nitrogênio, mas não chegaram a ser limitantes.

As medidas do teor de ureídeos nos tecidos do fruto durante sua ontogenia não mostraram diferenças pronunciadas entre plantas noduladas e não-noduladas. No caso dos cotilédones (Fig. 21), os níveis registrados foram semelhantes para os dois grupos de plantas enquanto que no tegumento (Fig. 22) a quantidade de ureídeos foi cerca de três vezes maior para plantas noduladas. Apenas na vagem (Fig. 20) foi obtida a diferença marcante esperada.

Este fato de certa forma contraria um dos

objetivos do presente trabalho, que foi de verificar o comportamento da enzima alantoinase nos frutos de soja, justamente nas condições de altos e baixos níveis de substrato (ureídeos). A pequena diferença no padrão de alantoinase para os cotilédones, discutida anteriormente, não pode ser relacionada com a concentração do substrato, a não ser que exista compartimentação de alantoina ou, provavelmente, um efeito mais associado ao influxo do substrato para a semente do que a sua própria concentração interna.

A diferença marcante observada na concentração de ureídeos na vagem foi aquela esperada e, portanto, não invalida a discussão anterior em torno da comparação do padrão da enzima alantoinase para plantas noduladas e não-noduladas.

Embora a produção de ureídeos esteja associada com a fixação de nitrogênio (ISHIZUKA, 1977), no presente trabalho não foi possível a obtenção de plantas totalmente livres desses compostos. As precauções tomadas para evitar a nodulação e, portanto, que as plantas obtivessem nitrogênio unicamente a partir da fixação de nitrogênio, aparentemente tiveram êxito. Assim, a capacidade de reduzir acetileno foi abaixo dos limites de detecção (Fig. 6) além do fato de que não se verificou a presença de nódulos. O próprio cultivo das plantas não-

-inoculadas na presença de nitrato é um fator importante para evitar a nodulação.

Como o presente trabalho demonstrou (Fig. 2) o cultivo de soja inoculada, em presença de nitrato, provoca inibição da nodulação, sendo que a concentração mais alta usada, 15 mM impede, quase que totalmente, a formação de nódulos. Este efeito do nitrato sobre a nodulação já é bem conhecido (MATSUMOTO *et al.*, 1977 *b*; McCLURE e ISRAEL, 1979; PATE *et al.*, 1980), e a aplicação do nitrato a plantas noduladas também inibe fortemente o processo de fixação de nitrogênio (McCLURE e ISRAEL, 1979; MANHART e WONG, 1980). Existem duas teorias quanto à inibição da atividade do nódulo em presença de nitrato. A primeira atribue esta inibição a uma diminuição no suprimento de fotossintatos para o nódulo devido ao seu consumo no processo de redução de nitrato na raiz (OGHORHORIE e PATE, 1971). A segunda envolve um efeito mais direto, e atribue a inibição à formação do nitrito pela redutase de nitrato do bacterióide do nódulo (GIBSON, 1976). Uma vez que o nitrato inibe nódulos oriundos de estirpes de *Rhizobium* livres da redutase de nitrato (MANHART e WONG, 1980), e o nitrato não inibe a fixação de nitrogênio quando a sacarose é fornecida ao meio (WONG, 1980), torna a primeira alternativa provavelmente correta.

Em termos de plantas não-noduladas tratadas

com níveis crescentes de nitrogênio, os dados do presente trabalho (Fig. 4), mostram uma tendência para níveis mais altos de ureídeos justamente nas plantas recebendo a maior concentração de nitrato (embora com relação às plantas noduladas, estes níveis ainda são baixos). Dados semelhantes foram obtidos para plantas não-noduladas de *Vigna unguiculata* por PATE *et al.* (1980), e talvez seja relacionado ao maior vigor das plantas cultivadas nestas condições.

Portanto, o cultivo de plantas não-noduladas, com níveis baixos de nitrato, resultaria, possivelmente em plantas mais deficientes em ureídeos. Por outro lado, o desenvolvimento da planta seria afetado pela deficiência do nitrogênio, talvez trazendo mais problemas do que vantagens.

Pelos trabalhos consultados na literatura, a total ausência de ureídeos em plantas não-noduladas, seja da soja ou outras leguminosas produtoras de ureídeos, não foi demonstrada.

Estudos recentes utilizando exudato do xilema de soja (McCLURE e ISRAEL, 1979) e *Vigna unguiculata* (PATE *et al.*, 1980), revelaram que plantas não-noduladas transportam menos que 10% (soja), ou apenas traços (*Vigna*), do nitrogênio em forma de ureídeos. Apesar disso,

os níveis de ureídeos encontrados em extratos de caule, raiz e folha são pouco diferentes entre plantas não-noduladas e noduladas (PATE *et al.*, 1980). Isto sugere que as várias partes da planta tem capacidade para síntese de ureídeos a partir de outras fontes de nitrogênio (PATE, 1980), ou que sua produção pelas raízes, mesmo que baixa, é suficiente para atingir a capacidade destes tecidos de acumular ureídeos.

Os presentes dados para soja também mostram que o acúmulo de ureídeos nas várias partes da planta não refletem as quantidades translocadas, embora, em geral tenham sido encontradas quantidades maiores em tecidos de plantas noduladas. As diferenças menores foram encontradas para folhas e caules, embora em outras idades, estas possam ser maiores (MATSUMOTO *et al.*, 1977 a e b).

Uma diferença grande entre os níveis de ureídeos encontrados em plantas noduladas e não-noduladas como ocorre no exudato do xilema, pode ser utilizado como um parâmetro de avaliação da eficiência da fixação de nitrogênio de plantas cultivadas no campo.

Trabalhos com exudado do xilema de *Vigna unguiculata* (PATE *et al.*, 1980) mostraram uma correlação entre a porcentagem de nitrogênio em forma de ureídeo e a concentração de nitrato na solução nutritiva. Entretanto

to, a coleta do exudado de plantas cultivadas no campo é pouco praticável. Pelos dados do presente trabalho a análise do conteúdo de ureídeos nas vagens pode ser mais viável face as grandes diferenças registradas entre plantas noduladas e não-noduladas. Outros dados do presente trabalho (Fig. 4) também apresentam uma correlação inversa entre o nível de ureídeos e o grau de nodulação das plantas (em níveis diferentes de nitrato).

Os níveis de aminoácidos livres nas vagens foi o inverso da situação com os ureídeos (Fig. 20) sendo as plantas não-noduladas as mais ricas. Portanto, a sensibilidade do método pode ser aumentada se for considerada a relação ureídeos/aminoácidos, ao invés de simplesmente os ureídeos. A análise da vagem tem outra vantagem que é a não destruição da planta na hora da amostragem.

Entretanto, seria necessário um estudo mais detalhado, inclusive calibração com o método de redução de acetileno, para chegar à uma conclusão quanto à utilização do método.

V. RESUMO

A síntese e acúmulo de proteínas na semente necessita de um grande suprimento de nitrogênio reduzido. Normalmente o transporte deste nitrogênio de outras partes da planta envolve alguns compostos específicos, dependendo da espécie e condições de crescimento.

A fixação de N_2 pela associação simbiótica soja-*Rhizobium* cultivada em meio sem fonte de nitrogênio mineral leva à incorporação de N atmosférico em ureídeos (alantoína e ácido alantóico), que formam os principais compostos nitrogenados encontrados nas vias de transporte de plantas de soja noduladas. Por outro lado em soja cultivada na ausência de *Rhizobium* e com NO_3^- como fonte de nitrogênio, a asparagina é a forma de nitrogênio predominante nas vias de transporte destas plantas.

O acúmulo de proteína nos frutos destas plantas dependerá, portanto, do aproveitamento destas formas de nitrogênio para a síntese de aminoácidos.

Os objetivos deste trabalho foram: Primeiramente, verificar a presença das enzimas provavelmente envolvidas na utilização destes compostos (isto é, alantoinase e asparaginase). Segundo, investigar o efeito dessa mudança no transporte de nitrogênio principalmente de ureídeos (plantas noduladas) para asparagina (não-noduladas)

sobre a atividade destas enzimas durante a ontogenia do fruto, especificamente nos tecidos da vagem, dos cotilédones e do tegumento.

A asparaginase foi dosada pelo método radiométrico, após a separação do produto por cromatografia, enquanto que a alantoinase foi dosada medindo-se a formação do produto após a transformação em glioxilato.

Encontrou-se atividade de ambas as enzimas em todos os tecidos do fruto, a não ser da vagem onde não detectou-se atividade da asparaginase.

Tanto a enzima alantoinase como asparaginase mostraram baixa atividade no tegumento, ocorrendo apenas um pequeno pico mais no fim do desenvolvimento da semente, tanto para plantas noduladas como não-noduladas. Na vagem e cotilédones a atividade da alantoinase foi mais alta durante a fase de acúmulo de proteína. A atividade nos cotilédones, por exemplo, foi bem acima da taxa de acúmulo de nitrogênio. Para a asparaginase a atividade também foi mais alta nesta fase de desenvolvimento dos cotilédones embora o nível de atividade fosse menor, sendo semelhante a taxa de acúmulo de nitrogênio neste tecido.

Comparando as curvas de atividade obtidas para plantas noduladas e não-noduladas, houve pouca diferença, havendo apenas uma tendência da alantoinase permanecer

alta (vagem e cotilédone) durante mais tempo na planta nodulada (apesar da maturação ter ocorrido mais cedo). Por outro lado, a asparaginase (cotilédones) manteve a atividade alta durante mais tempo nas não-noduladas. Foi discutido o possível significado deste resultado em termos do fluxo de ureídeos e asparagina para os frutos.

Quanto aos níveis de ureídeos e aminoácidos nos tecidos do fruto, os dados mostraram que os ureídeos, apesar de estarem associados com a atividade do nódulos, foram presentes em níveis não tão baixos como esperados nas plantas não-noduladas. E, destes tecidos apenas os da vagem mostraram níveis de ureídeos bem mais altos (200 X) nas plantas noduladas comparado com as não-noduladas, porque tanto nos cotilédones como no tegumento o nível de ureídeos foi baixo e semelhante para os dois casos. Fato interessante ocorreu com o nível de aminoácidos que foi geralmente o inverso dos ureídeos, encontrando-se níveis mais altos destes nos tecidos de plantas não-noduladas.

VI. SUMMARY

The synthesis and accumulation of reserve proteins in seeds require a large supply of reduced nitrogen. Generally, the transport of nitrogen from other parts of the plant involves a few specific compounds, the nature of which depends on the species and growth conditions.

The fixation of N_2 by *Rhizobium* in symbiotic association with soybeans, cultivated in the absence of mineral nitrogen, leads to the incorporation of atmospheric nitrogen in ureides (allantoin and allantoic acid). These compounds form the main nitrogenous components found in the transport stream of nodulated soybeans. On the other hand, soybeans grown in the absence of *Rhizobium* and with NO_3^- as nitrogen source, contain asparagine as the predominant transport form of nitrogen.

The accumulation of protein in the fruits of such plants will depend, therefore, on their ability to utilize these compounds for the synthesis of amino acids.

The objectives of the present study were: first, demonstrate the presence of the enzymes presumed to be involved in the utilization of these compounds (i.e. allantoinase and asparaginase). Second, determine the effect of this drastic change in the transport of nitrogen from mainly ureides

(nodulated plants) to asparagine (non-nodulated plants) on the appearance of these enzymes during fruit ontogeny. specifically in the pods, cotyledons and teguments.

Asparaginase was assayed by a radiometric method, involving the separation of the product by chromatography. Allantoin was assayed by measuring the formation of the product by a differential glyoxilate method.

Activity of both enzymes was found in all tissues of the fruit, except in the pod where no asparaginase activity was detected. Both allantoinase and asparaginase presented low activities in the tegument, producing only a small peak near the end of seed development, both for nodulated and non-nodulated plants. In pods and cotyledons higher levels of allantoinase were found, especially during the phase of most active protein accumulation. It is noteworthy that the activity in the cotyledon was well above the rate of nitrogen accumulation. Asparaginase activity was also higher over this period of cotyledon development, although the level of activity was lower, being similar to the rate of nitrogen accumulation.

A comparison of the activity patterns for nodulated and non-nodulated plants reveals little difference except for a tendency for allantoinase to remain high (pod and cotyledons) over a longer period in nodulated plants. This occurred in spite of a shorter maturation period for

fruits of nodulated plants. On the other hand, asparaginase (cotyledon) maintained high activity over a longer period in the non-nodulated plants. The possible significance of this effect was discussed in terms of the supply of ureides and asparagine to the fruits.

As to the levels of ureides and amino acids in the various fruits tissues, the data show that the ureides, despite their association with nodule activity, were present in levels above that expected for non-nodulated plants. Of the fruit tissues only the pods presented a high level of ureides (200 x) in nodulated plants compared to non-nodulated, since low but similar levels were found in the cotyledons and teguments of both plant types. It is noteworthy that the level of free amino acids was generally the inverse of that for ureides, since higher levels were found in fruits of non-nodulated plants.

VII. ABREVIATURAS

ASNase	- Asparaginase
ATP	- Adenosina-5'-trifosfato
BSA	- Albumina de soro bovino
DTT	- Ditionitrositol
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetraacético
GOGAT	- Glutamina oxoglutarato amida transferase
GS	- Glutamina sintetase
MCW	- Metanol, clorofórmio e água
ME	- 2-mercaptoetanol
MES	- Ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfônico
NAD(H)	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
POPOP	- 1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)-benzeno
PPO	- 2,5-difeniloxazole
TRIS	- Tris (hidroximetil) aminometano

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELO, A.J. ST. e ORY, R. L. 1970. Localization of allantoinase in glyoxysomes of germinating Castor beans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40:290-296.
- ARRUDA, P. e SILVA, W.J. da. 1979. Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncle. *Phytochemistry*, 18:409-410.
- ATKINS, C. A.; PATE, J. S. e SHARKEY, P. J. 1975. Asparagine metabolism-key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. *Plant Physiol.*, 56:807-812.
- BASHA, S. M. M. e BEEVERS, L. 1976. Glicoprotein metabolism in the cotyledon of *Pisum sativum* L. during development and germination. *Plant Physiol.*, 57:93-98.
- BEEVERS, L. 1976. Nitrogen metabolism in plants. Edward Arnold, London pp. 118-121.
- BEEVERS, L. e POULSON, R. 1972. Protein synthesis in cotyledons of *Pisum sativum*. I - Changes in cell free amino acid incorporation capacity during seed development and maturation. *Plant Physiol.*, 49:476-481.
- BEEVERS, L. e STOREY, R. 1976. Glutamate synthetase in developing cotyledons of *Pisum sativum*. *Plant Physiol.*, 57:862-866.

- BEWLEY, J. D. e BLACK, M. 1978. Physiology and Biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. 1. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. New York.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-251.
- COCKING, E.C. e YEMM, E. W. 1954. Estimation of amino acids by ninhydrin. *Biochem. J.*, 58:Xii-Xiii.
- DAVIES, H. M. & MIFLIN, B.J. 1978. Advantage of o-phthalaldehyde for visualizing ^{14}C -labelled amino acids on thin-layer chromatograms and an improved method for their recovery. *J. Chromatogr.*, 153:284-286.
- DIE J. VAN e TAMMES, P. M. L. 1975. Phloem exudation from monocotyledons axes. In: Encyclopedia of Plant Physiology N.S., Vol. I - Transport in plants. Pt. I, pp. 196-222.
- DIE, J. VAN e WILLEMSE, P. C. M. 1975. Mineral and organic nutrients in sieve tube exudate and xylem vessel sap of *Quercus rubra* L. *Acta. Bot. Neerl.*, 24:237-239.
- DOUGAL, D. K. 1974. Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58:639-646.

- ECHEVIN, R. e BRUNEL, A. 1973. Ureides et urée libre
dégradation des purines chez le soja hispida Mnch. *C. R. Acad. Sci.*, 205:294-296.
- EGGUM, B. O. 1968. Determination of tryptophan. *Acta. Agric. Scand.*, 18:127-131.
- EVANS, A. M. e GRIDLEY, H. E. 1979. Prospects for the
improvement of protein and yield in Food legumes. *Curr. Adv. Plant Sci.*, 11(1):1-17.
- FELLER, U.K.; SOONG, T. e HAGEMAN, R. H. 1977. Leaf
proteolytic activities and senescence during grain
development of field-grow corn (*Zea mays* L.). *Plant Physiol.*, 59:290-294.
- FERGUSON, A. R. e BOLLARD, E. G. 1969. Nitrogen metabolism
of *Spirodela oligorrhiza*. I - Utilization of ammonium,
nitrate and nitrite. *Planta*, 88:344-352.
- FLINN, A. M. e PATE, J. S. 1968. Biochemical and physiological
changes during maturation of fruit of the field pea
(*Pisum arvense* L.). *Ann. Bot.*, 32:479-495.
- FOWDEN, L. 1954. The nitrogen metabolism of grown nut
plants: the role of γ -methyleneglutamine and methylene-
-glutamic acid. *Ann. Bot.*, 18:417-440.
- FOWLER, M.W.; JESSUP, W. e SARKISSIAN, G.S. 1974. Glutamate
synthase type activity in higher plants. *FEBS Lett.*, 46:340-342.

- FRANKE, W.; THIEMANN, A.; REMMLY, C.; MOCHILL, L. e HEYE, K. 1965. Zur kenntnis ureidspaltender enzyme I soja-allantoinase. *Enzymologia*, 29:251-271.
- GIBSON, A.H. 1976. Recovery and compensation by nodulated legumes to environmental stress. In: P.S. Nutman (ed.). Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. International Biological Programme 7, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 385-403.
- HALL, S. M. e BAKER, D. A. 1972. The chemical composition of *Ricinus* phloem exudate. *Planta*, 106:131-140.
- HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K. e BURNS, R.C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43:1185-1207.
- HERRIDGE, D.F.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. e RAINBIRD, R.M. 1978. Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of the cowpea. *Plant Physiol.*, 62:495-498.
- HILL, J.E. e BREINDENBACH, R.W. 1974. Protein of soybean seeds II - Accumulation of the major protein components during seed development and maturation. *Plant Physiol.*, 53:747-751.
- IRELAND, R.J. e JOY, K.W. 1981. Two routes for asparagine metabolism in *Pisum sativum* L. *Planta*, 151(3):289-292.

- ISHIZUKA, J. 1977. Function of symbiotically fixed nitrogen for grain production in soybean. *In: Proc. Int. Sem. Soil Environment Fertility Management in Intense Agriculture*, pp. 618-624.
- ISRAEL, D.W. e McCLURE, P.R. 1980. Nitrogen translocation in the xylem of soybeans. *In: F. T. Corbin (ed.). Proc. World Soybean Res. Conf. II. Westview Press, Boulder Co.*, pp. 111-127.
- IVANKO, S. e INGVERSEN, J. 1971. Investigation on the assimilation of nitrogen by maize roots and the transport of some major nitrogen compounds by xylem sap. *Physiol. Plant.*, 24:355-362.
- JALIL, M.E. e TAHIR, W.M. 1973. World supplies of plant proteins. *In: J.W.G. Porter and B.A. Rolls (Eds.). Proteins un Human Nutrition. Academic Press, London*, pp. 35-46.
- KAUL, A.K. 1973. Mutation breeding and Crop protein improvement. *In: Improve plant protein by nuclear techniques. IAEA symposium, Vienna*, pp. 1-16.
- KAUL, A.K.; DHAR, R.D. e SWAMINATHAN, M.S. 1970. *In: Improving plant protein by nuclear techniques (Proc. Symp. Vienna), IAEA, Vienna*, p.253.
- LAWRENCE, J.M.; DAY, R.M. e STEPHENSON, J.E. 1959. Nitrogen mobilization in pea seedlings. *Plant Physiol.*, 34:668-674.

- LEA, P.J. e FOWDEN, L. 1975a. Asparagine metabolism in higher plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 168:3-14.
- LEA, P.J. e FOWDEN, L. 1975b. The purification and properties of a glutamine dependent asparagine synthetase isolated from *Lupinus albus*. *Proc. R. Soc., Lond. B.*, 192:13-26.
- LEA, P.J. e MIFLIN, 1974. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, 246:614-616.
- LEA, P.J. e MIFLIN, B.J. 1980. Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. In: *The biochemistry of plants*. Vol. 5 cap. 16. Academic Press. Inc., N. Y. pp. 569-607.
- LEA, P.J.; FOWDEN, L. e MIFLIN, B.J. 1978. The purification and properties of asparaginase from *Lupinus species*. *Phytochemistry*, 17:212-222.
- LEA, P. J.; MILLS, R. e MIFLIN, B.J. 1979a. The isolation of a lysine-sensitive aspartate kinase from pea leaves and its involvement in homoserine biosynthesis in isolated chloroplasts. *FEBS Lett.*, 98(1):165-168.
- LEA, P.J.; HUGHES, J.S. e MIFLIN, B.J. 1979b. Glutamine and asparagine dependent protein synthesis in maturing legume cotyledons cultured "in vitro". *J. Exp. Bot.*, 30(116): 529-537.

- LEE, C. e SMITH, D. 1972. Changes in the concentration of nitrogenous fractions in Alfafa herbage with advance in maturity. *Agron. J.*, 64:326-327.
- LEES, E.M. e BLAKENEY, A.B. 1970. The distribution of asparaginase activity in plants. *Biochem. Biophys. Acta.*, 215:145-151.
- LEWIS, O.A.M. 1975. An ^{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(92):361-366.
- LEWIS, O.A. e PATE, J.S. 1973. The significance of transpirationally derived nitrogen in protein synthesis in fruiting plants of pea (*Pisum sativum* L.). *J. Exp. Bot.*, 24(80):596-606.
- LLOYD, N.D.H. e JOY, K.W. 1978. 2-hidroxysuccinamic acid: A product of asparagine metabolism in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commum.*, 81:186-192.
- MANHART, R.J. e WONG, P.P. 1980. Nitrate effect on Nitrogen Fixation (Acetylene Reduction). Activities of legume root nodules induced by rhizobia with varied nitrate reductase activies. *Plant Physiol.*, 65:502-505.
- MATSUMOTO, T.M.; YATAZAWA, Y. e YAMAMOTO. 1977a. Distribution and allantoinic acid in developing nodulating and non-nodulating soybean plants. *Plant Cell. Physiol.*, 18:353-359.
- MATSUMOTO, T.M.; e YATAZAWA, Y. e YAMAMOTO. 1977b. Incorporation of ^{15}N into allantoin in nodulated soybean plants supplied with ^{15}N . *Plant. Cell. Physiol.*, 18:459-462.

- MATSUMOTO, T.M.; YATAZAWA, Y. e YAMAMOTO. 1977c. Effects of exogenous nitrogen compounds on the concentrations of allantoin and various constituents in several organs of soybean plants. *Plant Cell. Physiol.*, 18:613-624.
- McCLURE, P.R. e ISRAEL, D.W. 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiol.*, 64:411-416.
- MEISTER, A.; SOBER, H.A.; TICE, S.V. e FRASER, P.E. 1952. Transamination and associated deamination of asparagine and glutamine. *J. Biol. Chem.*, 197:319-330.
- MIFLIN, B.J. e LEA, P.J. 1975. Glutamine and asparagine as nitrogen donors for reductant dependent glutamate synthesis in pea roots. *Biochem. J.*, 149:403-409.
- MIFLIN, B.J. e LEA, P.J. 1977. Amino acid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 28:299-329.
- MILLERD, D.A.; SIMON, M. e STERN, H. 1971. Legumin synthesis in developing cotyledons of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.*, 48:419-425.
- MILLERD, A.; SPENCER, D.; DONNAN, D. e STILLER, M. 1975. Growth of imature cotyledons in culture. *Aust. J. Plant Physiol.*, 2:51-59.
- MORI, T.E.S. 1981. Metabolismo do nitrogênio durante a fase do desenvolvimento reprodutivo da soja. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia - UNICAMP, Campinas, SP.

- MURPHY, J.J. e DALBY, A. 1971. Changes in the protein fractions of development normal and opaque-2-maize endosperm. *Cereal Chem.*, 48:336-349.
- MURRAY, D.R. e KENNEDY, I.R. 1980. Changes in activities of enzymes of nitrogen metabolism in seedcoats and cotyledons during embryo development in pea seeds. *Plant Physiol.*, 66:782-786.
- NELSON, O.E. 1971. Genetic modifications of protein quality in plants. *Adv. Agron.*, 21:171-194.
- NIRMALA, J. e SASTRY, K.S. 1975. The allantoinase of *Lathyrus sativus*. *Phytochemistry*, 14:1971-1973.
- OGHORHORIE, C.G.O. e PATE, J.S. 1971. The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (*Pisum arvense* L.). In: T.A. Lie, E.G. Mulder (eds.). Biological Nitrogen Fixation in natural and agricultural habitats. Plant and Soil special Volume. Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 185-202.
- OHYAMA, T.K. e KUMAZAWA, K. 1978. Incorporation of ^{15}N into various nitrogenous compounds in intact soybean nodules after exposure to $^{15}\text{N}_2$ gas. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24:525-533.
- OHYAMA, T.K. e KUMAZAWA, K. 1979. Assimilation and transport of nitrogenous compounds originated from

$^{15}\text{N}_2$ fixation and $^{15}\text{NO}_3$ absorption. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25(1):9-19.

ORY, R.L.; GORDON, C.V. e SINGH, R. 1969. Ureide metabolism in Castor beans. Evidence for a particle-bound allantoinase. *Phytochemistry*, 8:401-404.

PATE, J.S. 1971. Movement of nitrogenous solutes in plants. In: Nitrogen-15 in soil-plant studies. IAEA-P₁-341/13, Vienna pp. 165-187.

PATE, J.S. 1973. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.*, 5:109-119.

PATE, J.S. 1976. Nitrogen mobilization and cycling: case studies for carbon and nitrogen in organs of a legume. In: I.F. Wardlaw and J.B. Passioura (eds.). Transport and transfer processes in plants. Academic Press, New York, pp. 447-462.

PATE, J.S. 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31:313-340.

PATE, J.S. e DIXON, K.W. 1980. Plants with fleshy underground storage organs - a Western Australian Survey. In: J.S. Pate, A.J. Mc Comb (eds.). Biology of Native Australian Plants. Perth Univ., Western Australian Press.

- PATE, J.S. e WALLACE, W. 1964. Movement of assimilated nitrogen from the root system of the field pea (*Pisum arvense* L.). *Ann. Bot.*, 28:83-99.
- PATE, J.S.; GUNNING, B.E.S. e 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. e LEWIS, O.A.M. 1974. Phloem bleeding from legume fruits a technique for study of fruit nutrition. *Planta*, 120:229-243.
- PATE, J.S.; SHARKEY, P.J. e LEWIS, O.A.M. 1975. Xylem to Phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legumes, studies by a phloem bleeding technique. *Planta*, 122:11-26.
- PATE, J.S.; SHARKEY, P.J. e ATKINS, C.A. 1977. Nutrition of a developing legume fruit. *Plant Physiol.*, 59:506-510.
- PETERSON, L.W. e HUFFAKER, R.C. 1975. Loss of ribulose-1,5-diphosphate carboxilase and increase in proteolytic activity during senescence of detached primary barley leaves. *Plant Physiol.*, 55:1009-1015.
- RHODES, D.; RENDON, G.A. e STEWART, G.R. 1975. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. *Planta*, 125:201-211.

- RIJVEN, A.H.G.C. 1956. Glutamine and asparagine as nitrogen sources for the growth of plant embryos in vitro: A comparative study of 12 species. *Aust. J. Biol. Sci.*, 9:511-527.
- ROBERTSON, J.G.; WARBURTON, M.P. e FARDEN, K.J. 1975. Induction of glutamate synthase during nodule development in Lupin. *FEBS Lett.*, 55:33-37.
- SARASVATE, 1982. Tese de Doutorado, UNICAMP. (Em andamento).
- SCHLESIER, G. 1977. Occurrence and function of nitrate reductase in pods of legumes. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 171:511-523.
- SCOTT, D.B.; ROBERTSON, J. e FARDEN, K.J.F. 1976. Ammonia assimilation in Lupin nodules. *Nature*, 262:703-705.
- SLOGER, C. 1969. Symbiotic effectiveness and N_2 fixation in nodulated soybean. *Plant Physiol.*, 44:1666-1668.
- SODEK, L. e SILVA, W.J. 1977. Glutamate synthase: A possible role in nitrogen metabolism of the developing maize endosperm. *Plant Physiol.*, 60:602-605.
- SODEK, L.; LEA, P.J. e MIFLIN, B.J. 1980. Distribution and properties of a potassium-dependent asparaginase isolated from developing seeds of *Pisum sativum* and

- other plants. *Plant Physiol.*, 65:22-26.
- STEWART, C.R. 1972. Proline content and metabolism during rehydration of wilted excised leaves in the dark. *Plant Physiol.*, 50:679-681.
- STEWART, G.R.; MANN, A.F. e FENTEM, P.A. 1980. Enzymes of glutamate formation: Glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. In: B.J.Mifflin (ed.). *The Biochemistry of Plants*, Vol. 5, Cap. 7, pp.271-327.
- STORY, R. e BEEVERS, L. 1977. Proteolytic activity in relationship to senescence and cotyledonary development in *Pisum sativum* L. *Planta*, 124:77-87.
- STREETER, J.G. 1972. Nitrogen nutrition of field-grown soybean plants. I - Seasonal variations in soil nitrogen and nitrogen composition of stem exudate. *Agron. J.*, 64:331-314.
- STREETER, J.G. 1977. Asparaginase and asparagine transaminase in soybean leaves and root nodules. *Plant Physiol.*, 60: 235-239.
- TAJIMA, S. e YAMAMOTO, Y. 1975. Enzymes of purine catabolism in soybean plants. *Plant Cell. Physiol.*, 16:271-282.
- TAJIMA, S.; YATAZAWA, M. e YAMAMOTO, Y. 1977. Allantoin production and its utilization in relation to nodule

- formation by soybeans. Enzymatic studies. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 23:225-235.
- TEMPEST, D.W.; MEERS, J.L. e BROWN, C.M. 1970. Synthesis of glutamate in aerobacter aerogenes by a hitherto unknown route. *Biochem. J.*, 117:405-407.
- THEIMER, R.R. e BEEVERS, L. 1971. Uricase and allantoinase in glyoxysomes. *Plant Physiol.*, 47:246-251.
- THOMAS, S.H. 1978. Enzymes of nitrogen mobilization in detached leaves of *Lolium temulentum* during senescence. *Planta*, 142:161-169.
- THOMAS, R.J. e SCHRADER, L.E. 1981. Ureide metabolism in higher plants. *Phytochemistry*, 20:361-371.
- THOMAS, R.J.; FELLER, U. e ERISMANN, R.H. 1980. Ureide metabolism in non-nodulated *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.*, 31(121):409-417.
- THOMPSON, J.F.; MADISON, J.T. e MUENSTER, A.E. 1977. In vitro culture of imature cotyledons of soya bean (*Glycine max* L. Merr). *Ann. Bot.*, 41:29-39.
- TING, I.P. e ZSCHOCHE, W.C. 1970. Asparagine biosynthesis by cotton roots carbon dioxide fixation and cyanide incorporation. *Plant Physiol.*, 45:429-434.

- TRIJBELS, F. e VOGELS, G.D. 1966. Degradation of allantoin by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 113:292-301.
- TROMP, P.J. e OVAA, J.C. 1979. Uptake and distribution of nitrogen in young apple trees after application of nitrate or ammonium with special reference to asparagine and arginine. *Physiol. Plant.*, 45:23-28.
- TULLY, R.E. e HANSON, A.D. 1979. Amino acids translocated from turgid and water stressed Barley leaves. I - Phloem exudation studies. *Plant Physiol.*, 64:460-466.
- TURNER, N.A. e REDGWELL, R. J. 1966. A mixed layer for separation of amino acids by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, 21:192-132.
- VAN DER DRIFT, C. e BOGELS, G.D. 1966. Allantoin and allantoate in higher plants. *Acta. Bot. Neerl.*, 15:209-214.
- VOGELS, G.D. 1963. Ph D. Thesis. Institute of Technology, Delft.
- VOGELS, G.D. e VAN DER DRIFT, C. 1970. Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.*, 33:143-157.
- VOGELS, G.D.; TRIJBELS, F. e UFFINK, A. 1966. Allantoinases from bacterial plant and animal sources. I. Purification

- and enzymatic properties. *Biochem. Biophys. Acta.*, 122: 482-496.
- WALLACE, W. e PATE, J.S. 1967. Nitrate assimilation in higher plants with special reference to the cocklebur (*Xanthium pensilvanicum* Wallr.). *Ann. Bot.*, 31:213-228.
- WIGHTMAN, F. e FOREST, J.C. 1978. Properties of plant aminotransferases. *Phytochemistry*, 17:1455-1472.
- WILSON, D.G.; KING, K.W. e BURRIS, R.H. 1954. Transamination reactions in plants. *J. Biol. Chem.*, 208:863-874.
- WONG, P.P. 1980. Nitrate and carbohydrate effects on nodulation and nitrogen fixation (Acetylene Reduction). Activity of Lentil (*Lens esculenta* Moench). *Plant Physiol.*, 66:78-81.
- WRIGHT, D.J. e BOULTER, D. 1972. The characterization of vicilin during seed development in *Vicia faba* L. *Planta*, 105:60-65.
- YEMM, E.W. e WILLIS, A.J. 1956. The respiration of barley plants. IX. The metabolism of roots during the assimilation of nitrogen. *New Phytol.*, 55:229-252.
- ZIEGLER, H. 1975. Nature of transported substances. In: M.H. Zimmermann, J.A. Milburn (ed.). *Encyclopedia of Plant Physiol. I. Transport*. Springer. Berlin, pp. 59-100.

IX - APÊNDICE

TABELA IX - ATIVIDADE DA ENZIMA ALANTOINASE DURANTE A
ONTOGENIA DE FRUTOS DE SOJA NODULADA E NÃO-
-NODULADA.

Atividade expressa em $\mu\text{mol/h.grama}$ e $\mu\text{mol/h.}$
tecido.

E X T R A T O		C R U		EXTRATO DESSALINIZADO			
D		NÃO NODULADA		NÃO NODULADA		NODULADA	
A	VAGEM	TEG.	COT.	VAGEM	TEG.	COT.	VAGEM
A	VAGEM	TEG.	COT.	VAGEM	TEG.	COT.	VAGEM
TEG. = TEG. GRAMA / TEG. GRAMA TEG. GRAMA TEG. GRAMA TEG. GRAMA TEG. GRAMA TEG. GRAMA TEG. GRAMA							
34	443	52		333	4,4		535
35	285	100		224	11,2		383
36	207	7,4	333	0,4			428
37	17,6	14,0	0,5	391,6	0,54		
38				80,0	22,5	14,8	0,2
39	352	18,5	52,8	1,216	5,7		
40				80,0	20,3	72,0	1,5
41	454	15,8	52,5	1,5	78,4	9,3	
42				553	23,5	480	1,8
43	21,4	5,2	31,0	1,4	55,5	10,5	
44				35,5	14,7	40,3	2,2
45	7,8	3,8	50,4	2,2	10,2	4,7	
46				11,8	3,5	40,7	1,2
47	4,1	1,7	48,9	1,5	12,3	4,0	
48				25,3	2,5	29,7	0,4
49	3,8	2,6	3,4	0,0	12,3	3,8	

TABELA X - ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTAMINA SINTETASE DURANTE A ONTOGENIA DE FRUTOS DE SOJA NODULADA E NÃO-NODULADA.

Atividade expressa em $\mu\text{mol/h.grama}$ e $\mu\text{mol/h.tecido}$.

TABELA XI - ATIVIDADE DA ENZIMA ASPARAGINASE DURANTE A
ONTOGENIA DE FRUTOS DE SOJA NODULADA E NÃO-
-NODULADA.

Atividade expressa em $\mu\text{mol/h.grama}$ e $\mu\text{mol/h.}$
tecido.

Nodulada					Não-nodulada				
D A A	C	O	T	T E G	D A A	C	O	T	T E G
	Órgão	Grana	Órgão	Grana		Órgão	Grana	Órgão	Grana
26	0,033	3,300	-	-	25	-	-	0,010	2,180
34	0,024	0,650	0,035	2,150	31	0,034	2,850	-	-
39	0,120	1,560	0,076	3,540	35	0,060	2,550	0,040	3,350
46	0,530	2,780	0,077	1,660	39	0,110	3,100	0,070	2,780
53	0,330	1,350	0,067	1,270	43	0,370	3,100	-	-
60	0,250	1,150	0,190	6,100	51	0,370	1,600	0,085	1,850
67	0,010	0,080	0	0	59	0,380	1,400	0,202	4,200
					65	0,205	0,620	0,160	5,000
					73	0,040	0,230	0	0