



GENÍ SUNTA TONIN

*Este exemplar corresponde à redação final da tese
defendida pela sanobidato e aprovada pela Comissão Julgadora*

20/9/88

[Signature]

INFLUENCIA DA FONTE DE NITROGENIO NA ATIVIDADE
DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE ASSIMILAÇÃO
DE AMIDAS E UREÍDEOS EM COTILÉDONES IMATUROS DE
SOJA MANTIDOS EM CULTURA

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do
título de doutor em Ciências.

Orientador: PROF.DR. LADASLAV SODEK

CAMPINAS, SP, 1988

*As coisas que criamos são parte de nós mesmos.
Ao dedicá-las, doamo-nos um pouco.
Muitos me ajudaram. E, todos o fizeram por
acreditar no meu trabalho ou em minha pessoa.
Pouca é a retribuição que posso lhes dar.
Faço-o, porém, doando-lhes um pouco de mim
própria, dedicando-lhes este trabalho.*

Aos meus "amigos"

Ofereço

AGRADECIMENTOS

11

Desejo expressar os meus agradecimentos às seguintes pessoas e instituições que tornaram possível a concretização deste objetivo.

Ao Professor Dr. Ladaslav Sodek, o meu agradecimento especial pelos ensinamentos transmitidos, pela orientação segura, amigável e constante presença que permitiram a realização deste trabalho; bem como pela dedicação, estímulo e interesse com que acompanhou a execução desta tese em todas as suas etapas.

Aos Professores e colegas de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, pelos ensinamentos, pela colaboração, amizade e incentivo.

Aos Funcionários do Dpto. de Fisiologia Vegetal, pela solicitude com que sempre nos atenderam e pelo convívio amigável.

Aos Professores e Funcionários do Dpto. de Bioquímica da UFSC, pelo apoio, estímulo e amizade.

A UFSC pela concessão de afastamento que possibilitou a realização deste trabalho.

A Coordenadoria do Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Agradeço ainda, a todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

... "Era uma canção, um só cordão
E uma vontade
De tomar a mão
De cada irmão pela cidade
No carnaval, esperança
Que gente longe viva na lembrança
Que gente triste possa entrar na dança
Que gente grande saiba ser criança" ...

Chico Buarque de Holanda

ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difostato
Alfa-KG	Alfa-ceto glutarato
ALA	Alanina
ALN	Alantoína
ALNase	Alantoinase
AMP	Adenosina monofostato
ARG	Arginina
ASN	Asparagina
ASNase	Asparaginase
ASP	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
C(CH ₂ O)	Carboidrato
2-ceto glu	2-ceto glutarato
C:N	Razão carbono/nitrogênio
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
GDH	Glutamato desidrogenase
GLN	Glutamina
GLU	Glutamato
GOGAT	L-glutamina(amida):oxoglutarato amida transferase
GS	Glutamina sintetese
HIS	Histidina
ILE	Isoleucina

LEU	Leucina
N	Nitrogênio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzi- da)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
OAA	Oxaloacetato
PI	Fosfato inorgânico
POPOP	1,4-bis-(5-feniloxazol-2-il-benzeno)
PPi	Pirofosfato
PPO	2,5-difeniloxazole
SER	Serina
THR	Treonina
TRIS	Tris (hidroximetil)-aminometano
EP	Erro padrão
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa

ÍNDICE

vi

1. Introdução	1
2. Objetivo	6
3. Revisão de Literatura	7
3.1. Transporte de N em plantas	7
3.1.1. Transporte de N em leguminosas para frutos e sementes em desenvolvimento	15
3.2. Metabolismo de aminoácidos em frutos	23
3.2.1. Metabolismo de glutamina	25
3.2.2. Metabolismo de asparagina	29
3.2.2.1. Rotas catabólicas de asparagina	33
3.3. Metabolismo de ureídeos	39
4. Materiais e métodos	46
4.1. Material vegetal, cultivo das plantas e dos cotilé- dones	46
4.1.1. Descrição do material vegetal	46
4.1.2. Cultivo das plantas	47
4.1.3. Transferência e cultivo dos cotilédones	50
4.1.4. Meio de cultura	51
4.2. Preparo das amostras para análise de aminoácidos e ureídeos	54
4.2.2. Dosagem de aminoácidos livres totais	54
4.2.3. Dosagem de ureídeos totais	56

4.3. Preparação do extrato e avaliação de atividade en-	
zimática	58
4.3.1. Preparação do extrato	59
4.3.2. Ensaio de alantoinase	60
4.3.3. Ensaio da enzima GS	61
4.3.4. Ensaio da enzima GOGAT	62
4.3.5. Ensaio da enzima asparaginase	63
4.3.5.1. Purificação de (^{14}C) asparagina	65
4.3.5.2. Reagente fluorescente	66
6. Discussão	106
6.1. Asparaginase	109
6.2. Alantoinase	113
6.3. GS - GOGAT	114
6.4. Significado fisiológico dos dados	117
7. Resumo	123
7. Literatura citada	127

1. INTRODUÇÃO

Estudos em áreas de bioquímica, genética e agronomia tem despertado enorme interesse com o objetivo de melhorar a proteína de vegetais no que diz respeito à qualidade e quantidade. O interesse deve-se ao fato de que cerca de 70% dos alimentos protéicos consumidos pelo homem são de origem vegetal (KAUL, 1973). Estes alimentos protéicos são proporcionados, na maior parte, por cereais e leguminosas. Dentre as leguminosas mais importantes economicamente, a soja apresenta o maior conteúdo protéico que situa-se entre 35 a 50% (HARTWIG, 1969).

A soja é então apontada, com ênfase, como um dos grãos capazes de ajudar amplamente na produção de alimentos. E o Brasil como grande produtor mundial muito poderá contribuir visando concretizar este objetivo. A produção brasileira de soja, que foi de pouco mais de 300 mil toneladas em 1973, saltou para 18 milhões de toneladas em 1987 colocando o país como segundo produtor mundial, de acordo com dados publicados na imprensa.

A possibilidade da soja formar associação simbiótica com *Rhizobium* permite a esta espécie fixar N atmosférico o que dispensa a utilização de adubos nitrogenados.

A soja possui dois processos assimilatórios de nitrogênio: fixação do N_2 e redução do nitrato. Dependendo do processo assimilatório os produtos nitrogenados de transporte podem envolver substâncias diferentes.

Inúmeros trabalhos tem demonstrado que os compostos principais de transporte para plantas de soja noduladas são os ureídeos e para plantas não noduladas é a asparagina (p.ex. MATSUMOTO et al, 1976; MCCLURE e ISRAEL, 1979).

Levando-se em conta que o metabolismo no fruto desses compostos de transporte não é ainda satisfatoriamente conhecido e que deve ser intenso, devido à sua importância fundamental para a formação dos aminoácidos utilizados na biossíntese de proteína de reserva nas sementes, busca-se informações mais elucidativas sobre o assunto.

É conhecido que o metabolismo desses compostos tem início pela ação das enzimas asparaginase (no caso de asparagina)

e alantoinase (no caso do ureídeo alantoína).

É conhecido também que estas enzimas tem seu nível de atividade bastante aumentado nos cotilédones, durante o desenvolvimento da semente de soja (THOMAS e SCHRAEDER, 1981 e GOMES e SODEK, 1984).

Um dos pontos de abordagem que surge em torno desse assunto, e que não foi estudado por nenhum outro laboratório, diz respeito à natureza do aumento no nível de atividade das enzimas citadas.

Questiona-se se as enzimas são constitutivas ou se são induzidas pelo seu substrato.

A única tentativa para elucidar estas questões foi realizada por GOMES e SODEK (1984), utilizando plantas de soja noduladas e não noduladas. Neste estudo a atividade de alantoinase e asparaginase foi acompanhada nos frutos durante o seu desenvolvimento em função do composto predominante de transporte, ureídeos por um lado (plantas noduladas) e asparagina por outro (plantas não noduladas). No entanto, não foram obtidas evidências de algum efeito de fonte sobre as enzimas, talvez em razão da complexidade do sistema utilizado. Em plantas intactas, apesar da predominância de uma forma de composto transportado é inevitável a presença de outras como constata-se em plantas de soja noduladas onde a presença de asparagina juntamente com ureídeos é bastante significativa. Um segundo aspecto que evidencia a complexidade do sistema é o de que a metabolização dos compostos de transporte pode ocorrer total ou parcialmente em diferentes par-

tes do fruto como constatado para ureídeos (RAINBIRD et al, 1983 e 1984). Isto coloca em dúvida a natureza do composto nitrogenado que chega às sementes.

Uma maneira de evitar estes problemas é a possibilidade do cultivo de cotilédones imaturos de soja *in vitro* com fonte única de N que parece ser o sistema ideal para tais estudos.

THOMPSON et al (1977), demonstraram que os cotilédones de soja neste sistema são capazes de sintetizar, de forma normal, proteínas de reserva a partir de glutamina ou asparagina como fonte única de nitrogênio, o que indica grande capacidade destes órgãos em metabolizar estas substâncias. Por outro lado, alantoína é pouco efetiva como fonte de N (HAGA e SODEK, 1987). De qualquer forma, mesmo com baixo rendimento, há biossíntese de proteína o que evidencia capacidade dos cotilédones, a um certo grau, em metabolizar ureídeos. Além da possibilidade de se estudar compostos nitrogenados isoladamente, o sistema de cultura de cotilédones tem a vantagem do isolamento dos outros tecidos do fruto.

A proposta do nosso trabalho é investigar o grau de dependência dos processos metabólicos envolvidos na utilização das fontes de nitrogênio que suprem o fruto imaturo de soja, na presença de composto nitrogenado definido.

Além de alantoína e asparagina, formas nitrogenadas transportadas em soja, acrescentamos para este estudo a glutamina pela sua eficiência no sistema *in vitro* e pela sua impor-

tância no transporte em outras espécies.

As enzimas escolhidas para este estudo são aquelas consideradas chaves no metabolismo destes compostos nitrogenados, ou seja, asparaginase, alantoinase, glutamina sintetase e glutamato sintase. Asparaginase, alantoinase e glutamato sintase são enzimas chaves do metabolismo de ASN, ALN e GLN respectivamente. A glutamina sintetase foi incluída por ser necessária à incorporação do NH_4^+ gerado tanto na metabolização de alantoína como também de asparagina (ver esquema pag.38) e portanto passível de ter seu nível de atividade alterado em função da fonte de N.

2. OBJETIVO

Verificar a influência de alantoína, asparagina e glutamina sobre a atividade de enzimas chaves do seu metabolismo em cotilédones imaturos de soja cultivados *in vitro* na presença dessas substâncias como fonte única de nitrogênio. As referidas enzimas são alantoinase (ALNase), asparaginase (ASNase), glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. TRANSPORTE DE NITROGÊNIO EM PLANTAS

Em sua maior parte o N de sementes é armazenado na forma de proteína insolúvel. Há entretanto, um número limitado de leguminosas que armazenam também aminoácidos não protéicos (LEA e MIFLIN, 1980).

É evidente que o elevado nível de síntese de proteína na semente exige o transporte de grandes quantidades de nitrogênio de outras partes da planta.

A maior parte do N transportado é na forma predominante de um ou dois compostos específicos cuja natureza depende, principalmente, da espécie da planta e, eventualmente, das condições de crescimento.

Nas leguminosas de um modo geral, como *Lupinus* (PATE et al, 1974; ATKINS et al, 1975) e *Pisum* (PATE e WALLACE, 1964; LEWIS e PATE, 1973), os compostos nitrogenados de transporte são predominantemente asparagina (ASN) e em menor proporção glutamina (GLN).

Nas gramíneas, tais como milho (ARRUDA e SILVA, 1979) e cevada (TULLY e HANSON, 1979), além de outros gêneros como *Datura* (LEWIS, 1975), o composto de transporte predominante é GLN e em menor proporção ASN.

Em *Lupinus*, cerca de 60 a 70% do nitrogênio do xilema encontra-se na forma de ASN, muitas vezes no limite de sua solubilidade. A predominância de ASN em *Lupinus*, como em outras leguminosas de regiões temperadas (*Pisum*, *Vicia*), independe do nitrogênio ser derivado da fixação de N_2 (associação simbiótica com *Rhizobium*) ou da assimilação do nitrato (PATE, 1971). Por outro lado, em leguminosas "tropicais" como soja, feijão e caupí, o composto nitrogenado principal encontrado nas vias de transporte muda de acordo com a fonte externa de nitrogênio (MATSUMOTO et al, 1977a; 1977c; OHYAMA e KUMAZAWA, 1978; HERRIDGE et al, 1978; MCCLURE e ISRAEL, 1979; STREETER, 1979; LEA e MIFLIN, 1980). Desta forma, nas plantas noduladas que utilizam o N deri-

vado da fixação do N_2 , a ASN da seiva é substituída por ureídeos (alantoína e ácido alantóico) durante o período vegetativo e reprodutivo. É o caso de *Glicine max* (MATSUMOTO et al, 1977 a, b) *Phaseolus vulgaris* (THOMAS et al, 1979; COOKSON et al, 1980; HUNGRIA et al, 1985) e *Vigna unguiculata* (PATE et al, 1980; PEOPLES et al, 1985a).

O cultivo dessas leguminosas tropicais em presença de nitrato, o qual inibe a nodulação e em consequência a fixação de nitrogênio (PATE et al, 1977), reduz a concentração de ureídeos a níveis muito baixos, de forma que a ASN torna-se o composto nitrogenado predominante nestas condições.

No caso específico de soja foi verificado que cerca de 86% do N 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; MATSUMOTO et al, 1977a; MCCLURE e ISRAEL, 1979; RAINBIRD et al, 1984). Há acúmulo de ureídeos em várias partes e órgãos de plantas de soja noduladas, enquanto que plantas não noduladas apresentam níveis muito baixos destes compostos (MATSUMOTO et al, 1977 a, b).

Evidências conclusivas quanto à estreita associação entre a fixação de N_2 e a formação de ureídeos foram obtidas por OHYAMA e KAMAZAWA (1979), quando verificaram que o $^{15}N_2$ foi incorporado principalmente na forma de ureídeos em soja, enquanto que utilizando $^{15}NO_3^-$ a incorporação ocorreu principalmente em ASN.

Outros compostos nitrogenados de transporte são de distribuição mais limitada, como a amida metilenoglutamina encontrada em *Arachis hipogaeae* (FOWDEN, 1954; WINTER et al, 1982), arginina em algumas árvores (TROMP e OVAA, 1973), citrulina em *Alnus* em associação com o actinomiceto *Frankia* (BOLAR, 1959; PATE, 1971; WHEELER et al, 1983), canavanina em *Canavalia* sp, derivados de ASN em espécies de *Cucurbitaceae* (LEA e MIFLIN, 1980), citrulina / glutamina na simbiose *Macrozamia*-*Anabaena* (HALLIDAY e PATE, 1976).

Uma característica comum destes compostos nitrogenados de transporte é que todos possuem pelo menos dois átomos de nitrogênio por molécula e derivam diretamente do metabolismo de carboidratos, particularmente as amidas, que são produtos primários da assimilação do nitrogênio (MIFLIN e LEA, 1977). A exceção são os ureídeos, cuja rota biossintética envolve o metabolismo de purinas como se pode observar na figura 01.

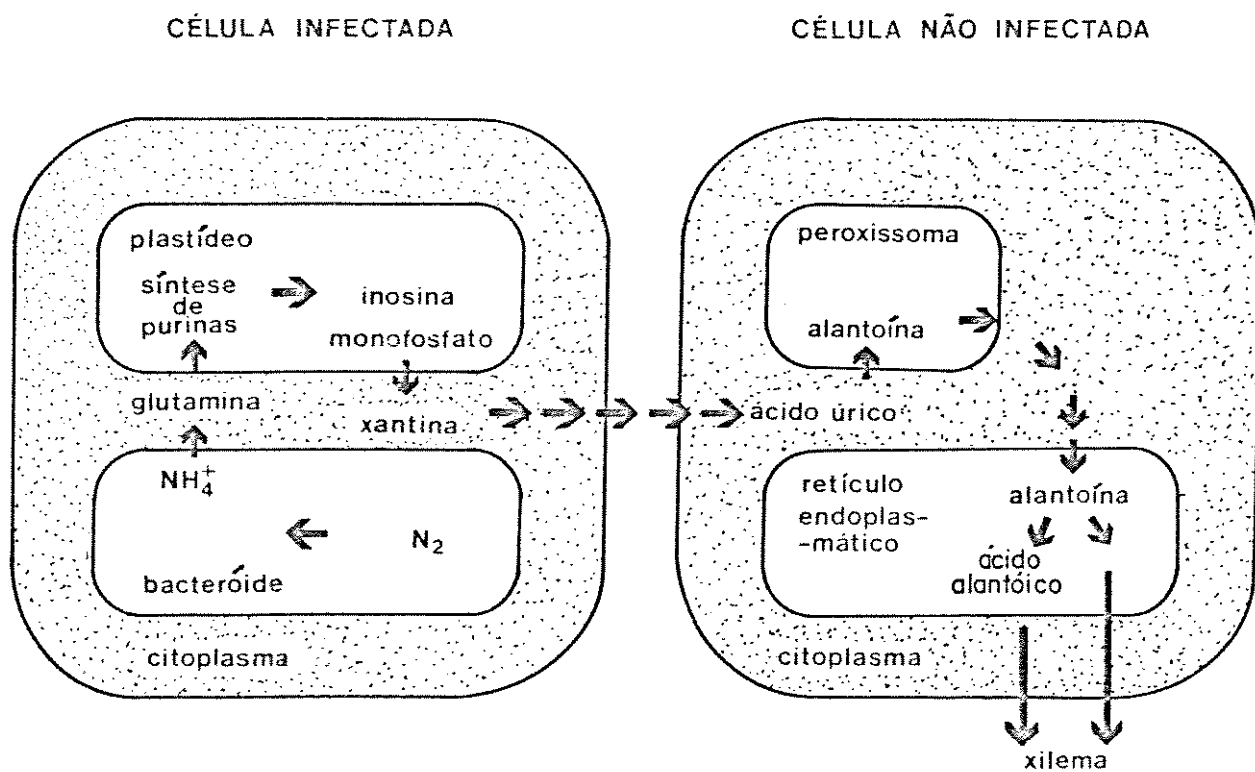


Figura 01. Organização e localização das vias biossintéticas de ureídeos em raízes de leguminosas noduladas. Adaptado de SCHUBERT e BOLAND (1984).

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

Uma característica geral das moléculas envolvidas no transporte de nitrogênio em plantas, é que elas devem ter uma baixa razão C:N. O uso de tais compostos nitrogenados assegura uma utilização econômica das fontes carbonadas no transporte de nitrogênio e também permite um contínuo e eficiente transporte sob condições nas quais o suprimento de carbono é limitado (BRAY, 1983).

O número restrito de aminoácidos protéicos utilizados no transporte de N tem duas características comuns. Todos tem uma razão baixa C:N e seus esqueletos carbonados são oriundos ou derivados de cetoácidos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. A razão C:N para ASN é 2,0, para GLN é 2,5 e para arginina é 1,5. Os ureídeos tem uma vantagem adicional como moléculas transportadoras de N em termos de economia de carbono pois a razão C:N na molécula é 1,0.

A menor solubilidade dos ureídeos implica na necessidade do transporte de um volume grande de água, 2,6 vezes maior que a água necessária para transportar quantidades equivalentes de nitrogênio na forma de ASN (SPRENT, 1980), razão pela qual, em clima temperado, em que as temperaturas atingem valores mais baixos, a pequena solubilidade de alantoína e ácido alan-

tóico, tornará ineficiente o transporte de nitrogênio via ureídeos. Na figura 02 apresentamos um esquema geral dos principais compostos nitrogenados que são transportados em plantas translocadoras de amidas e/ou ureídeos e seus processos metabólicos de síntese.

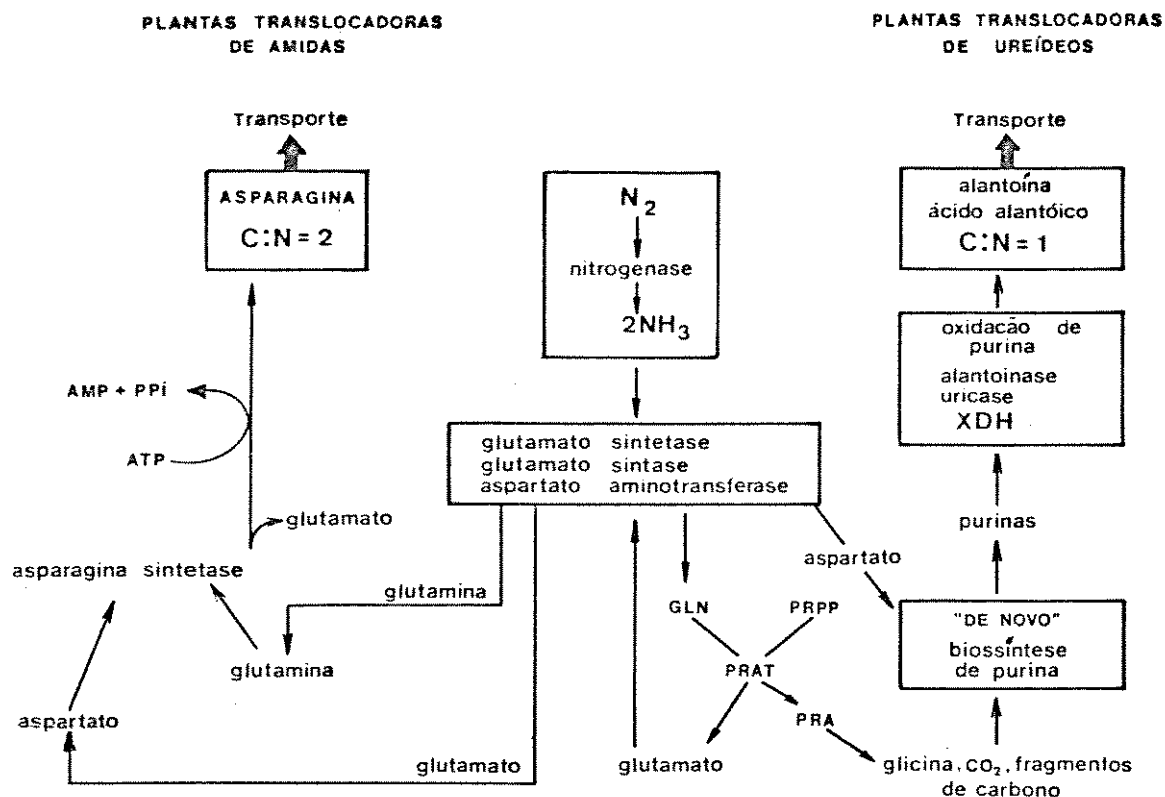


Figura 02. Metabolismo em nódulos de plantas que transportam predominantemente amidas e/ou ureídeos. XDH: xantina desidrogenase; PRA: fosforibosilamina; PRAT: 5-fosforibosilpiro-fostato amidotransferase; PRPP: 5-fosforibosilpiro-fostato. Adaptado de REYNOLDS et al (1982).

3.1.1. TRANSPORTE DE N EM LEGUMINOSAS PARA FRUTOS E SEMENTES EM DESENVOLVIMENTO

O transporte de nutrientes para sementes de leguminosas em desenvolvimento, ocorre a partir dos dois feixes vasculares principais da vagem ao longo dos quais as sementes estão alternativamente presas. Geralmente um único feixe vascular transporta os assimilados para as sementes, entrando no tegumento pela chalaza através do funículo (THORNE, 1981).

Estudos cinéticos do transporte em soja (THORNE, 1980) e *Phaseolus* (PATRICK e MCDONALD, 1980) indicam que os assimilados que chegam às sementes são rápida e circunferencialmente distribuídos no tegumento, seguidos por uma transferência radial mais gradual para a superfície interna dos cotilédones. Os assimilados liberados pelo tegumento são acumulados nos cotilédones a partir do apoplasto que separa as duas estruturas (tegumentos e cotilédones).

Os mecanismos pelos quais os cotilédones de soja acumulam estes solutos foram estudados em cotilédones imaturos *in vitro* (THORNE, 1982; LICHTER e SPANSWICH, 1981a, b; RAINBIRD et al, 1984) e em protoplastos isolados de cotilédones (LYZNIK et al, 1982; SCHMITT et al, 1984). De acordo com os autores, as estruturas correlacionadas com o descarregamento do floema nas sementes de algumas espécies cultivadas, fornecem evidências de uma ampla variação de especializações anatômicas que estão envolvidas para facilitar o influxo de assimilados. Há, no entanto, al-

guns pontos comuns. O descarregamento ocorre inteiramente dentro de tecido maternal e não há conexão simplásticas entre o tecido materno e os cotilédones. O descarregamento ocorre a partir de um terminal vascular que é reticulado numa extensão que varia entre as espécies. O local do descarregamento real pode incluir a combinação de membranas dos tubos crivados, células companheiras normais ou modificadas e vários tipos de células do parênquima vascular - seu simplasto interconectado por numerosos plasmodesmos. Poucas espécies foram examinadas e as tentativas para compreender o descarregamento estão limitadas pela falta de conhecimentos mais precisos dos tecidos envolvidos no processo (THORNE, 1985).

O estudo do descarregamento do floema foi limitado ao longo do tempo, pelo acesso difícil e fragilidade dos tecidos do floema (WOLSWINKEL, 1974; MINCHIN e THORNE, 1984), determinando avaliações indiretas dos mecanismos envolvidos. Contudo, sementes em desenvolvimento propiciam uma oportunidade especial para estudos desta natureza.

A técnica que permite estudos da composição e dos mecanismos de descarregamento da seiva do floema em sementes em desenvolvimento de soja e outras leguminosas é a chamada técnica do tegumento vazio (THORNE e RAINBIRD, 1983). De acordo com a técnica proposta pelos autores, é feita uma abertura na parede da vagem e o embrião é cirurgicamente removido do tegumento sem que haja interferência no influxo dos assimilados pelos tecidos. O embrião é então substituído por um meio de coleta (figura 03).

Este procedimento é possível porque não há conexão celulares entre o tegumento e os cotilédones. Os solutos liberados pela parte (metade) do embrião ainda conectada à vagem (mas vazia) são coletados de modo contínuo em soluções especiais ou agar que funcionam como aprisionadores (RAINBIRD et al, 1984).

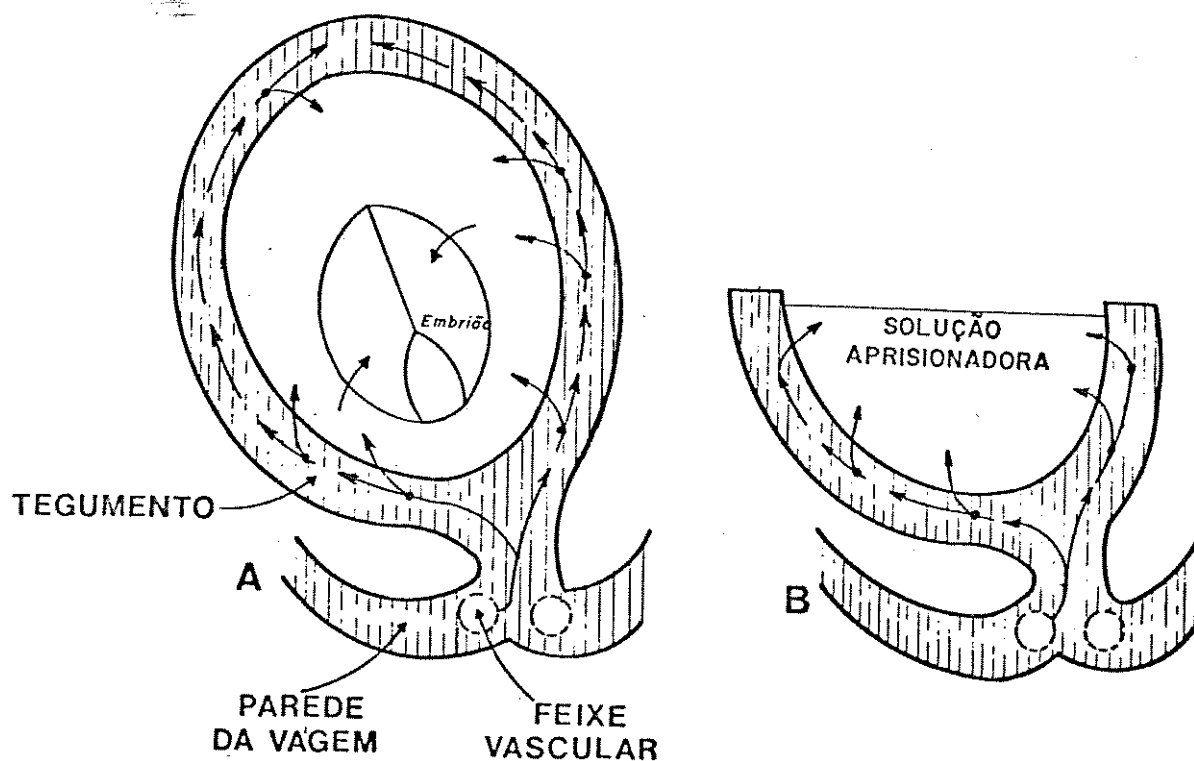


Figura 03. Representação esquemática de sementes de soja (A) intactas e (B) modificadas secretando metabólitos para o saco embrionário. As setas dentro do tegumento representam algumas das possíveis vias de transferência dos solutos. Um aprisionador de agar substitui o embrião para coletar os solutos secretados por uma parte do tegumento (B). Adaptado de THORNE e RAINBIRD, 1983.

Análises de exsudato do tegumento *in vivo*, utilizando a técnica do tegumento vazio, foram realizadas em plantas de soja noduladas por RAINBIRD *et al* (1984). Os autores demonstraram que GLN é o principal soluto nitrogenado secretado pelo tegumento chegando a atingir 52% do N total. Os níveis de ASN foram de 19%, arginina e histidina apareceram na proporção de 5 e 4%, respectivamente. Amônia e outros aminoácidos constituíram cerca de 24% do N total. Os ureídeos, alantoína e ácido alantóico, se constituíram num componente nitrogenado em níveis insignificantes de concentração.

Em caupí a secreção do tegumento, em frutos no estágio inicial de desenvolvimento é rica em histidina (30 a 35% do N total); glutamina e asparagina alcançaram 20% do N total secretado. Em sementes no estágio intermediário de desenvolvimento (figura 04), GLN e ASN são as principais formas de compostos nitrogenados secretadas (PEOPLES *et al*, 1984; GIFFORD e THORNE, 1986).

Destas observações surgem questionamentos a respeito do envolvimento direto de alantoína e ácido alantóico em sementes de soja em desenvolvimento. Parece que estes compostos seriam convertidos em outras formas de solutos nitrogenados antes ou durante o influxo pelos frutos.

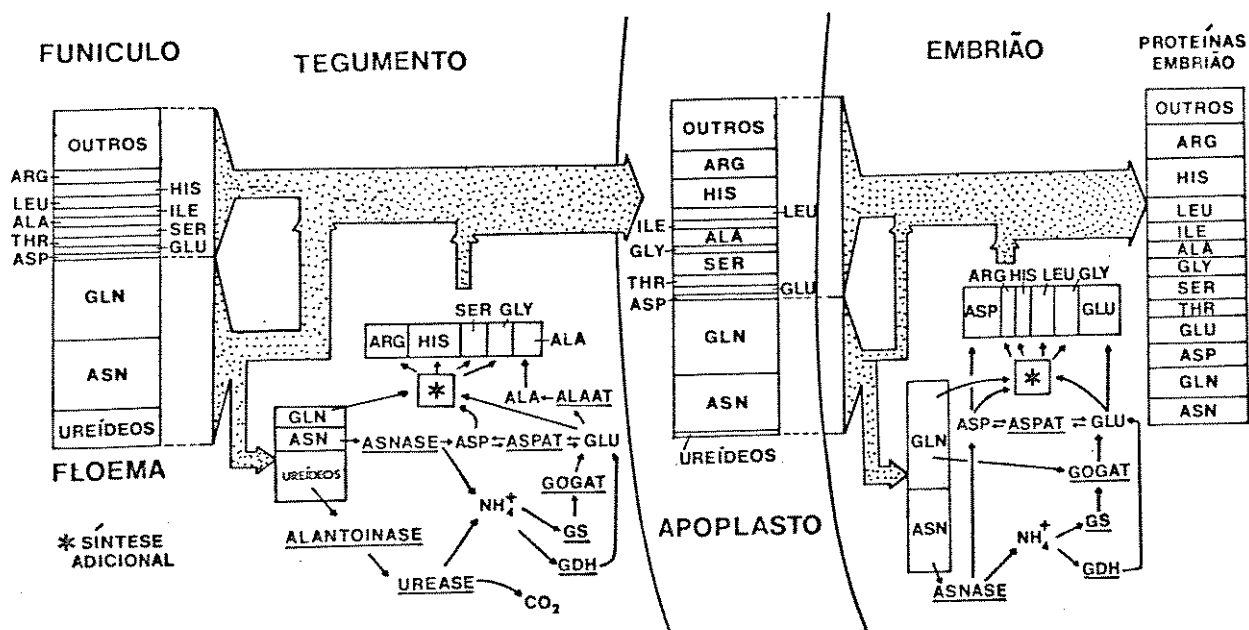


Figura 04. Vias de fluxo e rotas metabólicas para os compostos nitrogenados nas sementes de caupí simbioticamente dependentes, durante o estágio mais intenso de preenchimento das sementes (12-18 dias após a antese). Adaptado de PEOPLES et al (1985b). ASNASE: asparaginase; ALAAT: alanina aminotransferase; ASPAT: aspartato aminotransferase; GS: glutamina sintetase; GOGAT: glutamato sintase; GDH: glutamato oxiredutase.

De que forma, exatamente, a síntese de histidina está relacionada com a utilização dos ureídeos nos tegumentos e outros órgãos ainda não foi elucidada (ATKINS et al, 1982), mas estes importantes solutos de translocação não chegam até o saco embrionário em quantidades apreciáveis em cowpea e nem em soja (HSU et al, 1984; RAINBIRD et al, 1984).

Em ervilha, uma leguminosa que não transporta ureídeos, a forma dos assimilados nitrogenados mais importantes no líquido do saco embrionário é homoserina, glutamina e alanina (MURRAY, 1983), o que indica intenso metabolismo de ASN (a principal forma de N translocada) antes de chegar aos cotilédones. Estes resultados foram confirmados e ampliados por MURRAY e CORDOVA-EDWARDS (1984b). Em estudos com ^{14}C ASN os autores demonstraram que os destinos de ASN em tegumentos de sementes em desenvolvimento foram a incorporação direta em proteína, a conversão para GLN e, em menor proporção para alanina, valina e sacarose. De acordo com os autores, o tegumento é o local mais provável onde ocorrem estas transformações, o que já havia sido sugerido por IRELAND e JOY (1981) e URQUHART e JOY (1981 e 1982).

Podemos concluir que, de acordo com os trabalhos realizados até o momento, as amidas GLN e ASN são os solutos nitrogenados mais importantes para soja e caupí, enquanto que ALA e GLN são encontrados em maior proporção nas secreções de tegumentos de ervilha (RAINBIRD et al, 1984; PEOPLES et al, 1985a; THORNE, 1985). Os solutos secretados pelos tegumentos diferem muito da composição dos compostos nitrogenados encontrados na

na seiva do floema que chega aos frutos. As próprias sementes não guardam estreita semelhança na composição de suas proteínas com os translocados que importam (LAYZELL e LARUE, 1982; PATE, 1980; PATE et al, 1984). Isto implica numa ampla transformação dos compostos nitrogenados durante o descarregamento do floema em algumas espécies, e sugere fortemente que os assimilados podem encontrar as enzimas apropriadas durante sua movimentação em direção às sementes (MURRAY e KENNEDY, 1980; PEOPLES et al, 1985a).

3.2. METABOLISMO DE AMIDAS EM FRUTOS

Em função das grandes diferenças entre a forma de N translocada até o fruto e as formas importadas pelos cotilédones - e das proteínas sintetizadas nos cotilédones - é evidente que deve ocorrer a interconversão de N e, portanto, a biossíntese de novo dos aminoácidos nos frutos. Obter evidência para tal metabolismo e esclarecer como os compostos de transporte são metabolizados nos frutos, tem sido o objetivo de diversos grupos de pesquisadores nos últimos anos.

A capacidade da semente em utilizar o N transportado para sintetizar os aminoácidos necessários para a síntese de proteína de reserva foi demonstrada em vários trabalhos. Estudos com ^{15}N (LEWIS e PATE, 1973; ATKINS et al, 1975; LEWIS, 1975) demonstraram que o N amídico das amidas GLN e ASN foi transferido rapidamente para o amino-grupo de outros aminoácidos.

Corroborando estes resultados, estudos utilizando ^{14}C como traçador demonstraram que as vias biossintéticas de aminoácidos protéicos estão operando ativamente em sementes em desenvolvimento (PATE et al, 1975; SODEK, 1976; MISRA e DAKS, 1985). Verificamos, assim, que a importância dos mecanismos de biossíntese de novos aminoácidos deve ser considerada com ênfase tendo em vista os altos níveis de amidas no fluxo de translocação.

Talvez a evidência mais forte quanto a esta capacidade da semente em metabolizar as amidas veio dos trabalhos com

o cultivo de cotilédones imaturos na presença de amidas como fonte única de nitrogênio. MILLERD *et al* (1975) demonstraram que cotilédones de ervilha em cultura cresceram e sintetizaram proteína de reserva a partir de ASN. Embora a GLN não tenha sido uma fonte eficiente nos estudos de MILLERD *et al*, MACNICOLL (1977) demonstrou que cotilédones imaturos de ervilha em cultura podiam assimilar tanto ASN como GLN, sendo cada uma destas duas formas metabolizadas extensivamente também para outros aminoácidos.

IFA *et al* (1979) também demonstraram que GLN e ASN são igualmente efetivas, proporcionando a síntese protéica em cotilédones de ervilha, fava e feijão em cultura *in vitro*. Os autores também concluíram que, o procedimento utilizado por MILLERD *et al* (1975) pode ter causado a conversão de GLN em GLU e amônia por efeito de autoclavagem, e por este motivo GLN não conseguiu proporcionar síntese de proteína em embriões.

O cultivo de cotilédones imaturos em meio de cultura estéril também foi demonstrado para soja por THOMPSON *et al* (1977), SKOKUT *et al* (1982), COKER e SCHAEFER (1985) e HAGA e SODEK (1987). Aqueles autores relataram que GLN e ASN podem, isoladamente, ser utilizadas como fonte nitrogenada e, consequentemente, o cotilédone tem a capacidade para a biossíntese de todos os aminoácidos protéicos necessários a estes órgãos em desenvolvimento.

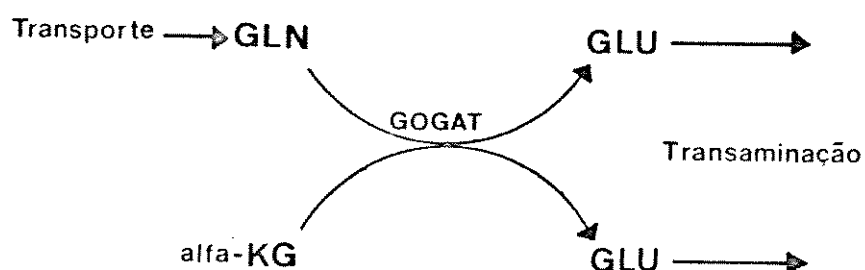
As evidências indicam que o metabolismo dos principais compostos de transporte inicia após o descarregamento do floema do fruto e se completa nos cotilédones.

3.2.1. METABOLISMO DE GLUTAMINA

A questão que surge, então, é de como o N das amidas se torna disponível para a biossíntese de outros aminoácidos nas sementes. No caso específico de GLN, a elucidação desse processo surgiu em consequência do uso de alguns inibidores metabólicos.

Metionina sulfoximina (MSO) é conhecido como um forte e específico inibidor da sintetase de GLN, e foi testado em plantas por MEINSTER (1974). Este composto demonstrou não ter efeito na utilização de GLN como única fonte de N em cotilédones de leguminosas em cultura (LEA et al, 1979). Por outro lado, os autores também relataram um efeito de azaserina, análogo de GLN e inibidor da transferência do N amídico de GLN, que age na enzima glutamato sintase, GOGAT, (WALLSGROVE et al, 1977). Este composto inibiu a biossíntese protéica dependente de GLN em cotilédones de soja, sugerindo que GOGAT está envolvida na metabolização de GLN e que desta forma o N amídico de GLN é transferido diretamente para o alfa-cetoglutarato (SKOKUT et al, 1982; COKER e SCHAEFER, 1985; HAGA e SODEK, 1987).

O esquema proposto para metabolização de GLN é mostrado a seguir.



O grupo amídico de GLN pode ser transferido para outros aminoácidos por ação de transaminases (WIGHTMAN e FOREST, 1978).

A utilização de GLN para a biossíntese de aminoácidos protéicos *in situ* já havia sido proposta por LEWIS (1975), BEEVERS e STOREY (1976) e MACNICOLL (1977). Os autores sugeriram que o N amídico de GLN poderia ser transferido para o N amínico de GLU e este subsequentemente metabolizado, e por transaminação o N amínico proporcionaria a síntese de vários outros aminoácidos.

Pelo esquema proposto, a enzima GOGAT é a enzima chave no metabolismo de GLN.

A atividade desta enzima foi 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).

Em cotilédones de ervilha em desenvolvimento, a atividade de GOGAT foi detectada por BEEVERS e STOREY (1976). Os autores relataram que a atividade da enzima foi suficiente para metabolizar todo o N acumulado nas proteínas de reserva.

A importância da enzima GOGAT foi também demonstrada em cotilédones de soja por STOREY e BEEVERS (1978) e STOREY e REPORTER (1978). Vários parâmetros cinéticos da enzima foram determinados pelos autores. De acordo com estes resultados, GOGAT é específica para L-GLN como substrato doador de N e alfa-ceto-glutarato como acceptor. A reação não é reversível e requer NADH como cofator redutante.

Outras evidências foram acumuladas demonstrando a importância de GOGAT no metabolismo de GLN.

Estudos com a determinação do N de GLN por (^{15}N) NMR, e sua utilização na biossíntese de proteína de reserva em cotilédones de soja em desenvolvimento, foram levados a efeito por SKOKUT et al (1982). Os autores demonstraram que, quando GLN (^{15}N) amídico foi fornecida a cotilédones de soja em cultura, como única fonte de N, aproximadamente quantidades iguais de ^{15}N e ^{14}N foram incorporados nas proteínas de reserva. Estes dados sugerem que GLN (^{15}N) amídico foi inicialmente deaminado por ação de GOGAT. O GLU formado, metade do qual marcado com ^{15}N , foi en-

tão utilizado, indiscriminadamente, para a biossíntese protéica mostrando, dessa forma, que tanto o N amínico como o amídico do GLN permanecem num reservatório comum. Os autores confirmaram suas proposições com o uso de MSD que demonstrou não ter nenhum efeito na biossíntese protéica quando GLN foi a fonte nitrogenada.

Em cotilédones de ervilha, após o período de síntese acelerada de proteína, o conteúdo de (^{14}C) GLN livre decresceu (MURRAY, 1983). O autor relacionou este declínio na marcação de GLN com o aumento em direção a GLU e arginina e também à correspondência no período de aumento na atividade de GOGAT nos cotilédones. Estes dados, segundo o autor, demonstram claramente a efetividade de GOGAT em produzir GLU a partir de GLN.

Corroborando estes resultados MURRAY e CORDOVA-EDWARDS (1984) demonstraram que (^{14}C) GLN originou (^{14}C) GLU em embriões de ervilha em desenvolvimento. Os autores também demonstraram que o GLU produzido funcionou como doador de amino-grupos para a biosíntese líquida de outros aminoácidos, que na sequência foram incorporados em proteínas de reserva.

3.2.2. METABOLISMO DE ASPARAGINA

Há mais de cem anos ASN foi identificada como um dos constituintes do floema em certas espécies de plantas.

A alta concentração dessa amida em algumas espécies de plantas, como é o caso da *Asparagus officinales*, possibilitou o seu isolamento e identificação como o primeiro aminoácido em plantas (DELAVILLE, 1802 apud LEA e FOWDEN, 1975).

Apesar disso o estudo da metabolização de ASN em plantas apresentou-se durante muitos anos como um dos mais difíceis de ser elucidado.

Para RIJVEN (1956) a ASN agiria somente como fonte de nitrogênio para o crescimento de embriões jovens.

LEA et al (1978) e THING e ZSCHOCHE (1970) sugeriram que a ASN não seria metabolizada na planta, mas sua função se resumia em ser um constituinte protéico.

Este conceito modificou-se com a possibilidade de cultivar cotilédones imaturos de ervilha por MILLERD et al (1975). Os autores sugeriram que a ASN como fonte única de nitrogênio poderia agir como precursor de todos os aminoácidos protéicos. Em 1977 THOMPSON et al fizeram a mesma constatação com cotilédones imaturos de soja.

Estudos com ^{15}N (ATKINS et al, 1975; LEWIS, 1975) mostraram que o N amídico de ASN é rapidamente transferido para o aminogruppo de outros aminoácidos. MACNICOLL (1977) demonstrou que (^{14}C) ASN foi metabolizado por cotilédones isolados de ervilha e

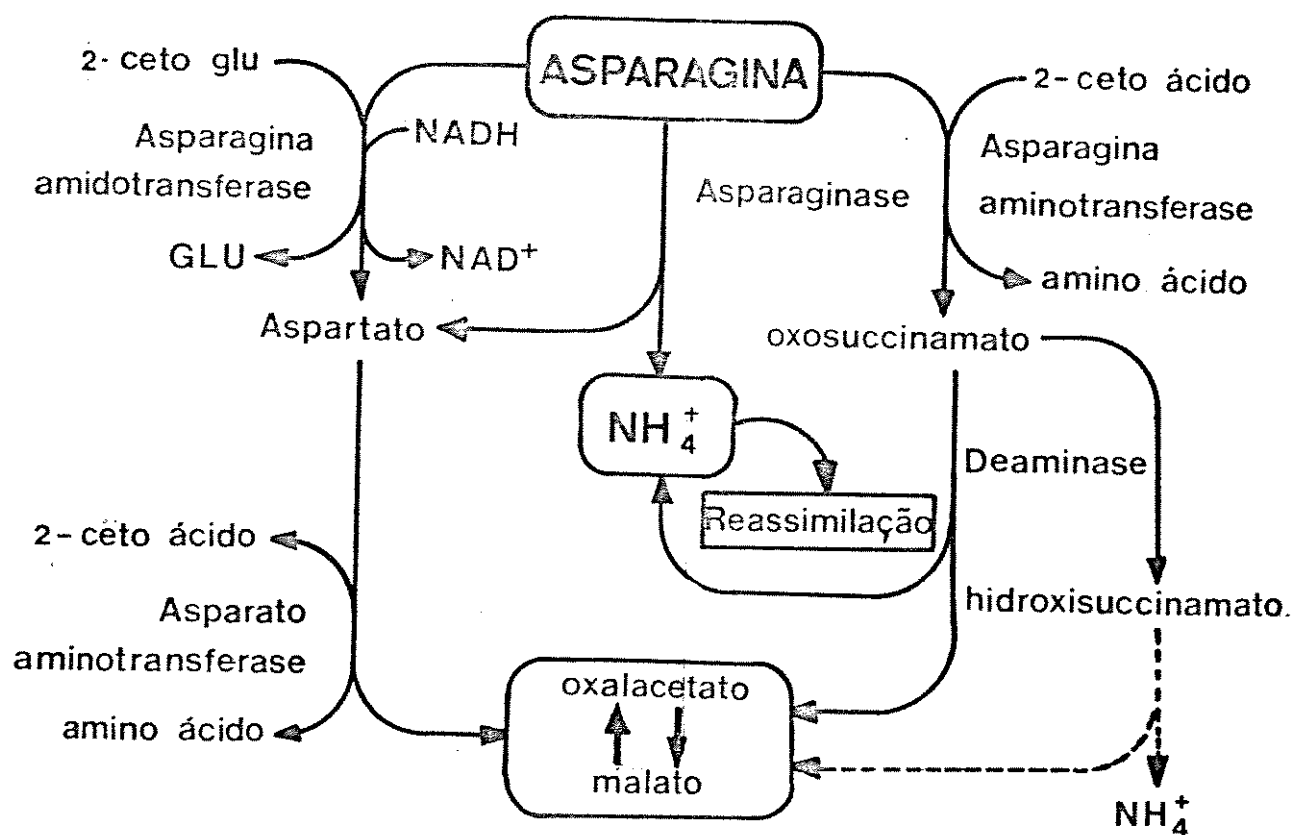


Figura 05. Vias catabólicas de ASN em tecidos vegetativos e reprodutivos de leguminosas que produzem a amida e ureídeos. Adaptado de SCHUBERT, 1986.

uma ampla variação de aminoácidos marcados protéicos e não protéicos formaram-se na fração solúvel.

As questões que surgem, então, são de como o N amídico e amínico de ASN se tornam disponíveis para a biossíntese de aminoácidos.

O metabolismo do N amídico de ASN foi extensivamente estudado por ATKINS et al (1975). Os autores demonstraram que sementes em desenvolvimento de *Lupinus albus* recebem 55-60% do N como ASN. Contudo, a proteína formada na semente contém apenas 7-10% de resíduos de ASN demonstrando que há uma considerável metabolização de ASN anterior à biossíntese protéica.

Estudos com $^{14}\text{C}(\text{U})$ e (^{15}N) amídico de ASN durante o período de máxima biossíntese protéica na semente, mostraram que pelo menos 60% do N amídico foi convertido em aminoácidos na proteína de reserva. Uma quantidade significativa de ^{15}N foi recuperada em arginina, e esta conversão deve ter ocorrido na semente em desenvolvimento, pois este aminoácido não foi detectado no floema das plantas (ATKINS et al, 1975). De modo semelhante leucina, glicina, alanina e vários outros aminoácidos foram marcados com ^{15}N . A ampla distribuição do ^{15}N entre 13 aminoácidos protéicos sugere que houve extensiva síntese de novo a partir de ASN. Resultados semelhantes foram obtidos por SCHAEFER et al (1981) utilizando $(^{14}\text{C}, ^{15}\text{N})$ ASN em estudos com a técnica de NMR de polarização cruzada, em soja.

Em contraste com esta extensiva metabolização do (^{15}N) amídico, 66% do ^{13}C permaneceu em aspartato (ATKINS et al, 1975), o que sugere que o esqueleto carbonado de ASN foi metabolizado muito vagarosamente a partir do momento em que o grupo amida foi removido.

JOY et al (1976), em estudos com ervilha, confirmaram a metabolização do ^{15}N de ASN. Neste caso a maior parte do N de ASN foi metabolizada para glutamina e homoserina. Estes resultados foram confirmados por LEA et al (1979). Pelo uso de MSO e azaserina os autores constataram que estas substâncias inibiram a síntese protéica dependente de ASN indicando que a amônia liberada por ASN é reassimilada pelo sistema GS-GOGAT.

Estas observações demonstram claramente que ASN é degradada extensivamente tanto na parte aérea como nos órgãos reprodutivos, e os produtos do catabolismo são utilizados na biossíntese de outros aminoácidos.

Estudos mais detalhados tentando elucidar a metabolização do N amídico e amínico de ASN na biossíntese protéica, foram realizados por SKOKUT et al (1982), utilizando a técnica (^{15}N) NMR em cotilédones imaturos de soja em cultura. De acordo com os autores os N de ASN foram utilizados com um grau diferente de especificidade durante o transcurso do experimento. Durante os primeiros sete dias da cultura com ASN como única fonte nitrogenada, o N amínico contribui com aproximadamente duas vezes mais N para a proteína do que o N amídico. A utilização do N amídico deu-se num crescente nos períodos mais longos da cultura. O uso

reduzido do N amídico foi confirmado por seu rápido aparecimento como amônia no meio de cultura. Ainda de acordo com os autores, o N amídico de ASN foi um precursor essencial para a biossíntese de proteínas durante todo o transcurso do experimento. Não foi possível substituir o N amídico pelo N amínico nos resíduos de proteína. Isto foi confirmado pelo uso de MSD, que inibiu completamente o crescimento dos cotilédones em asparagina, indicando que a assimilação de amônio é essencial para a biossíntese de proteína de reserva.

Os estudos com ASN tem proporcionado evidências que suportam a existência de várias rotas metabólicas (figura 05) para catabolização de ASN. Contudo essas vias metabólicas não foram ainda suficientemente esclarecidas.

3.2.2.1. ROTAS CATABÓLICAS DE ASPARAGINA

Três vias metabólicas tem sido propostas para o catabolismo de ASN.

1. $ASN \longrightarrow ASP + NH_3$ (reação A)
2. $ASN + \text{cetoácido} \longrightarrow 2\text{-oxossuccinamato} + \text{aminoácido}$ (reação B)
3. $ASN + GLU \longrightarrow ASP + GLN$ (reação C)

1. A enzima melhor estudada tem sido asparaginase (EC 3.5.1.1) que remove o N amídico de ASN e cujos produtos são

aspartato e amônia.

Reação A:

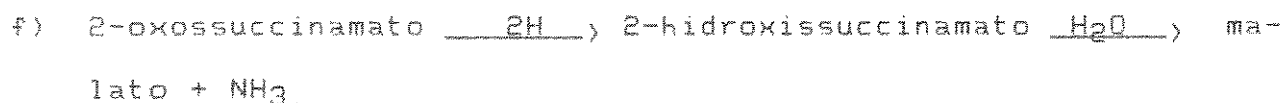
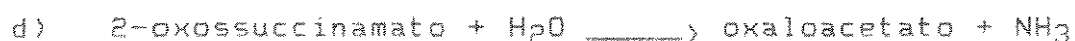


A asparaginase foi detectada em raízes (ATKINS et al, 1975), nódulos (STREETER, 1977; CHANG e FARDEN, 1981) e mais tarde em sementes imaturas (LEA et al, 1976; SODEK et al, 1980) de leguminosas.

Os estudos com ASNase revelaram que a enzima está distribuída amplamente nos diversos órgãos da planta e que pode ser encontrada em duas formas: uma que é K^+ independente e ocorre em algumas espécies somente (LEA et al, 1978) e outra que é K^+ dependente e muito mais comum (SODEK et al, 1980). Esta última enzima mostrou-se particularmente ativa em cotilédones imaturos de ervilha (SODEK et al, 1980; MURRAY E KENNEDY, 1980), soja (GOMES e SODEK, 1984) e feijão (HOSTALÁCIO et al, 1985). Os mais altos níveis de atividade foram encontrados no período de maior acúmulo de proteínas de reserva. Além do cotilédone, a enzima ASNase foi encontrada por estes mesmos autores no tegumento, embora sua atividade tenha sido alta apenas em ervilha. Aparentemente a vagem possui pouca ou nenhuma atividade da enzima.

2. Uma segunda enzima envolvida na degradação de ASN, asparagina transaminase, remove o N 2-amino de ASN transferindo-o para um cetoácido (reação B).

O 2-oxossuccinamato produzido nesta reação pode ser metabolizado por uma das seguintes reações:



Em ambos os casos o N amídico de ASN pode, eventualmente, ser liberado como amônia.

Há um grande número de estudos que demonstraram a existência da enzima asparagina transaminase em vários tecidos vegetais, embora em sementes especificamente sua atividade seja aparentemente muito pequena, ou mesmo ausente. A atividade da enzima é particularmente alta em folhas de soja (STREETER, 1977) onde estudos com ^{15}N indicaram que esta enzima desempenha um papel significativo no metabolismo de ASN (TA et al, 1984). A conversão de 2-oxossuccinamato (reação f) para 2-hidroxissuccinamato, e o acúmulo deste último composto foi demonstrado por LLOYD e JOY (1978).

No caso de frutos, a atividade da enzima asparagina transaminase foi demonstrada em tegumentos de sementes de ervilha nos estágios iniciais de desenvolvimento do fruto (MURRAY e KENNEDY, 1980). Entretanto, a atividade da enzima nos cotilédones demonstrou ser bastante inferior à dos tegumentos.

IRELAND e JOY (1981) demonstraram, em estudos com sementes imaturas de ervilha, que enquanto a enzima ASNase demonstrou níveis altos de atividade, somente traços foram detectados para a atividade de transaminase.

A atividade da enzima foi demonstrada em vagens de soja (GOMES e SODEK, 1984) de plantas noduladas e não noduladas, mas sua presença nas sementes não foi detectada.

3. Outra rota metabólica no metabolismo de ASN tem sido proposta envolvendo ASN em uma reação similar à do sistema GOGAT.

A possibilidade da presença dessa enzima em tecidos vegetais foi aventada por DOUGALL (1974) bem como por outros pesquisadores, em estudos realizados com a enzima glutamina amidotransferase. Esta enzima transfere o grupo amida de glutamina para 2-cetoglutarato, porém, FOWLER et al (1974), DOUGALL (1974) e STEWARD et al (1980) sugeriram que ASN poderia substituir GLN na reação. Entretanto, MIFLIN e LEA (1975) demonstraram que a aparente dependência de ASN na reação foi devida a uma pequena quantidade de ASP presente como contaminante de ASN comercial. A ASN cromatograficamente livre do ASP não substituiu GLN na reação, colocando dúvidas à existência da enzima.

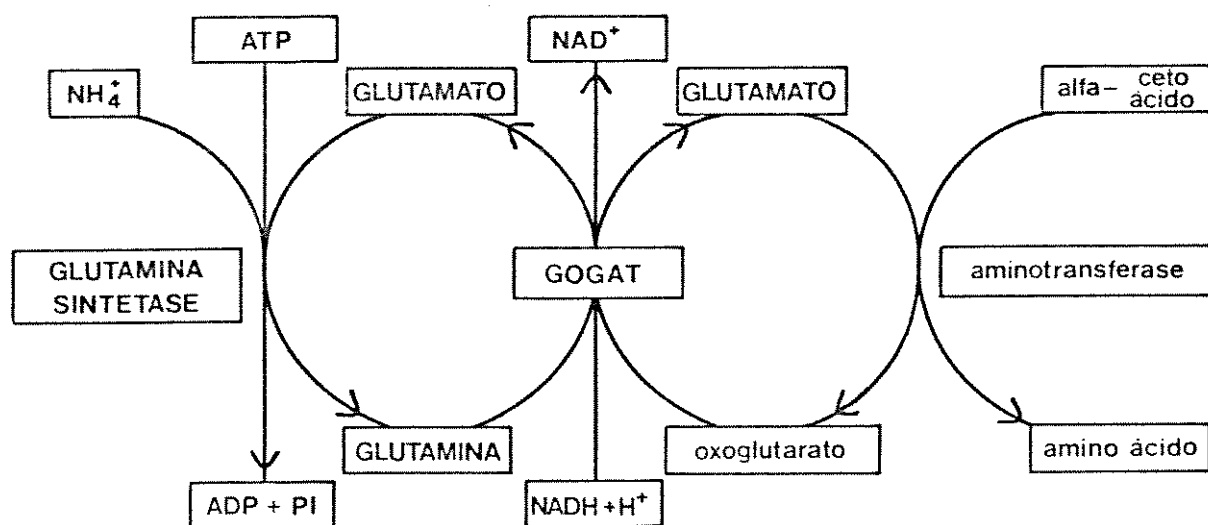
Outros grupos de pesquisadores tem se empenhado, nos últimos anos, para demonstrar a existência desse sistema (BE-EVERS e STOREY, 1976; MIFLIN e LEA, 1977; WALLASGROVE et al, 1977; STOREY e REPORTER, 1978), mas em nenhum destes trabalhos

houve qualquer resultado positivo. Mas as possibilidades para existência da enzima subsistem. Parece ser bastante razoável a transferência direta do N amídico de ASN, para evitar a reassimilação da amônia via GS como se faz necessário com a utilização de asparaginase e aminotransferase.

Pela análise dos resultados dos diversos trabalhos com catabolismo de ASN, podemos inferir que das três rotas metabólicas descritas, apenas a da enzima ASNase é importante em sementes.

A presença de uma enzima em sementes capaz de metabolizar asparagina, explica o desenvolvimento e crescimento de cotilédones isolados tanto de ervilha como de soja quando mantidos em cultura *in vitro* com asparagina como fonte única de N (MILLERD et al, 1975; THOMPSON et al, 1977; LEA et al, 1979; SKOKUT et al, 1982; HAGA e SODEK, 1987).

Utilizando inibidores específicos de glutamina sintetase e glutamato sintase (LEA et al, 1977; SKOKUT et al, 1982 e HAGA e SODEK, 1987) foi possível demonstrar que a amônia liberada pela ação de asparaginase é reassimilada via GS antes de sua incorporação em proteínas de sementes de acordo com o esquema apresentado.



3.3. METABOLISMO DE UREÍDEOS

Sabe-se, hoje, da grande importância dos ureídeos alantoína e ácido alantóico no metabolismo nitrogenado das plantas de soja e outras leguminosas tropicais. Apesar disso, pouco se sabe ainda, a respeito da catabolização destas substâncias.

Alantoinase (EC 3.5.2.5.) é a enzima que cataliza a hidrólise de alantoína para ácido alantóico. Esta enzima é abundante em folhas, caules, nódulos e frutos de soja (LEE e ROUSH, 1964; VAN DER DRIFT e VOGELS, 1966; TRIPLET et al, 1980; THOMAS e SCHRAEDER, 1981; GOMES e SODEK, 1984).

A atividade de alantoinase é maior nas sementes do que nas vagens (HERRIDGE et al, 1978), embora a concentração de ureídeos em sementes seja mais baixa do que nas vagens. Isto sugere que os ureídeos são primeiramente concentrados nas vagens e então degradados a outros compostos como aminoácidos e amidas, ou transportados diretamente para as sementes, onde são rapidamente degradados e presumivelmente assimilados a aminoácidos e proteínas (THOMAS e SCHRAEDER, 1981). De acordo com os autores o tempo que decorre entre os picos máximos no teor de ureídeos de vagens e sementes, em soja, sugere que as vagens e sementes agem como sítios de consumo, separados e possivelmente competitivos. A alta atividade da enzima alantoinase nas sementes em desenvolvimento, suporta a sugestão de que ureídeos podem ser degradados rapidamente em sementes após a translocação a partir da vagem (FUJIHARA et al, 1977).

Supõe-se que o N de alantoato (produto de alantoinase) seja liberado na forma de uréia via urease (MIFLIN e LEA, 1982), mas as evidências experimentais são ainda insuficientes para comprovar esta hipótese.

A ocorrência de uma enzima que degrada alantoato em plantas *in vivo* não foi ainda demonstrada claramente, embora haja evidências de que alantoato é de fato metabolizado em plantas.

ATKINS *et al* (1982) demonstraram que tanto as folhas como os caules e as sementes de soja, dispõem de mecanismos capazes de liberar $^{14}\text{CO}_2$ e (^{14}C) uréia a partir de $(2,7\text{-}^{14}\text{C})$ ALN. Estudos com NMR em cotilédones de soja nutridos com $(^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N})$ ALN mostraram que todas as ligações C-N de ALN foram rompidas antes da incorporação do composto em proteína (COKER e SCHAEFER, 1985).

Duas enzimas que catabolizam alantoato foram encontradas e extensivamente estudadas em microrganismos (VAN DER DRIFT *et al*, 1970; VOGELS e VAN DER DRIFT, 1976): alantoato amidohidrolase (EC 3.5.3.9) e alantoato amidinohidrolase (EC 3.5.3.4), também chamada de alantoicase.

A enzima alantoicase cataliza a hidrólise de alantoato para uréia e ureido-glicolato, enquanto a enzima amidohidrolase cataliza a hidrólise de alantoato para 2NH_3 , CO_2 e ureidoglicolato com o possível intermediário ureidoglicina (VAN DER DRIFT *et al*, 1970).

O metabolismo subsequente de ureidoglicolato e ureidoglicina foi demonstrado inicialmente em microorganismos e está apresentado na figura 06.

Não há ainda evidências claras que demonstrem a existência da enzima alantoicase em plantas, com a consequente degradação do ureidoglicolato em glioxilato e uréia. SHELPS e IRELAND (1985) e WINKLER et al (1985) sugeriram a possibilidade da existência dessa enzima em frutos de soja em desenvolvimento.

Por outro lado, também não há razões suficientemente fortes para excluir a possibilidade da existência da enzima amidohidrolase em plantas (WINKLER et al, 1985).

Há relatos na literatura, de diversos grupos de pesquisadores, enfocando o catabolismo de alantoína em plantas, mas faltam elucidações conclusivas que demonstrem a existência de via(s) catabólica(s) completa(s). As evidências que existem foram obtidas em folhas, e supõe-se que possam também ser verdadeiras para frutos.

ATKINS et al (1982) demonstraram que há a liberação de $^{14}\text{CO}_2$ em tecidos de cowpea nutridos com (2- ^{14}C) ALN, indicando que as ligações de ureido-carbonil de ALN foram rompidas para liberar o CO_2 . Além disso, eles recuperaram níveis baixos de (^{14}C) uréia. Estes resultados são consistentes com a possível ação de alantoicase ou da amidohidrolase seguida da liberação subsequente de uréia a partir do ureidoglicolato (WINKLER et al, 1987).

SHELP e IRELAND (1985) observaram que usando um inibidor de urease (ácido acetohidroxâmico) esse composto impediu a liberação de $^{14}\text{CO}_2$ de (2- ^{14}C) ALN em tecidos de folhas de soja em cultura.

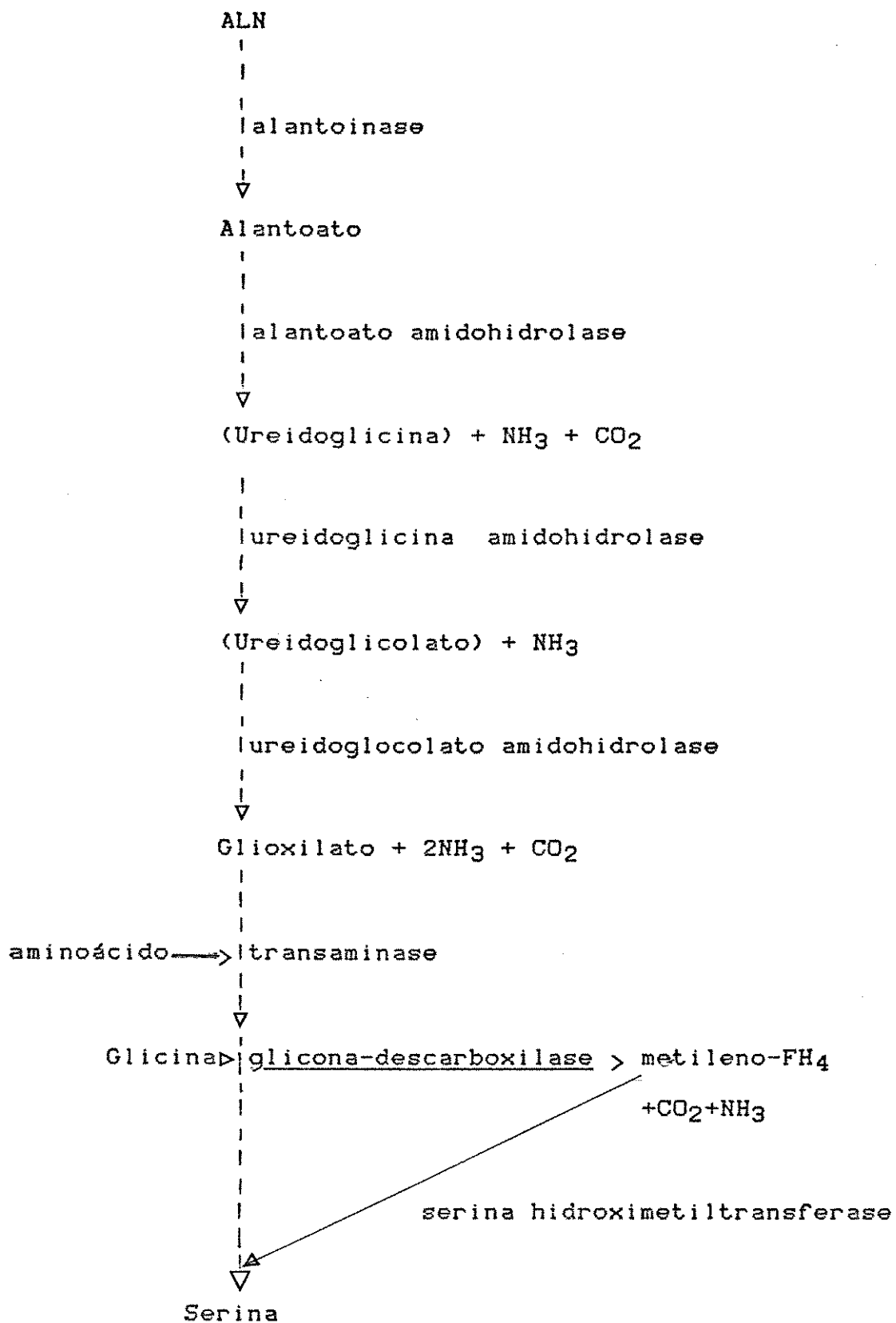
Os autores também relataram um acúmulo de uréia não marcada nos discos de folhas tratados com o inibidor quando comparados com discos não tratados. Em ambos os casos a nutrição nitrogenada dos tecidos foi feita com (^{14}C) ALN. A partir desses resultados os autores concluíram que no catabolismo de alantoína, há a liberação de duas moléculas de uréia via alantoicase e ureidoglicolase (ureidoglicolato uréia-liase, EC 4.3.2.3). Estes resultados são consistentes mas não provam que a degradação de ALN seja de fato via alantoicase.

POLACCO et al (1982) relataram que culturas de células de soja em suspensão, na ausência de níquel (que inibe a formação de urease ativa), desenvolveram-se em ALN mas não em uréia como fonte nitrogenada. Os autores concluíram que o N de ALN foi, pelo menos parcialmente, catabolizado sem a ação da urease.

WINKLER et al (1985) demonstraram evidências para a existência de uma enzima alantoato amidohidrolase dependente de manganês em tegumentos e sementes em desenvolvimento de soja. Nos experimentos onde urease foi completamente inibida por ação do fenilfosfordiamidato (um dos mais potentes inibidores da enzima) a liberação de NH_3 e CO_2 de ALN não sofreu qualquer alteração. Ademais, os níveis de uréia detectados na presença do inibidor

foram menores que 8% em relação ao CO₂ produzido. Este resultado, contrariando as evidências anteriores, elimina a possibilidade de estar a enzima alantoicase envolvida na rota catabólica primária de ALN. A uréia produzida poderia ter sido consequência de reação não enzimática de ureidoglicolato em ureidoglicina. A conclusão proposta pelos autores é a de que há, dessa forma, possibilidades concretas que demonstram estar o catabolismo de ALN direcionado via alantoato amidohidrolase em soja. Esses resultados foram confirmados em 1987 pelo mesmo grupo de pesquisadores realizando estudos em tecidos de folhas intactas de soja com o uso de (2,7-¹⁴C) ALN como fonte nitrogenada (WINKLER et al, 1987). Os autores relataram, também, que ¹⁴CO₂ e (¹⁴C) alantoato foram os únicos produtos marcados detectados. Quando os autores utilizaram (4,5-¹⁴C) ALN esta foi catabolizada e foram detectados os seguintes compostos marcados nos discos de folhas de soja: (¹⁴C) alantoato, ¹⁴CO₂, (¹⁴C) glicina e (¹⁴C) serina. Estes resultados são plenamente favoráveis para o direcionamento do catabolismo de ALN via duas enzimas amidohidrolases (mas nenhuma urease), que operariam em velocidades semelhantes formando glioxilato, que por sua vez, seria metabolizado via fotorespiração. Esta foi a primeira evidência de que alantoato é metabolizado sem a ação da urease para produzir NH₃ e CO₂ e também que os carbonos 4 e 5 de ALN entram na rota metabólica da fotorespiração em folhas de soja.

A via catabólica de ALN de acordo com a proposição dos autores, é mostrada no esquema que segue.



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL, CULTIVO DAS PLANTAS E DOS COTILÉDONES

4.1.1. DESCRIÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Como citado anteriormente, neste estudo foram utilizadas plantas de soja, cultivar Santa Rosa.

A cultivar Santa Rosa foi selecionada por Miyasaka e Williams em 1958, no Instituto Agronômico de Campinas, SP, e originou-se do cruzamento entre linhagens provenientes do sul dos Estados Unidos. Essa cultivar em 1963, então denominada 1-326,

foi multiplicada comercialmente no Município de Santa Rosa, RS, e daí recebeu o nome dessa localidade (MIRANDA et al, 1977).

A cv. Santa Rosa apresenta grande estabilidade produtiva, comportando-se de maneira satisfatória nas mais diversas condições de cultivo, segundo os autores acima citados. Possui também tipo de crescimento determinado com ciclo completo em torno de 130 dias e altura média de aproximadamente 80 cm.

4.1.2. CULTIVO DAS PLANTAS

As plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill, cv. Santa Rosa) foram cultivadas em casa de vegetação em condições naturais de luz e temperatura, entre os meses de setembro e maio.

A cv. Santa Rosa, é uma planta muito sensível ao comprimento do dia. Sendo classificada como uma planta de dias curtos, tem sua floração acelerada quando recebe iluminação por um período inferior a certo número de horas por dia (crítico máximo). Foi então realizado um tratamento de fotoperíodo para que a floração fosse induzida. Assim, no estágio de expansão da primeira folha trifoliolada, as plantas que cresceram em fotoperíodos mais longos foram expostas a tratamento com nove horas de luz diária, durante quatro dias, para indução da floração (MIRANDA e SODEK, 1982). As plantas que cresceram na época de fotoperíodos mais curtos receberam tratamento de luz suplementar num total de dezoito horas diárias (dias longos) até atingir o estágio de ex-

58

pansão da primeira folha trifoliolada, para atrasar a floração. Após a indução, as plantas foram cultivadas transferindo-as para condições ambientais normais.

Antes do plantio, as sementes previamente selecionadas, foram lavadas com água destilada e colocadas em vasos plásticos com capacidade de três litros, colocando-se quatro sementes por vaso. Como substrato foi utilizado vermiculita intensamente lavada para evitar problemas de toxicidade. No estágio de desenvolvimento com a expansão das folhas cotiledonares, foi feita a raleação deixando duas plantas por vaso.

No estágio de desenvolvimento da primeira folha trifoliolada iniciou-se o tratamento com 200 ml de solução nutritiva completa de HOAGLAND e ARNON (1950), duas vezes por semana. O suprimento de água foi feito sempre que julgado necessário.

A composição da solução nutritiva usada para suprimentos nutricionais das plantas foi a seguinte:

MACRONUTRIENTES (concentração final)

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5 mM
KNO_3	5 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 mM
KH_2PO_4	1 mM

MICRONUTRIENTES (1 ml/l)

H_3Bo_3	2860 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1810 mg/l
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	220 mg/l
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	80 mg/l
H_2MoO_4	20 mg/l

Fe - EDTA (1ml/l)

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	29,4 mg/l
EDTA.Na ₃	33,2 mg/l

Controle fitossanitário foi efetuado sempre que necessário, utilizando soluções de DECIS (0,3 ml/l) e HOSTATION (0,5 ml/l), em duas pulverizações sucessivas no intervalo de três dias.

A floração ocorreu, em média, trinta dias após o plantio.

Para a instalação dos experimentos em cultura de tecido, foram utilizados os frutos imaturos, quando atingiram um peso fresco entre 30 e 40 mg por cotilédone. Este estágio foi alcançado no tempo médio de 20-25 dias após o florescimento.

4.1.3. TRANSFERÊNCIA E CULTIVO DOS COTILÉDONES

O cultivo de cotilédones imaturos de soja foi baseado na metodologia descrita por THOMPSON *et al* (1977). Em média 20-25 dias após o florescimento, os frutos atingiram o estágio de desenvolvimento de 30-40 mg por cotilédone. Este estágio foi considerado ideal para estudos utilizando-se cotilédones de soja em cultura *in vitro* por HAGA e SODEK (1987).

As vagens selecionadas foram tratadas com solução de dodecil-sulfato de sódio (SDS) a 0,1%, contendo hipoclorito de sódio (0,5% de cloro ativo) por 5 minutos e lavadas a seguir por três vezes com água destilada esterilizada. As vagens foram colocadas em placas de Petri previamente esterilizadas e com o auxílio de pinça e bisturi as sementes foram removidas com cuidado para não danificar os tecidos. Todas estas operações foram levadas a efeito, em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar (marca VECO).

Um dos cotilédones foi inoculado no meio (líquido) de cultura contendo uma fonte específica de nitrogênio e o outro da mesma semente, numa fonte diferente para fins de estudos comparativos com as diferentes fontes utilizadas.

Os frascos de cultura contendo os cotilédones imaturos de soja foram colocados em agitador de mesa (com cerca de 130 agitações/minuto), numa câmara de crescimento a 25°C, sob luz contínua, com irradiância de $800 \text{ uE cm}^{-2} \text{ S}^{-1}$ PAR,

por um período de no máximo dez dias. Durante o período de crescimento as contaminações eram facilmente detectadas e os frascos descartados. A frequência de contaminação foi, em média, menor que 1% em todos os experimentos.

No transcurso desse tempo, periodicamente, eram retiradas amostras de cotilédones para estudos com as diferentes enzimas ou para dosagens de aminoácidos e ureídeos. Seleccionados os frascos, os cotilédones eram retirados cuidadosamente do meio de cultura, lavados por três vezes com água destilada, enxugados com papel absorvente e pesados.

4.1.4. MEIO DE CULTURA

O meio de cultura utilizado foi preparado de acordo com LINSMAIER e SKOOG (1965), modificado por THOMPSON et al, (1977) cuja composição é a seguinte.

a) MACRONUTRIENTES (mg/l, concentração final)

KCL	372,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	220
MgSO ₄ .7H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	85
K ₂ SO ₄	522

b) MICRONUTRIENTES (mg/l, concentração final)

H ₃ PO ₄	3,1
MnSO ₄ .4H ₂ O	11,15
ZnSO ₄ .4H ₂ O	4,3
KI	0,415
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,125
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0125
CoCl.6H ₂ O	0,0125

c) FERRO (mg/l, concentração final)

FeSO ₄ .7H ₂ O	13,625
NaEDTA	18,625

d) COFATORES (mg/l, concentração final)

Tiamina	0,02
Myoinositol	5,0
Ácido Nicotínico	0,025
PiridinaHCl	0,025
Glicina	0,1

e) SACAROSE 0,25 (g/l, concentração final)

f) FONTE DE NITROGÊNIO (concentração final)

Alantoína	1750 mg N/l
Asparagina	1750 mg N/l
Glutamina	1750 mg N/l

Todos os componentes do meio (com exceção das fontes de nitrogênio) foram preparados em solução aquosa (dobro da concentração final) e o pH ajustado para 6,0 com NaOH 0,1 N. Foram colocados 2 ml da solução do meio em frascos de cultura do tipo "French square" de 40 ml. Os frascos contendo o meio foram autoclavados a 120°C sob pressão de uma atmosfera durante 20 minutos. As fontes de nitrogênio foram preparadas em solução aquosa e 2 ml foram acrescentados assepticamente aos frascos contendo o meio de cultura, na concentração final de 1,75 mgN/ml de meio de acordo com HAGA e SODEK (1987). A solução contendo a fonte de nitrogênio foi esterilizada por filtração em câmara de fluxo laminar. As fontes de nitrogênio ALN, ASN e GLN foram usadas individualmente no meio de cultura.

4.2. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS E UREÍDEOS

4.2.1. EXTRAÇÃO DE UREÍDEOS E AMINOÁCIDOS LIVRES

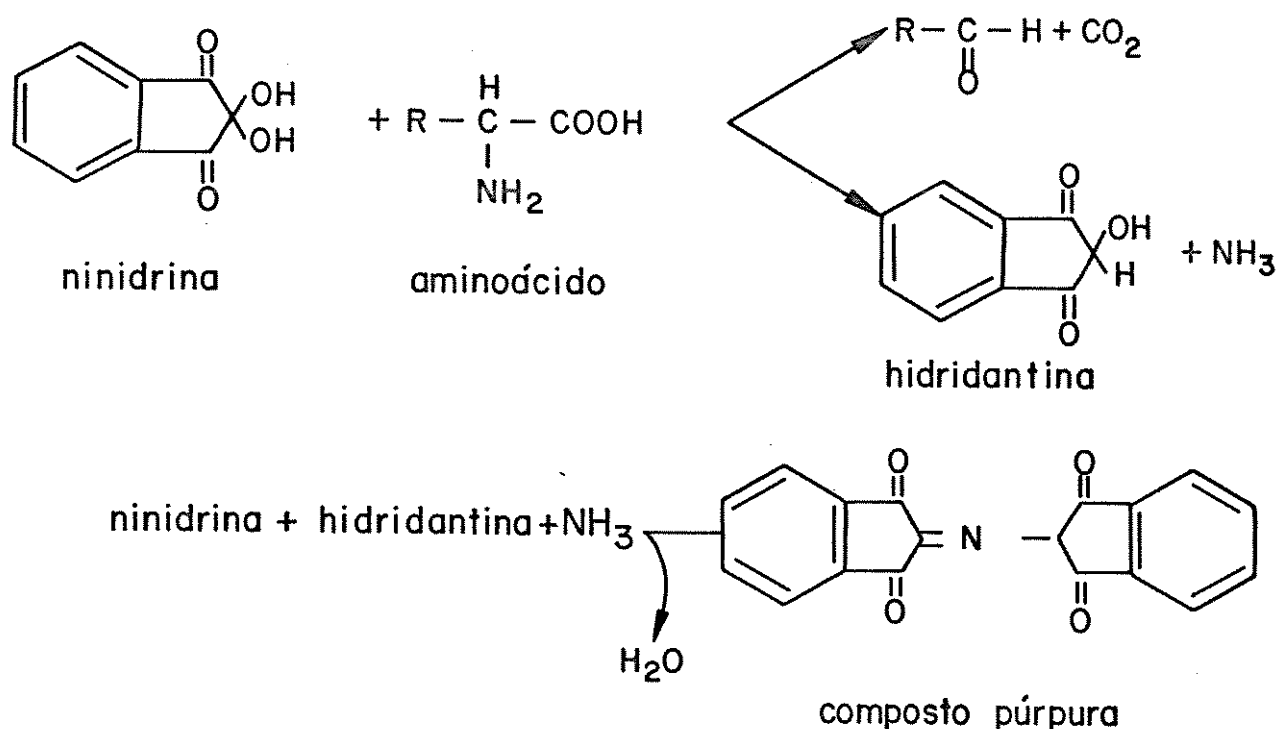
A extração de ureídeos e aminoácidos livres dos cotilédones foi efetuada em metanol, clorofórmio e água (MCW) nas proporções de 12:5:3 (v/v), de acordo com BIELSKI e TURNER (1966). O material foi homogeneizado com 5ml do solvente por grama de tecido em homogeneizador Polytron PT35, (KINEMATICA GmbH - Brinkmann Instruments) durante 15 segundos e centrifugado a 800g durante 5 minutos em temperatura ambiente.

Na etapa seguinte adicionou-se 1 ml de clorofórmio e 1,5 ml de água destilada a cada 4 ml do sobrenadante, em funil de separação. Após agitação o material foi deixado em repouso para separação entre as fases. A fase aquosa, livre de clorofila, foi recolhida para análise posterior.

4.2.2 DOSAGEM DE AMINOÁCIDOS LIVRES TOTAIS

A concentração de aminoácidos foi determinada de acordo com YEMM e COCKING (1955), por reação colorimétrica com ninidrina. A técnica baseia-se na produção estequiométrica da dioxohidrindilidena-dioxohidrindamina (DYDA), pigmento púrpura. A produção do pigmento púrpura, pela reação com a ninidrina, ocor-

re com todos os aminoácidos e peptídeos que apresentam um grupo alfa-amino livre. Com os aminoácidos prolina e hidroxiprolina o derivado produzido tem cor amarela, visto que nestes dois aminoácidos o grupo alfa-amino está substituído. A sequência de reações envolvidas nas reações de aminoácidos com ninidrina segundo LEHNINGER (1984) é a seguinte:



Seguindo a marcha analítica proposta, nos tubos de reação foi colocado 1 ml da solução da amostra, 0,5 ml de tampão citrato 0,2 M pH 5,0, 1 ml de cianeto de potássio a 2% (v/v) de

uma solução de KCN 0,01 M em metilcelussolve, e 0,2 ml de ninidrina 5% em metilcelussolve. Após agitação os tubos foram tampados com bolinhas de vidro e aquecidos em banho maria fervente, durante 20 minutos. Após resfriamento, o volume foi completado para 4,0 ml com etanol 60%. Procedeu-se em seguida a leitura das amostras em espectrofotômetro a 570 nm. O tubo "branco" foi preparado pela mesma marcha analítica substituindo-se a amostra por igual volume de água destilada. Os resultados foram avaliados a partir de uma curva padrão de leucina, preparada utilizando-se soluções de leucina em concentrações que variaram de 0 a 200 nmoles por ml.

4.2.3. DOSAGEM DE UREÍDEOS TOTAIS

Para determinação dos ureídeos alantoína e ácido alantóico do extrato descrito em 4.2.1. foi utilizada a marcha analítica proposta por VOGELS e VAN DER DRIFT (1970). Através deste método avalia-se, por colorimetria, o produto de reação entre ferricianeto de potássio e um derivado de hidrazina. O derivado de hidrazina é formado a partir da hidrólise ácida do ureídeo ácido alantóico produzindo uréia e ácido glioxílico. O ureídeo alantoína, por hidrólise alcalina, é transformado em ácido alantóico. Na figura 07 está indicada a sequência de reações envolvidas na determinação de ureídeos de acordo com o método seguido.

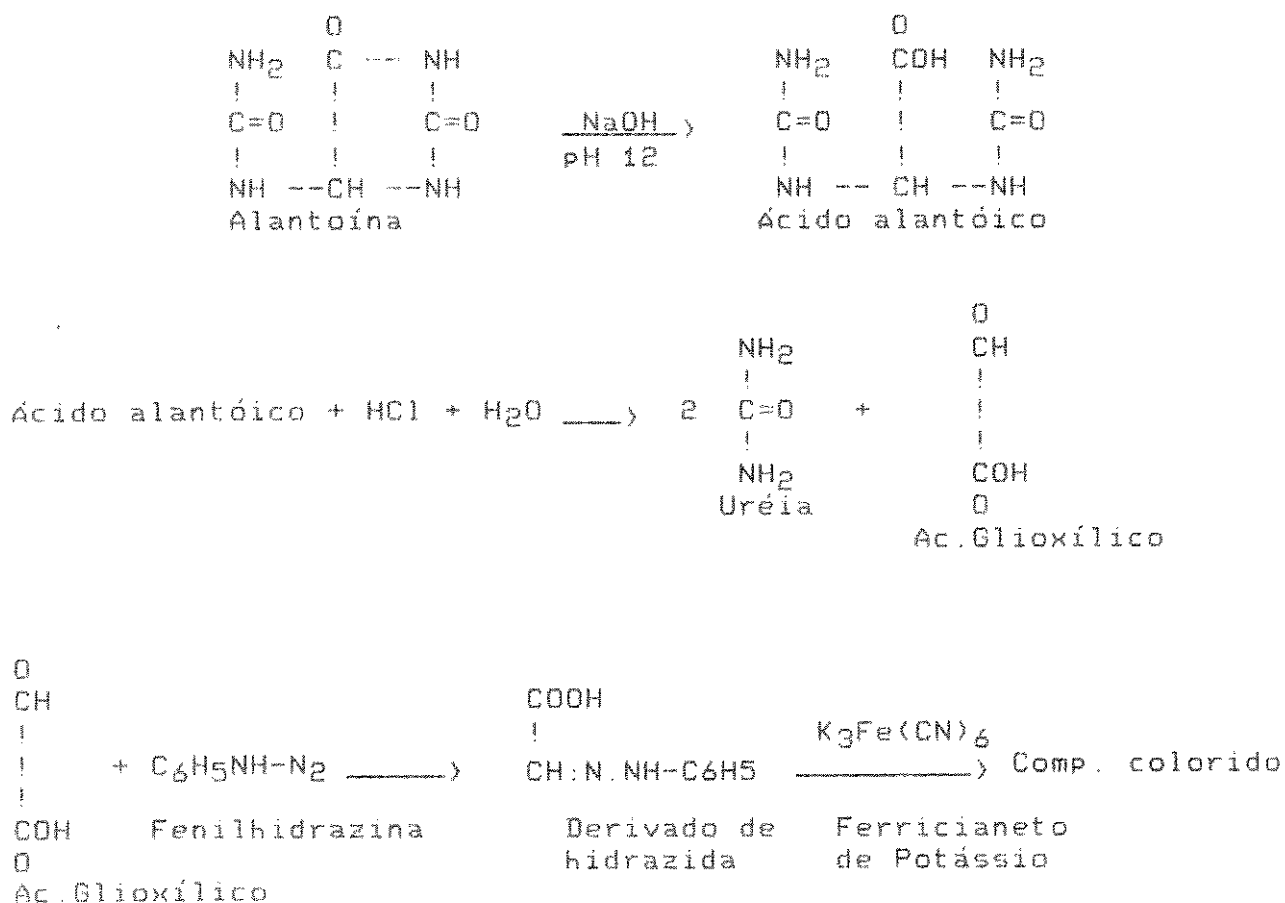


Figura 07. Reações envolvidas na determinação de ureídeos de acordo com YOUNG e CONWAY (1942).

Seguindo-se a marcha analítica proposta colocou-se em tubos de ensaio 1 ml de solução da amostra obtida de acordo com 4.2.1. Adicionou-se 1 ml de NaOH 0,5N, 2 ml de água destilada e uma gota de fenilhidrazina 0,33 %. Os tubos foram transferidos para banho maria fervente por 8 minutos (hidrólise alcalina). Após o resfriamento, adicionou-se 1 ml de HCl 0,65N e novamente

levados a banho maria fervente por 4 minutos (hidrólise ácida). Após resfriamento, adicionou-se 1 ml de tampão fosfato 0,4M pH 7,0 e 1 ml de fenilhidrazina 0,33%. Os tubos foram então deixados à temperatura ambiente por 5 minutos. Após este tempo foram resfriados em banho de gelo e adicionados 5 ml de HCl concentrado a 0° e 1 ml de ferricianeto de potássio 1,65%. Após agitação o material foi deixado em repouso por 15 minutos, e a seguir fez-se a leitura da absorbância a 535 nm. O tubo "branco" foi preparado segundo a mesma marcha analítica substituindo-se a amostra por igual volume de água destilada. Os valores quantitativos da reação foram avaliados tendo-se como referência uma curva padrão de alantoina confeccionada pela mesma marcha analítica usando-se concentrações de 0 a 100 nmoles por ml.

4.3. PREPARAÇÃO DO EXTRATO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foram feitas análises para acompanhamento e determinação de atividade de enzimas envolvidas na utilização de alantoina, asparagina e glutamina durante a fase de desenvolvimento dos cotilédones imaturos de soja.

Os ensaios foram levados a efeito com cotilédones colhidos diretamente das plantas e/ou com cotilédones mantidos em cultura. Os valores apresentados e expressos em umoles de produto por cotilédone por hora, são o resultado obtido de análises uti-

lizando 18 cotilédones como amostra.

Com excessão dos casos específicos de experimentos instalados para avaliar a atividade da enzima asparaginase, os ensaios para avaliar as 3 outras enzimas foram repetidos pelo menos duas vezes, em época e com material vegetal diferente.

4.3.1. PREPARAÇÃO DO EXTRATO

Os cotilédones retirados do meio de cultura foram lavados em água destilada por três vezes, enxugados em papel absorvente e a seguir pesados.

O extrato cru foi preparado pela maceração dos cotilédones em graal com pistilo (previamente resfriados) em tampão imidazol-HCl 50mM, pH 8,0, acrescido de DTT 1mM e KCl 50mM. Foram utilizados 12 ml do tampão de extração para 18 cotilédones, independente de seu peso. O material foi sempre mantido a baixa temperatura (em torno de 0°C) utilizando-se para isto recipientes de isopor com gelo. O homogeneizado assim obtido foi centrifugado a 10 000g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado e filtrado em gaze. Alíquotas de 3 ml foram dessalinizadas em coluna de Sephadex G25 (12x1,5cm) equilibrada previamente com o tampão de extração. A fração protéica coletada (6ml) foi utilizada para as diversas avaliações de atividade enzimática e mantida sempre em recipiente de isopor com gelo.

4.3.2. ENSAIO DA ENZIMA ALANTOINASE

A dosagem de atividade da enzima ALNase (alantoinase EC 3.5.2.5) foi levada a efeito avaliando-se a formação do produto ácido alantóico a partir de alantoína, utilizando-se o método descrito por VOGELS e VAN DER DRIFT (1970) cujo esquema de reação é o seguinte:

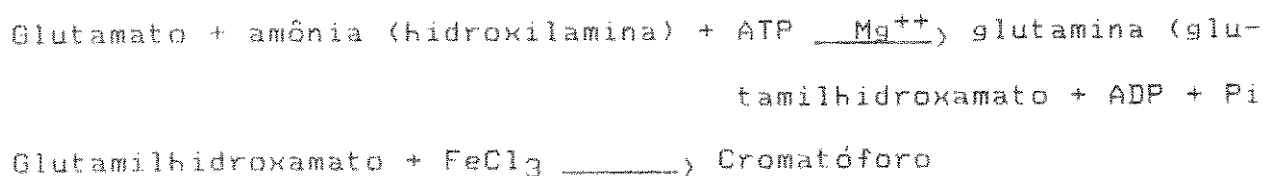
Ac. alantóico HCl, uréia + glioxilato Fenilhidrazina, derivado de hidrazina K₃Fe(CN)₆, cromatóforo.

O ensaio foi preparado com uma alíquota do extrato dessalinizado acrescido de solução de alantoína 10mM e tampão TrisHCl 50mM, pH 8,0, em volume final de 2 ml. A mistura foi incubada em banho maria a 30°, C e no intervalo de 30 minutos retirada uma alíquota de 0,2 ml e misturada com 0,05 ml de HCl 0,65N e 1,0 ml de água destilada. A seguir os tubos foram colocados em banho maria fervente por 4 minutos. Após resfriamento adicionou-se 0,25 ml de tampão fostato pH 7,0, 0,25 ml de fenilhidrazina 0,33% e os tubos foram levados a recipiente com gelo onde foram acrescidos de 1,25 ml de HCl concentrado, à temperatura de 0° C, e finalmente 0,25 ml de ferricianeto de potássio à temperatura ambiente. A leitura da absorbância da solução foi realizada pelo menos 15 minutos após, em espectrofotômetro a 535 nm. Os valores de atividade foram expressos em umoles de ácido alantóico por co-

tilédone por hora, usando-se um padrão na faixa de concentração de 100 nmoles.

4.3.3. ENSAIO DA ENZIMA GLUTAMINA SINTETASE

A avaliação de atividade da enzima GS (glutamina sintetase EC 6,3,1,2) foi levada a efeito de acordo com o método proposto por RHODES et al (1975). A estimativa de atividade foi feita pela medida da formação de glutamilhidroxamato (reação sintetase) partindo-se dos substratos glutamato e hidroxilamina. Este último reagente foi utilizado para substituir a amônia, como mostra o esquema que segue:

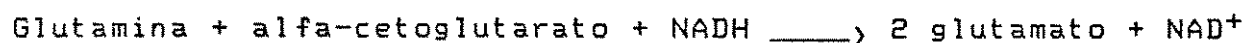


O ensaio foi preparado com uma alíquota do extrato dessalinizado e mantido a 0° C, acrescido de solução de ATP 6,25mM, MgCl 56,25mM, hidroxilaminaHCl 6,25mM, L-glutamato 93,75mM e tampão imidazol 50mM pH 7,2 em volume final de 1,6 ml. O meio de reação foi incubado em banho maria a uma temperatura de 30° C. Em intervalos de 10 e 20 minutos foram retiradas alíquotas de 0,4 ml e acrescidas de 0,6 ml do reagente contendo HCl 0,67N, ácido tricloroacético 0,20M e FeCl₃ 0,37M, de acordo com a pro-

posição de FERGUSON e SIMS (1971). Com este procedimento a reação foi paralisada e obteve-se a formação do composto responsável pela coloração do ensaio. As amostras foram então centrifugadas a 800g durante 5 minutos com a consequente remoção das proteínas precipitadas. A seguir foi avaliada a quantidade de glutamilhidroxamato formada, em espectrofotômetro usando o comprimento de onda 535 nm para as leituras de absorbância. O resultado foi expresso em umoles do produto formado por cotilédone por hora, levando-se em consideração que 1 umol de glutamilhidroxamato nas condições do ensaio mostra uma absorbância de 0,34 (MORI, 1981).

4.3.4. ENSAIO DA ENZIMA GOGAT

A atividade da enzima GOGAT (glutamina-oxoglutarato-amidatransferase EC 2.6.1.5.3.) foi avaliada pelo método proposto por DOUGAL (1974). A quantificação é feita pela medida do NADH oxidado durante a reação na presença dos substratos glutamina e alfa-cetoglutarato, de acordo com o esquema que segue:



O meio de reação para o ensaio da enzima foi preparado com glutamina 5mM, NADH 0,1mM, tampão TrisHCl 50mM pH 7,0 e uma alíquota do extrato dessalinizado. O volume final do ensaio foi de 3,0 ml. A reação foi acompanhada fazendo-se medidas

de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm a intervalos de 15 e 30 minutos. Os tubos de ensaio foram mantidos em banho maria a 30° C. A atividade da enzima foi avaliada calculando-se a taxa de oxidação do NADH cujo coeficiente de oxidação é o seguinte

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

A atividade foi expressa em umoles de NADH oxidado por cotilédone por hora.

4.3.5. ENSAIO DA ENZIMA ASPARAGINASE

Para avaliação da enzima ASNase (asparaginase EC 3.5.1.1) foi utilizado o método radiométrico descrito por SODEK et al (1988). O meio de reação consiste de uma alíquota do extrato dessalinizado contendo a enzima acrescido 0,07 uCi de ¹⁴C-asparagina 10 mM e KCl 50 mM num volume final de 150 ul. O produto da reação, ¹⁴C-aspartato, foi separado posteriormente por cromatografia em camada fina.

O ensaio foi levado a efeito em microtubos de centrífuga de polipropileno e a reação foi interrompida pela imersão dos tubos em banho maria fervente por 5 minutos. Posteriormente os tubos foram centrifugados a fim de remover do ensaio a proteína precipitada. Antes da centrifugação o ensaio foi acrescido de

2 μ l de sulfato de amônio 20% com a finalidade de obter manchas compactas no cromatograma. Uma alíquota de 30 μ l foi então aplicada em placa de cromatografia contendo uma camada da mistura de celulose e sílica na proporção de 10:4 com 500 μ m de espessura. O solvente para resolução do cromatograma foi preparado em fenol e água na proporção 80:20 p/v de acordo com TURNER e REDGWELL (1966). A revelação do cromatograma para localização dos aminoácidos (ASP e ASN) foi feita pulverizando-se a placa com reagente fluorescente (não destrutivo) e observada sob luz ultravioleta (ver 4.3.5.2.). A área correspondente ao aspartato (e às vezes asparagina) marcada sob luz ultravioleta (figura 08), foi retirada coletando-se o pó num disco de fibra de vidro de tipo Whatman GF/C, com o auxílio de um dispositivo de sucção de acordo com a descrição feita por DAVIES e MIFLIN (1978). O disco foi então introduzido em frasco de cintilação contendo 5 ml da mistura cintiladora preparada com 4 g de PPO e 100 mg de POPOP em 1 litro de tolueno. A contagem da radioatividade foi realizada em contador de cintilação líquida (Beckman LS-100C). A atividade da enzima foi expressa em umoles de aspartato transformado por cotilédone por hora, efetuando-se a conversão de cpm em umoles através da atividade específica do substrato marcado (50 000 cpm/ μ mol de ASN).

4.3.5.1. PURIFICAÇÃO DE (^{14}C) ASPARAGINA

Fontes comerciais de asparagina, tanto marcada como não, contem ácido aspártico como impureza. As quantidades presentes, embora pequenas, são suficientes para acarretar um "branco" alto no ensaio. Por este motivo, asparagina foi purificada para uso nos ensaios. Utilizou-se o procedimento descrito por SO-DEK (1980).

Dowex-1 (200-400 malhas) foi suspenso em NaOH 2M e lavado com água destilada até pH neutro. Em seguida, a resina foi suspensa em ácido acético 2N, e compactada numa coluna de 1,0cm até uma altura de 3cm. Após lavagem com água, foram percolados 50ml de acetato de sódio a 10% através da coluna. O excesso de acetato de sódio foi eliminado lavando-se a resina com água.

Dissolveu-se 50 μC de ^{14}C -asparagina (105mCi/mmole) em 1 ml de água destilada, mais 1 mg de asparagina não marcada como carregador. Após passagem pela coluna de Dowex-1-acetato, a asparagina foi coletada em volume de 5 ml. Acrescentou-se a esta solução 100 mg de asparagina purificada não marcada e etanol suficiente para tornar a solução um pouco turva. Após dois dias a 4°C, os cristais foram coletados, lavados duas vezes com etanol absoluto, duas vezes com eter etílico e secos ao ar. A análise por cromatografia em camada fina da preparação final revelou a ausência total de ácido aspartico, pelo menos quando aplicados em concentrações de onde a asparagina não purificada produz uma mancha evidente.

A análise do produto final revelou uma atividade de 50 000 cpm/umole, isto é, após ter sido realizada a cromatografia e contagem da mesma maneira descrita para o ensaio.

4.3.5.2. REAGENTE FLUORESCENTE

O reagente não destrutivo empregado para localizar aminoácidos marcados (ensaio de asparaginase) foi preparado segundo DAVIES e MIFLIN (1978). Foram dissolvidos 20 mg de o-ftalaldeído em 2 ml de etanol, juntando-se em seguida 25 ml de borato de sódio 50 mM. Antes do uso, foram adicionadas 5 gotas de 2-mercaptoetanol.

As placas foram pulverizadas levemente com o reagente e examinadas na luz ultra-violeta (253nm). As manchas fluorescentes de aminoácidos destacam-se do fundo escuro.

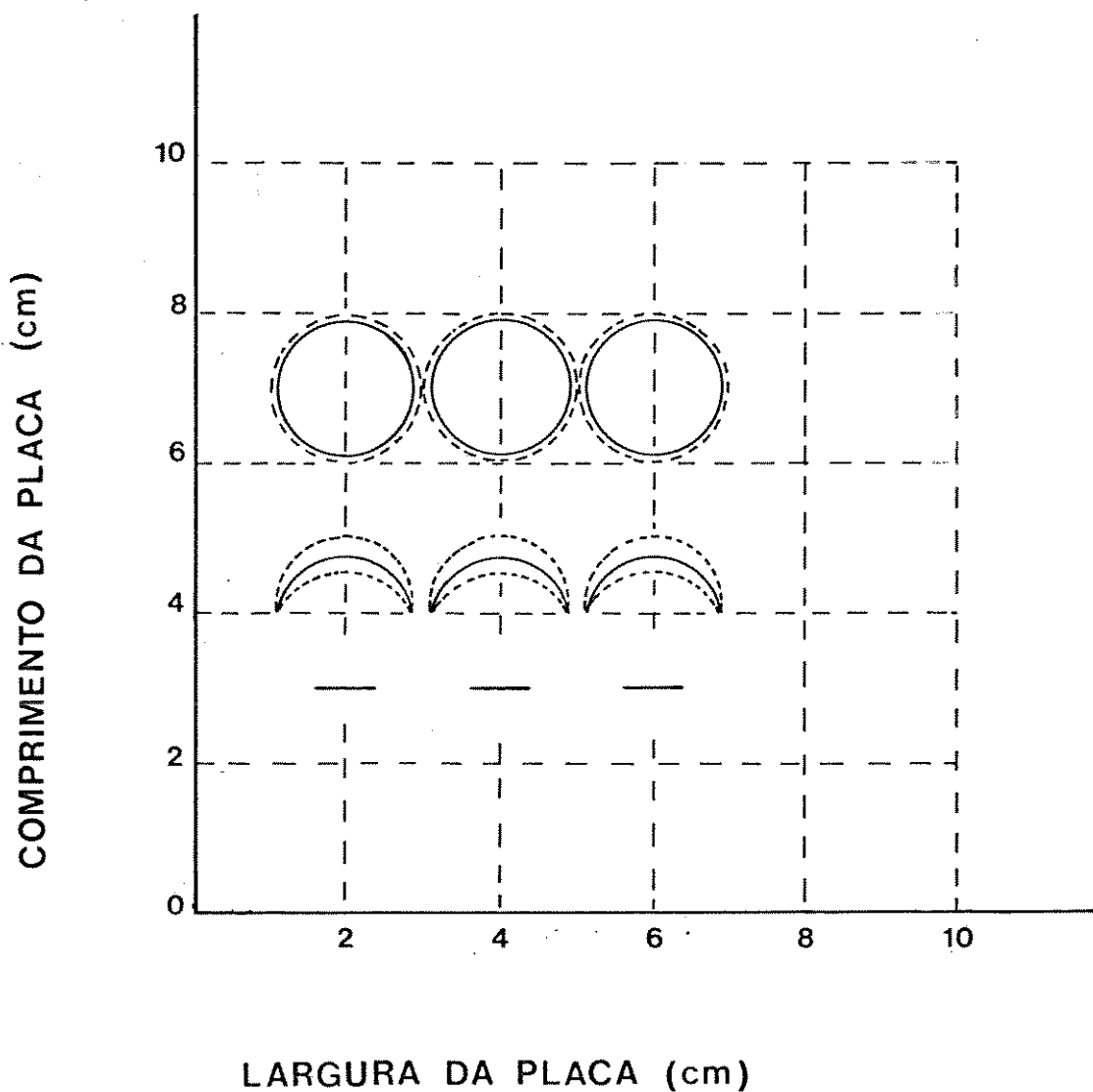


Figura 08. Reprodução esquemática da placa de cromatografia em camada fina após a revelação. A área marcada com o sinal  corresponde ao aspartato sob luz ultravioleta, o círculo contínuo corresponde à localização de ASN. A área marcada com linha pontilhada corresponde a área retirada pela coleta do pó.

5. RESULTADOS

5.1. PESO FRESCO, CONCENTRAÇÃO DE UREÍDEOS E AMINOACIDOS LIVRES

De início, com a finalidade de verificar o comportamento do sistema de cultura de cotilédones de soja imaturos, foram feitas avaliações de crescimento dos cotilédones na presença das fontes de nitrogênio a serem estudadas (ALN, ASN, GLN).

Estas medidas eram feitas imediatamente após a separação do tegumento e embrião, no caso de frutos provenientes de plantas ou imediatamente após o processo de lavagem, quando o material provinha das culturas *in vitro*.

Os resultados de peso fresco podem ser observados na figura 09. Como pode-se observar na figura, nos diversos experimentos, partiu-se sempre de cotilédones na faixas de 30-40 mg por cotilédone. Este procedimento justifica-se visto que o tamanho ideal para manutenção de cotilédones imaturos de soja em cultura in vitro proposto por THOMPSON et al (1977) e HAGA (1982) está na faixa de 20 a 80 mg, considerando-se o ganho de matéria seca. O aumento máximo em quantidade de proteína, de acordo com os autores, é verificado quando as culturas dos cotilédones mantidos in vitro partem de uma faixa inicial em torno de 30 mg por cotilédone. Isto porque neste estágio as sementes de soja encontram-se em fase inicial de desenvolvimento e consequentemente de armazenamento de proteína.

O acúmulo de peso fresco ocorre paralelamente ao acúmulo de peso seco e proteína de acordo com os autores.

Como pode-se observar pelos dados apresentados na figura 09 não há diferenças significativas quanto aos resultados de peso da matéria fresca quando a fonte de nitrogênio foi ASN ou GLN. Isto significa que ambas as substâncias são igualmente eficientes como fontes de N para promover o desenvolvimento do cotilédone. No caso de ALN verifica-se que sua eficiência em promover crescimento foi bastante inferior à ASN ou GLN.

Observa-se na mesma figura que houve um aumento progressivo em peso fresco para todas as fontes, o que representa o crescimento dos cotilédones no meio de cultura durante o período estudado. É conhecido, que para este sistema o aumento em peso

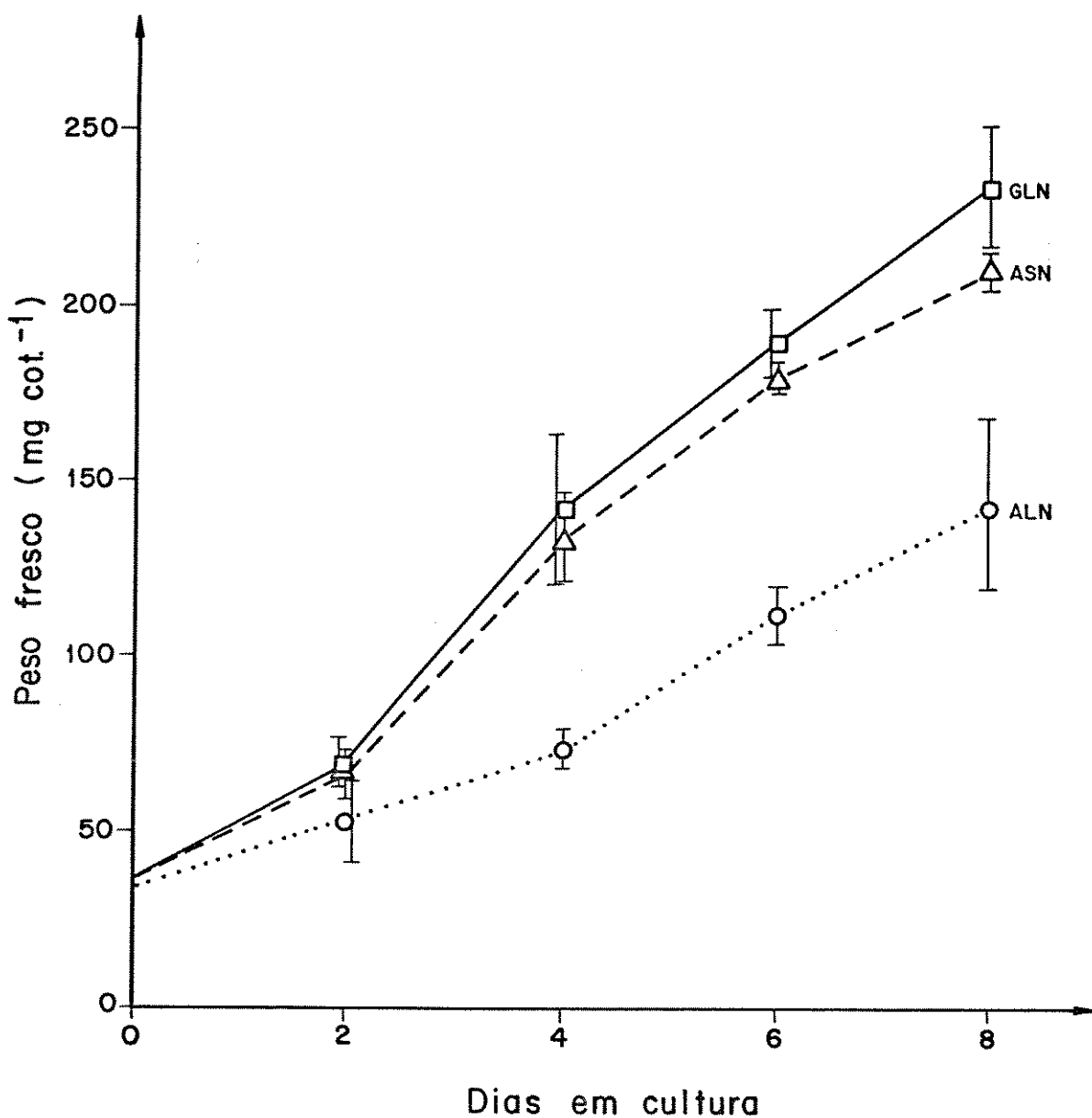


Figura 09. Medidas de peso da matéria fresca de cotilédones de soja em cultura tendo como fonte de nitrogênio ALN, ASN ou GLN. Os valores com seus respectivos E.P., representam médias de 3 experimentos. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento.

fresco é acompanhado por aumentos proporcionais em peso seco e proteína (THOMPSON et al, 1977; SKOKUT et al, 1982; HAGA e SODEK, 1987).

Na figura 10 estão apresentados os resultados das medidas de acompanhamento de peso fresco dos cotilédones mantidos em cultura e dos cotilédones mantidos nas plantas (mesmo lote que originou os cotilédones em cultura).

Pode-se observar que os cotilédones mantidos em cultura empregando ASN como fonte de N, tem um desenvolvimento mais rápido do que àquele observado nos cotilédones mantidos nas plantas. Tais dados demonstram uma alta eficiência do sistema de cultura de cotilédones e que o sistema estava plenamente satisfatório para o estudo pretendido.

Para verificar a ocorrência de variação no conteúdo de ureídeos do cotilédone em função da fonte de N, foram feitas análises de acompanhamento a cada dois dias no período em que os cotilédones foram mantidos em cultura.

Na figura 11 são apresentados os dados do teor de ureídeos em umoles por cotilédone.

Como pode-se observar há um aumento rápido, no nível de ureídeos nos primeiros dias da cultura, qualquer que seja a fonte exógena de nitrogênio. Após esse período onde ocorre um aumento segue-se um período onde há pequenas flutuações dentro dos níveis alcançados, com poucas diferenças dentro das concentrações alcançadas no segundo dia, com qualquer uma das fontes de nitrogênio consideradas. Apesar do perfil semelhante das curvas

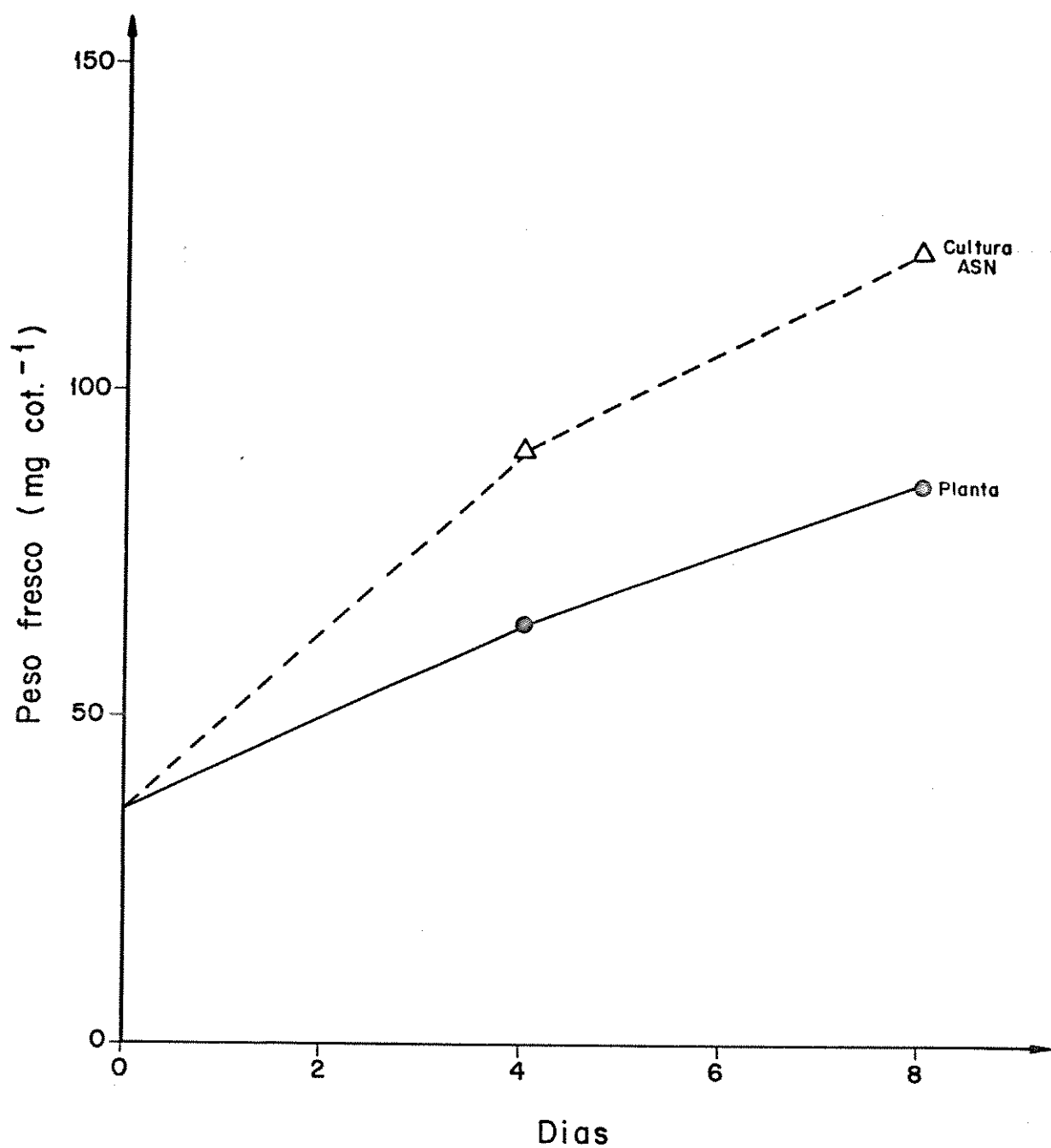


Figura 10. Medidas de peso da matéria fresca de cotilédones de soja mantidos na planta e em cultura tendo como fonte de N ASN. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento.

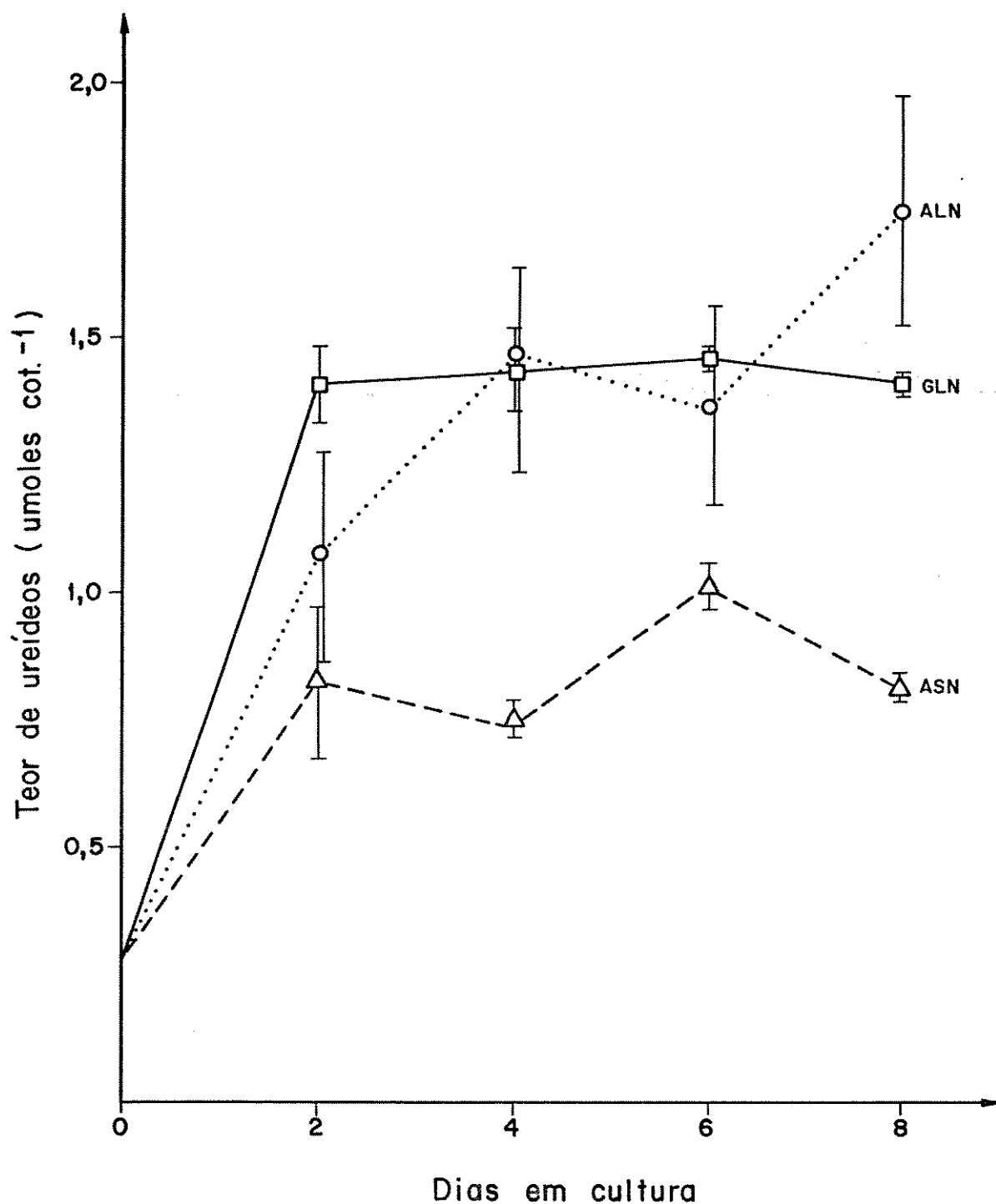


Figura 11. Teor de ureídeos em extratos de cotilédones de soja em cultura tendo como fonte de nitrogênio ALN, ASN ou GLN. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento com peso fresco de cerca de 35 mg cot.^{-1} . (Barras = E.P.).

para cada fonte, em termos absolutos o aumento observado na presença de ASN foi nitidamente inferior àquele de GLN e ALN. As curvas muito próximas para GLN e ALN apontam um aspecto interessante visto que o desenvolvimento dos cotilédones com ALN foi inferior ao de GLN (figura 09).

A quantificação dos aminoácidos solúveis presentes nos cotilédones durante o transcurso das culturas *in vitro* é apresentada na figura 12. Estes resultados proporcionaram curvas de tendências diversificadas para as diferentes fontes de nitrogênio. Pode-se verificar que quando a fonte de nitrogênio foi GLN a curva aumenta até o quarto dia, estabilizando-se nos dias subsequentes. Para ASN há uma linearidade em praticamente todo o período acompanhado. Para ALN, observa-se que o teor de aminoácidos livres nos cotilédones em cultura permaneceu mais ou menos constante até o quarto dia. A seguir iniciou-se um aumento bastante acentuado até o final do experimento (dia 8). Apesar das formas diferentes das curvas, no final do experimento o teor de aminoácidos livres foi semelhante para todas as três fontes de nitrogênio.

As curvas de variação no teor de aminoácidos acompanharam melhor as curvas de peso fresco do que aquelas de ureídeos. Os aminoácidos encontradas nas sementes de soja em desenvolvimento são o resultado de uma ampla metabolização dos aminoácidos e ureídeos que normalmente chegam aos tecidos cotiledonares. No caso de culturas *in vitro* estes processos estão na dependência direta da fonte de N fornecida ao meio de cultura.

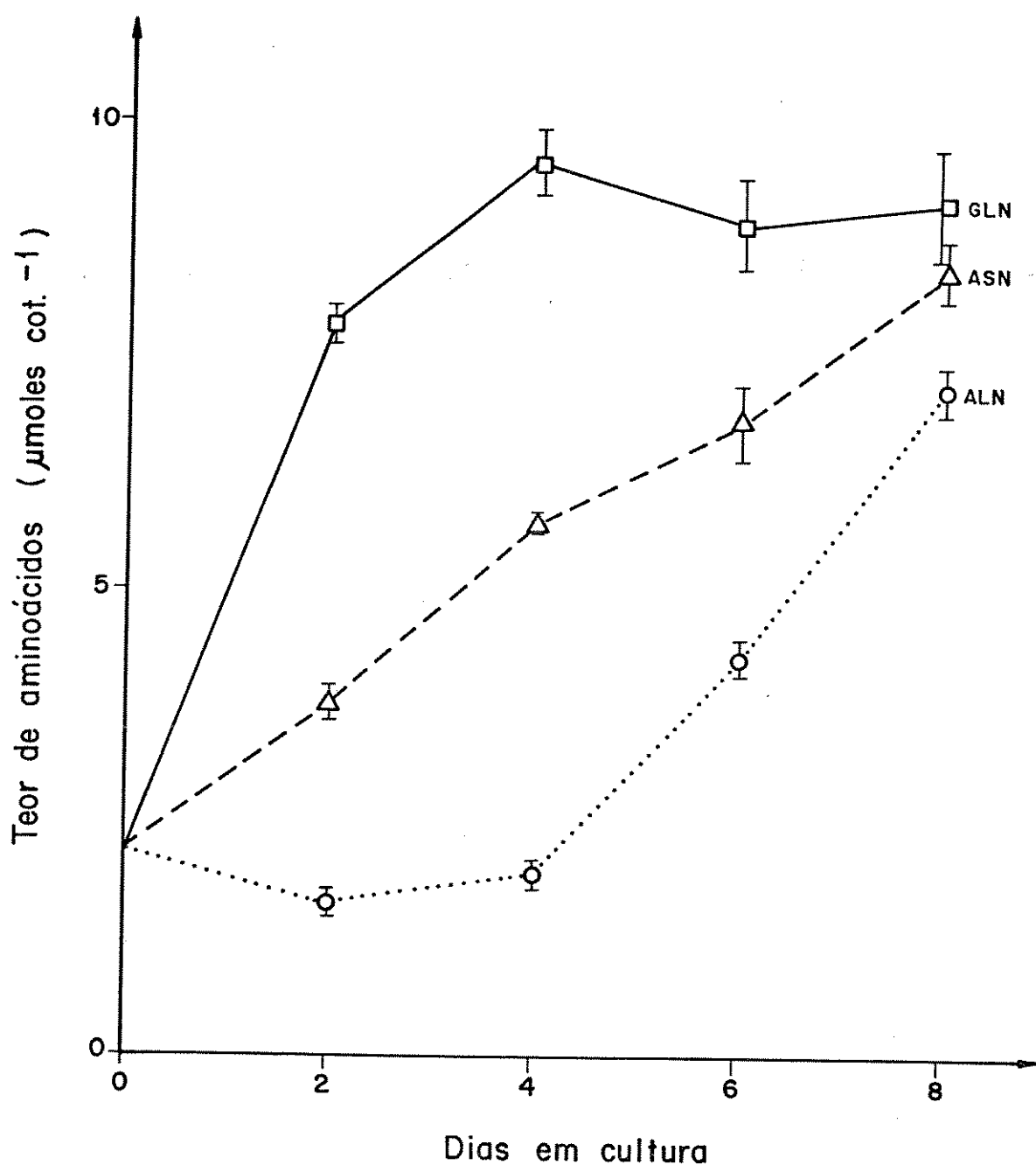


Figura 12. Teor de aminoácidos em cotilédones de soja em cultura tendo como fonte de nitrogênio ALN, ASN ou GLN. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento com peso fresco de cerca de 35 mg cot.⁻¹. (Barras = E.P.).

Fazendo-se uma relação entre as figuras 09 e as figuras 11 e 12 pode-se apontar para um indicativo de que no período imediato que segue a transferência dos cotilédones para o meio de cultura, seus mecanismos de absorção e metabolização não estariam aptos ainda a utilizar eficientemente ureídeos como fonte única de nitrogênio exógeno. Este processo ir-se-ia regularizando gradativamente e se estabeleceria com eficiência razoável a partir do segundo e quarto dias da cultura. A partir deste ponto iniciar-se-ia uma fase gradativa de crescimento. Quando a fonte nitrogenada é ASN ou GLN, parece que as etapas preliminares de adaptação e estabelecimento das culturas seriam mais brandas.

Os resultados apresentados aqui estão de acordo com os obtidos por HAGA (1982) em estudos realizados com cotilédones de soja em cultura. Os resultados apresentados pelo autor demonstraram uma taxa baixa de acúmulo tanto de matéria seca quanto de proteína no estágio inicial de estabelecimento das culturas independente da fonte nitrogenada.

5.2. ATIVIDADE DE ALANTOINASE

Na figura 13 estão sendo apresentados os resultados obtidos com medidas de atividade da enzima alantoinase nas culturas *in vitro* tendo como fonte de nitrogênio ALN, ASN ou GLN. Pode-se observar que o padrão de atividade da enzima é crescente durante os 8 dias do experimento, para todas as três fontes

nitrogenadas. Basicamente as curvas são idênticas quando as fontes são as amidas ASN ou GLN. Há uma pequena diferença quando a fonte nitrogenada é ALN, embora na impossibilidade de aplicar estatística permaneça a dúvida se esta diferença é significativa ou não. Entretanto, considerando-se que o desenvolvimento dos cotilédones na presença de ALN é bastante reduzido em relação às outras fontes (figura 09), a atividade de alantoinase, se fosse baseada em peso da matéria fresca, seria bem mais elevada na presença de ALN como fonte. Por outro lado, dada a coincidência das curvas na figura 13 (atividade/cotilédone) é possível que os aumentos em atividade sejam independentes do crescimento (dentro de limites), e que os aumentos na atividade da enzima também independam da fonte nitrogenada.

Para averiguar se a atividade crescente observada nos cotilédones em cultura reflete a situação existente nos frutos *in situ*, fez-se também a dosagem da enzima em cotilédones cultivados *in vitro* com uma das fontes (ASN) e simultaneamente foi feito um acompanhamento da atividade *in situ* com o mesmo lote de plantas que originou os cotilédones em cultura.

As medidas foram realizadas nos dias zero, 4 e 8 após o início das culturas. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento onde os cotilédones apresentavam aproximadamente 35 mg de peso fresco por cotilédone.

Os resultados deste experimento estão sendo apresentados na figura 14.

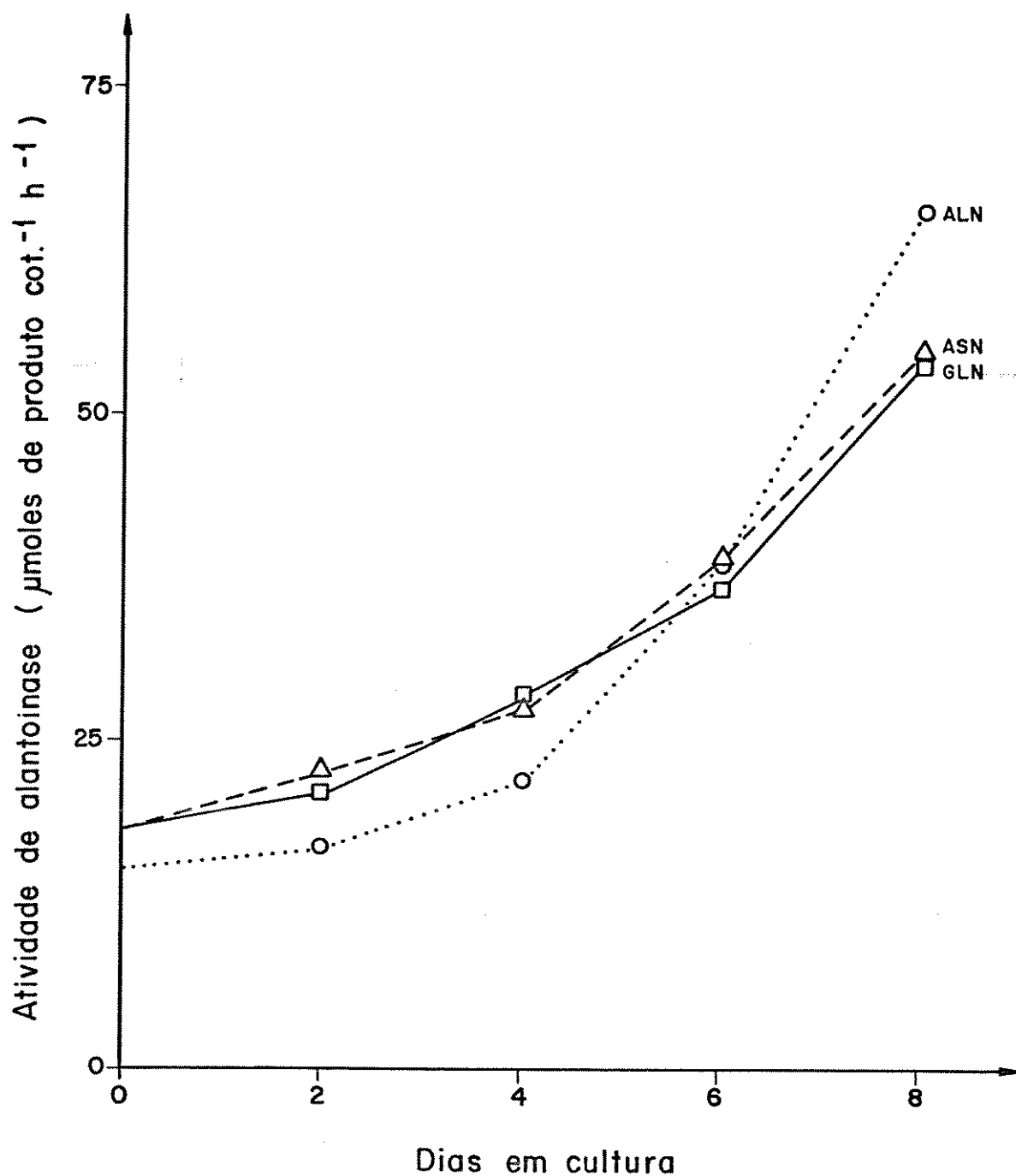


Figura 13. Medidas de atividade da enzima alantoinase em extratos de cotilédones de soja em cultura tendo como fonte de nitrogênio ALN, ASN ou GLN. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento com peso fresco de cerca de 35 mg cot.⁻¹.

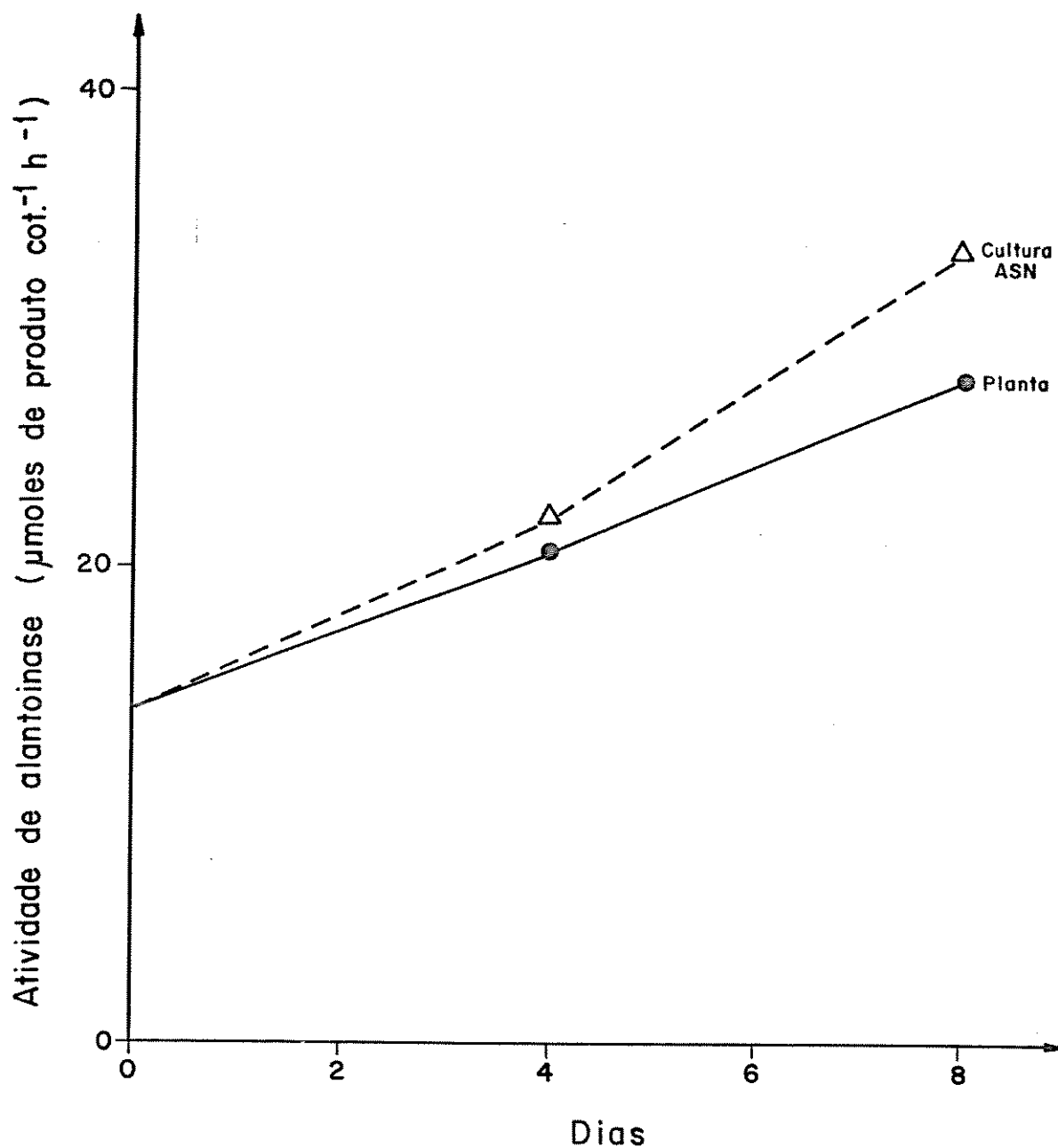


Figura 14. Medidas de atividade da enzima alantoinase em extratos de cotilédones de soja mantidos na planta ou em cultura tendo como fonte de nitrogênio ASN. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento com peso fresco de cerca de 35 mg cot.⁻¹.

Analizando-se a figura, pode-se verificar que o padrão de atividade da enzima alantoinase dos cotilédones cultivados *in vitro* é crescente, como no experimento anterior, embora o aumento tenha sido menor. Isto pode ter sido influenciado por vários fatores, entre os quais, idades fisiológicas diferentes dos cotilédones e plantas cultivados em épocas diferentes.

5.3. ATIVIDADE DE GLUTAMINA SINTETASE

As avaliações de atividade da enzima GS foram efetuadas a partir dos extratos dessalinizados de cotilédones conforme descrito anteriormente (4.3.3).

Na figura 15 estão sendo apresentados, graficamente, os resultados das medidas de atividade da enzima GS nas culturas *in vitro* tendo como fonte nitrogenada ALN, ASN ou GLN.

Pode-se verificar que o padrão de atividade da enzima, quando a fonte nitrogenada é ALN, ASN ou GLN é basicamente o mesmo. A atividade aumenta durante os 8 dias da cultura, de um valor em torno de 0,6 μmol . de produto por hora para cerca de 2,0 μmol . O aumento foi mais acentuado entre os dias 4 e 6. A partir do 6º dia o nível de atividade se mostrou praticamente constante com qualquer uma das fontes, conferindo aos gráficos um padrão sigmoidal.

Estes resultados podem ser correlacionados com os dados de peso fresco da figura 09. Os valores de atividade quando a fonte nitrogenada é ALN, podem então ser considerados proporcionalmente bem mais altos comparados com os de ASN ou GLN. Por outro lado, a coincidência das curvas (figura 15) para glutamina sintetase pode ser interpretada no sentido de que o aumento na atividade desta enzima independe da taxa de crescimento dos cotilédones (pelo menos dentro das faixas observadas nestes experimentos).

Na figura 16 estão sendo apresentados graficamente, os resultados das avaliações de atividade da enzima em extratos de cotilédones mantidos *in vitro* tendo como fonte de nitrogênio ASN e de cotilédones mantidos *in situ* do mesmo lote de plantas que originou os cotilédones em cultura. Os pontos indicam as medidas efetuadas no dia zero da cultura *in vitro* (cotilédones na faixa de aproximadamente 35 mg por cotilédone), no 49 e 89 dias.

Pode-se observar que o padrão de atividade para ambos os gráficos é crescente. Este aumento se acentua mais intensamente a partir do 49 dia na atividade da enzima dos cotilédones mantidos *in vitro*, atingindo um valor de atividade duas vezes maior que o dos cotilédones mantidos na planta no 89 dia. Isto sugere que o aumento em atividade obtido em cultura tende a aumentar acima do normal.

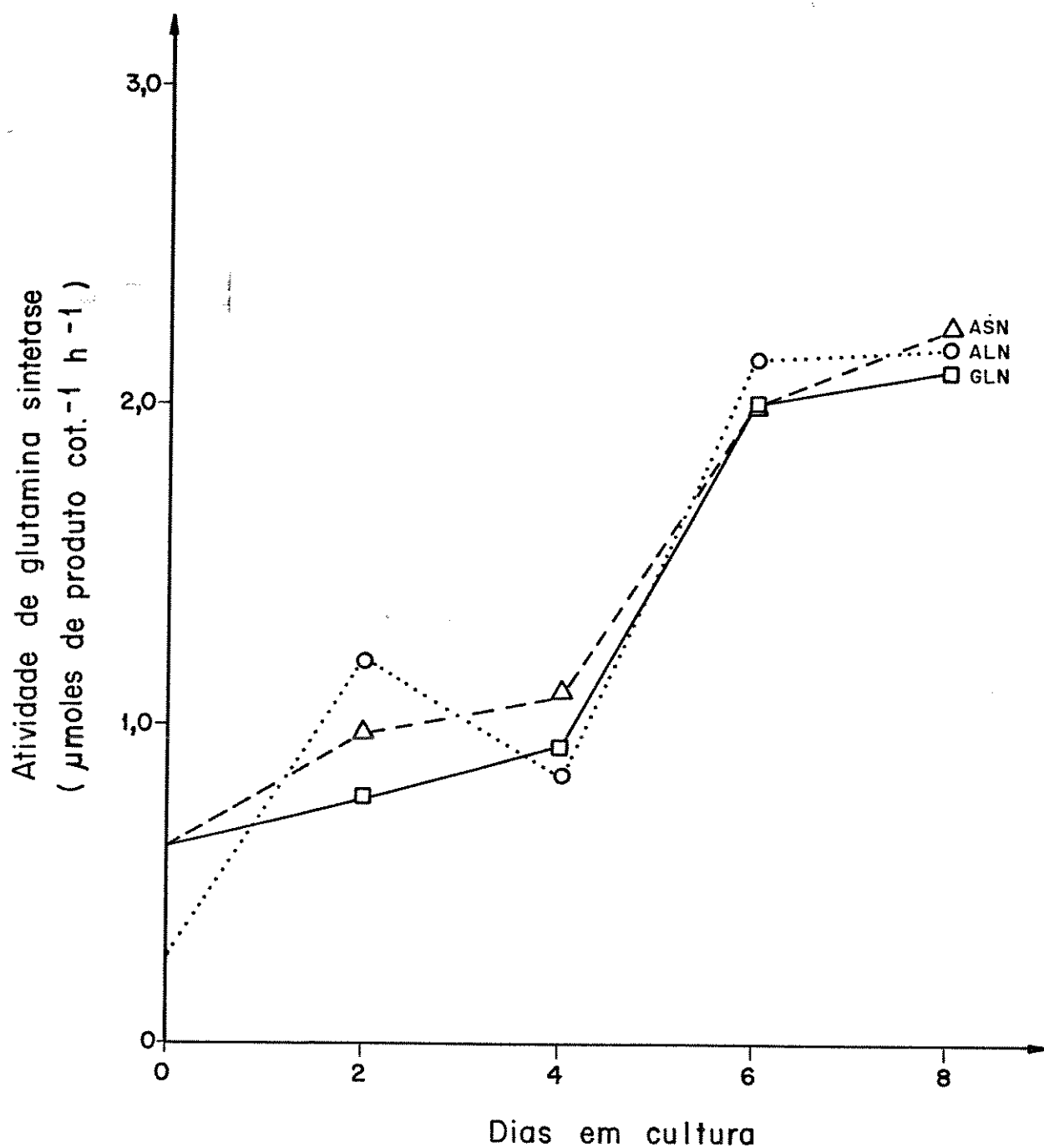


Figura 15. Medidas de atividade da enzima GS em extratos de cotilédones de soja em cultura tendo como fonte de nitrogênio ALN, ASN ou GLN. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento com peso frsco de cerca de 35 mg cot.⁻¹.

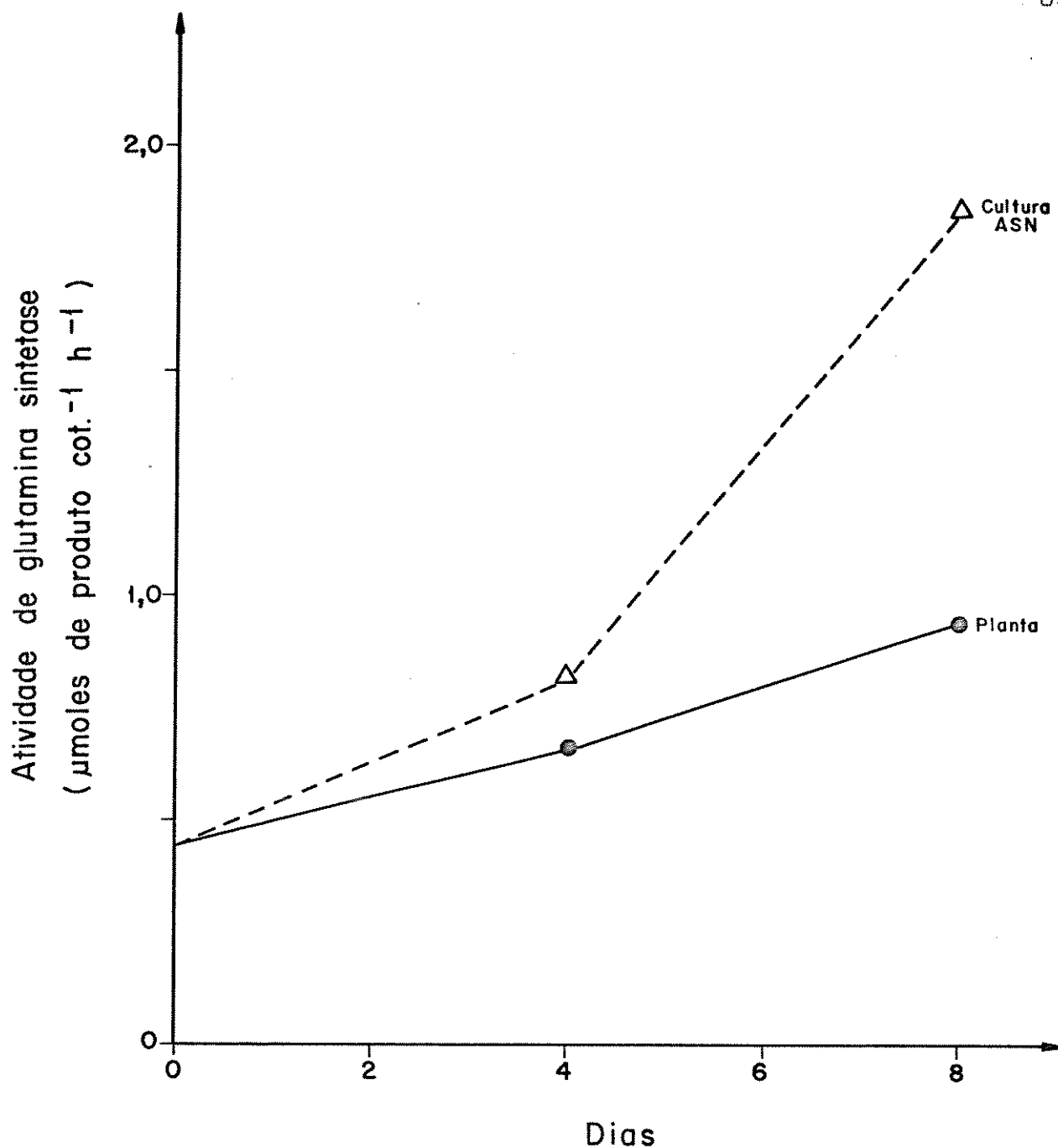


Figura 16. Medidas de atividade da enzima GS em extratos de cotilédones de soja, mantidos nas plantas ou em cultura tendo como fonte de nitrogênio ASN. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento com peso fresco de cerca de 35 mg cot.⁻¹.

5.4. ATIVIDADE DE GLUTAMATO SINTASE

A atividade da enzima glutamato sintase ou oxoglutarato amidotransferase (GOGAT), foi avaliada a partir de extratos dessalinizados de cotilédones de soja, como descrito em 4.3.4.

Na figura 17 estão apresentados, graficamente, os resultados obtidos com extratos de cotilédones mantidos em cultura *in vitro* com as fontes nitrogenadas ALN, ASN ou GLN.

Pode-se observar, nos gráficos apresentados, que o padrão de atividade apresentado pela enzima GOGAT, é bastante semelhante, quando a fonte nitrogenada foi ASN ou GLN. A atividade foi crescente durante o período, com um aumento acentuado a partir do 40 dia em cultura, para ambas as fontes. Quando a fonte foi ALN o padrão de atividade também tende a aumentar, mas com níveis de atividade bastante inferiores às outras duas fontes.

Na figura 18 estão sendo apresentados os resultados obtidos na avaliação de atividade da enzima GOGAT, fazendo um paralelo entre cotilédones mantidos em cultura *in vitro* e cotilédones de frutos mantidos nas plantas (mesmo lote que originou os cotilédones das culturas). As medidas de atividade foram efetuadas no dia zero da cultura *in vitro* (cotilédones na faixa de aproximadamente 35 mg por cotilédone), no 40 e 80 dia da manutenção das culturas.

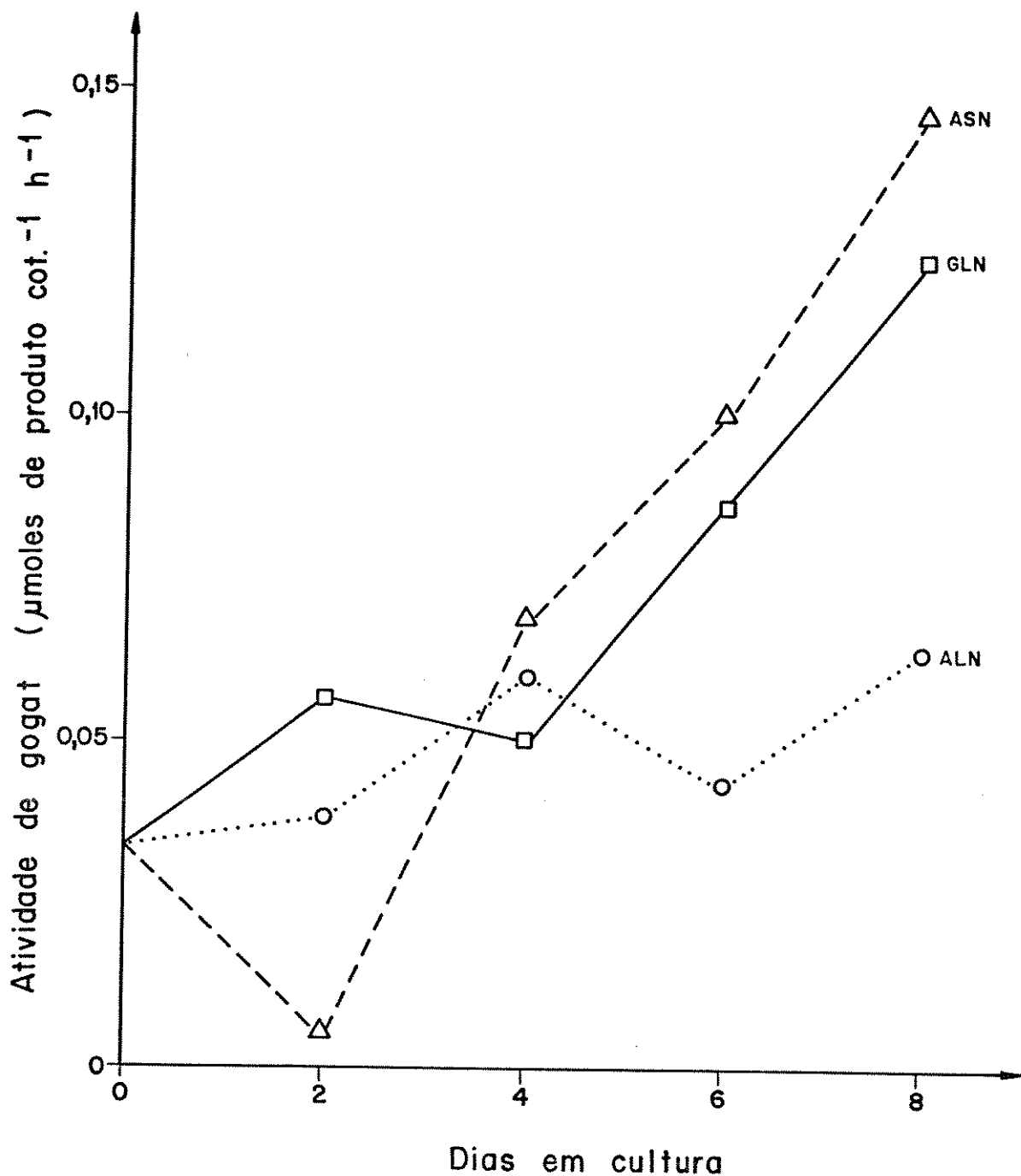


Figura 17. Medidas de atividade da enzima GOGAT em extratos de cotilédones de soja mantidos em cultura tendo como fonte nitrogenada ALN, ASN ou GLN. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento com peso fresco de cerca de 35 mg cot.⁻¹.

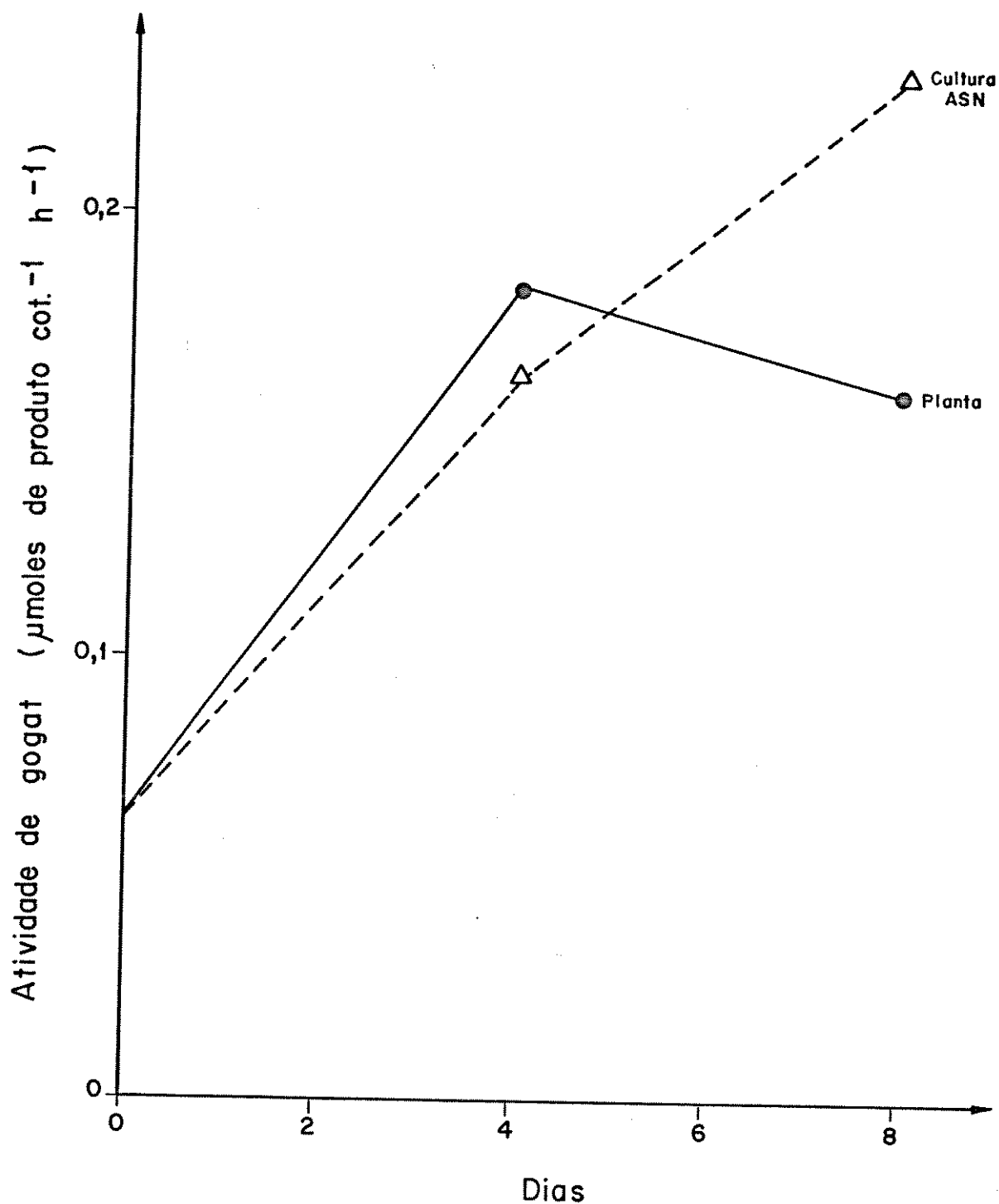


Figura 18. Medidas de atividade da enzima GOGAT em extratos de cotilédones de soja mantidos nas plantas ou em cultura tendo como fonte nitrogenada ASN. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento com peso fresco de cerca de 35 mg cot.⁻¹.

Pelos resultados obtidos podemos verificar que o padrão de atividade da enzima é crescente nos extratos de cotilédones em cultura até o 8º dia.

No caso de cotilédones mantidos nas plantas o padrão de atividade da enzima aumenta até o 4º dia e se mantém neste nível até o 8º dia. Isto demonstra que o padrão de atividade da enzima GOGAT nos cotilédones em cultura é bastante semelhante àquele de cotilédones mantidos *in situ*, até o 4º dia, pelo menos. Depois do 4º dia, a atividade encontrada nas culturas tende a ser acima do normal, como foi observado para glutamina sintetase, embora de forma menos acentuada.

5.5. ATIVIDADE DE ASPARAGINASE

As avaliações de atividade da enzima foram feitas a partir de extratos dessalinizados de cotilédones de soja, de acordo com a metodologia descrita em 4.3.5.

Na figura 19 estão apresentados os valores de atividade obtidos de extratos de cotilédones mantidos nas culturas *in vitro* tendo como fonte única de nitrogênio ALN, ASN ou GLN. Verifica-se que quando a fonte nitrogenada é ASN há um aumento acentuado na atividade da enzima a partir do 2º dia atingindo um pico no 4º dia das culturas. Estes níveis mais altos de atividade se mantem até o 6º dia, decrescendo rapidamente após esse período.

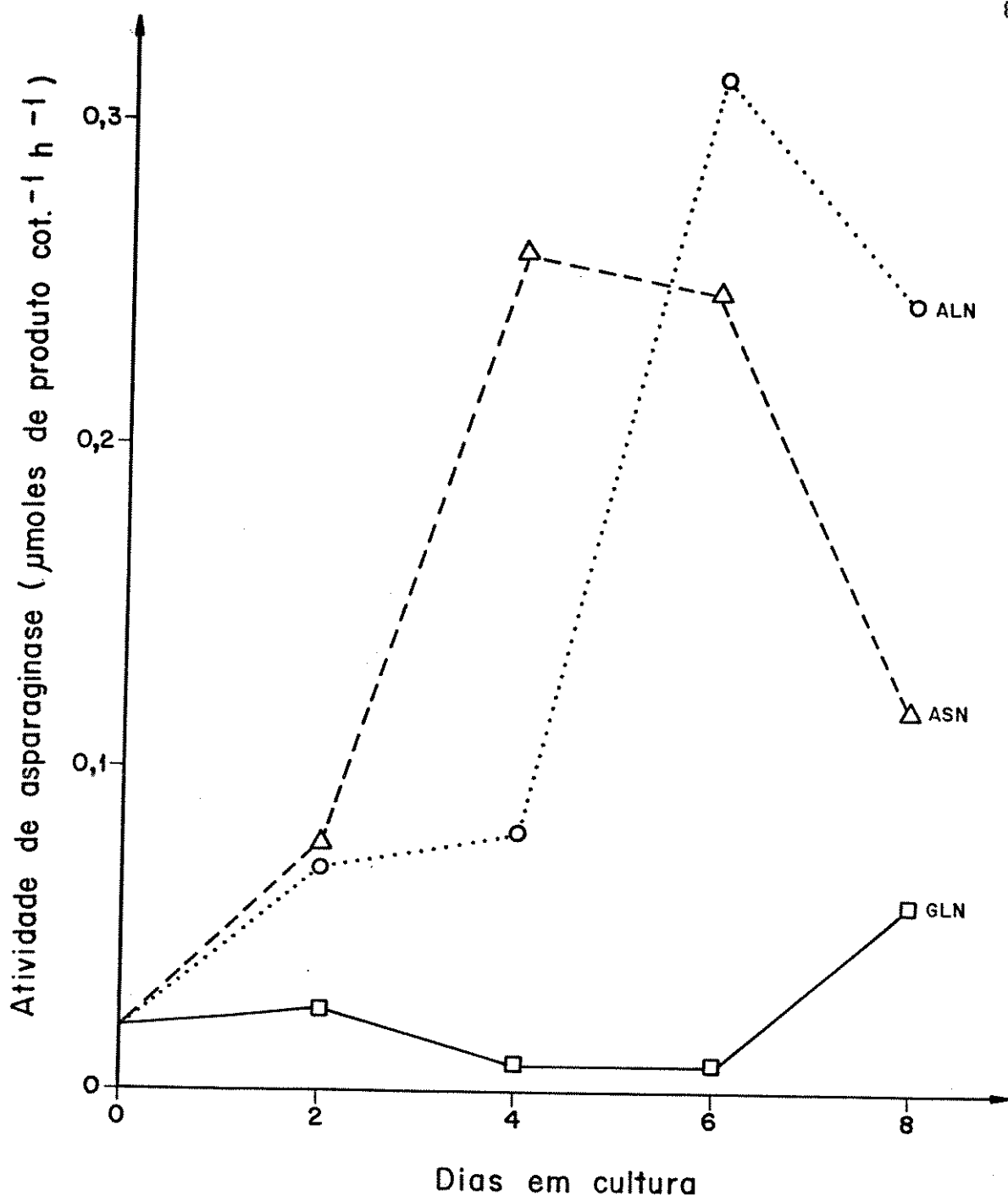


Figura 19. Medidas de atividade da enzima asparaginase em extratos de cotilédones de soja mantidos em cultura tendo como fonte de nitrogênio ALN, ASN ou GLN. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento com peso fresco de cerca de 35 mg cot.⁻¹.

Quando a fonte nitrogenada foi ALN o padrão de atividade da enzima é semelhante ao de ASN, porém com um certo atraso. O aumento de atividade mais acentuado inicia no 40 dia, alcançando o pico no 60 dia. A partir desse ponto, da mesma forma como para ASN, os níveis de atividade começam a decair.

Quando a fonte nitrogenada é GLN verifica-se que o padrão de atividade da enzima é bastante diferente dos demais. A presença de GLN no meio de cultura parece impedir o aumento na atividade de asparaginase desde o início da cultura do cotilédone. A baixa atividade nas culturas *in vitro* com esta fonte se manteve no transcurso de todo o experimento.

Na figura 20 estão apresentados os resultados obtidos na avaliação de atividade de asparaginase em extratos de cotilédones mantidos nas plantas (mesmo lote que originou os cotilédones em cultura) e de cotilédones mantidos em cultura *in vitro* no transcorrer do mesmo período tendo como fonte nitrogenada a amida ASN.

Como podemos observar na figura 20, próximo ao 25º dia após o florescimento, que corresponde ao dia zero da cultura *in vitro*, a atividade da enzima já é passível de ser detectada nos cotilédones, embora com valores ainda baixos. A partir desse ponto há um crescimento de aproximadamente duas vezes o valor inicial nos cotilédones mantidos nas plantas até o 80 dia. Nos cotilédones mantidos na cultura *in vitro* o aumento no crescimento da atividade é bem mais acentuado até o 40 dia, caindo a seguir.

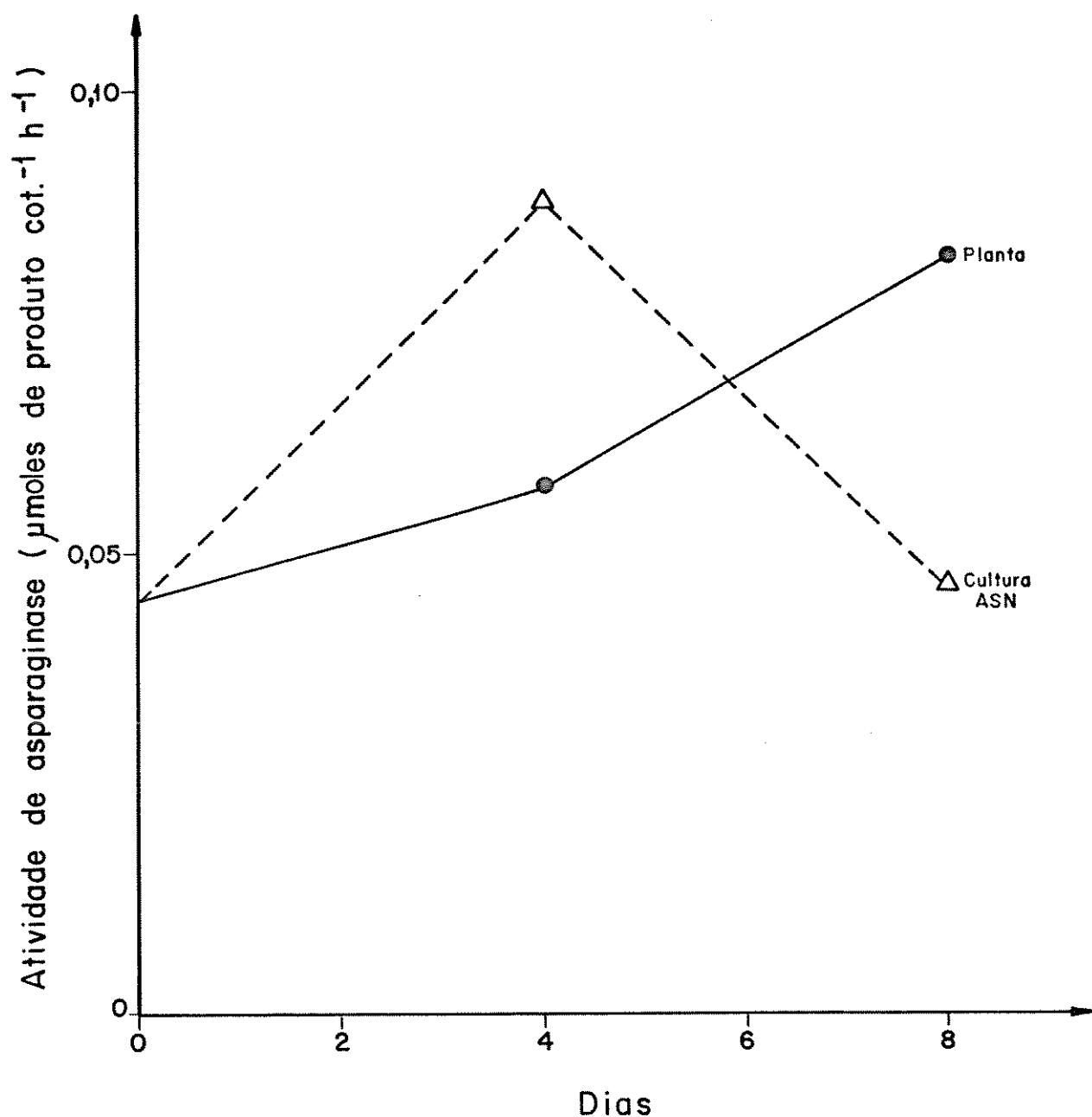


Figura 20. Medidas de atividade da enzima asparaginase em extratos de cotilédones de soja mantidos nas plantas ou em cultura tendo como fonte de nitrogênio ASN. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento com peso fresco de cerca de 35 mg cot.⁻¹.

No 8º dia os níveis de atividade chegam a cair para os níveis iniciais da cultura.

Para confirmar o efeito negativo de GLN sobre a enzima asparaginase, dado ao alto significado deste resultado, realizou-se um novo experimento com avaliações de atividade da enzima apenas nos dias zero e seis da cultura, uma vez que as mudanças mais acentuadas ocorreram nestes pontos. Os resultados são mostrados no histograma da figura 21. Verifica-se que o padrão de atividade da enzima, neste experimento, confirmou os resultados do experimento anterior mostrados na figura 20. Na presença de ALN e ASN houve grande aumento na atividade de asparaginase nos cotilédones, enquanto que na presença de GLN não houve nenhum aumento.

O próximo passo de investigação foi verificar se a presença de glutamina também mostraria efeito negativo sobre a atividade de asparaginase, quando outra fonte nitrogenada estivesse junto.

Neste experimento adicionou-se ao meio de cultura, GLN e ALN juntas e em outro ensaio GLN e ASN, cada uma na metade da concentração normal, para que na soma final a concentração de nitrogênio permanecesse como nos experimentos anteriores. Como pontos de referência foi mantido um tratamento com ASN sozinha na metade da sua concentração normal, um com GLN e outro com ALN nas mesmas condições.

Os resultados deste experimento estão apresentados na figura 22. Na presença de ALN foi observado um aumento acentuado na atividade de asparaginase, após 7 dias da cultura. Entretanto quando GLN estava junto com ALN, a atividade de asparaginase não aumentou, o mesmo também ocorreu na presença de GLN sozinha. Na presença de ASN, a GLN também mostrou efeito negativo sobre asparaginase, visto que as atividades obtidas foram baixas, como no caso de GLN sozinha.

Entretanto os dados obtidos para ASN não foram conclusivos em função da inesperada baixa atividade de asparaginase no controle com ASN sozinha. Isto não havia sido observado nos experimentos anteriores, a não ser no dia 8 de cultivo (figura 20). Possivelmente, a queda em atividade observada no dia 8 (figura 20), por algum motivo, adiantou-se neste experimento.

Em função das deficiências do experimento anterior, foi realizado outro experimento na tentativa de avaliar o efeito de GLN junto com outra fonte de nitrogênio no meio. Foram feitos quatro tratamentos com as seguintes combinações: ASN sozinha na concentração normal, GLN sozinha na concentração normal, ASN na concentração normal adicionada 1/10 da concentração normal de GLN e ASN na concentração normal adicionada de 1/2 da concentração normal de GLN.

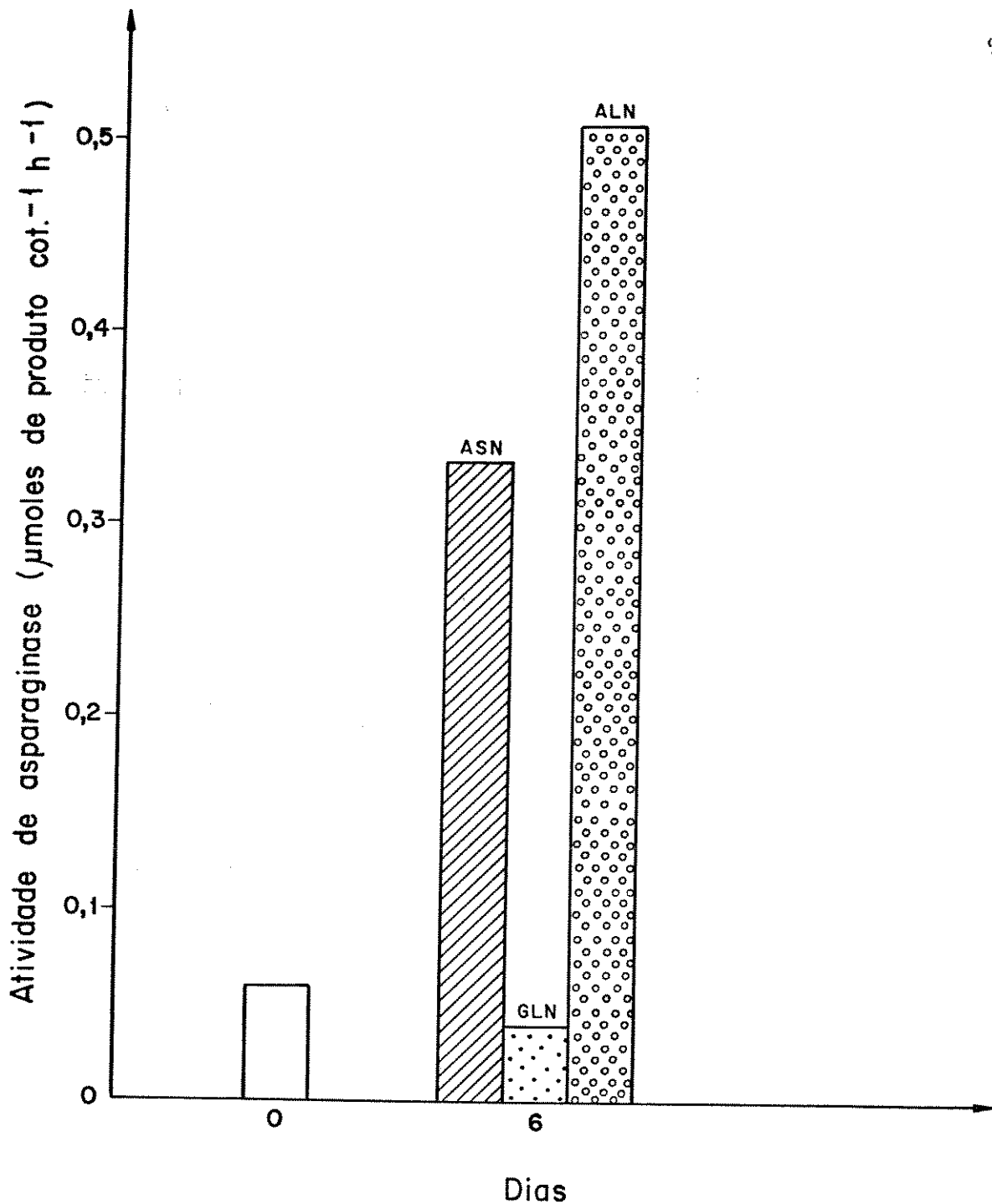


Figura 21. Medidas de atividade da enzima asparaginase em extratos de cotilédones de soja mantidos em cultura tendo como fonte nitrogenada ALN, ASN ou GLN. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento com peso fresco de cerca de 35 mg cot.⁻¹.

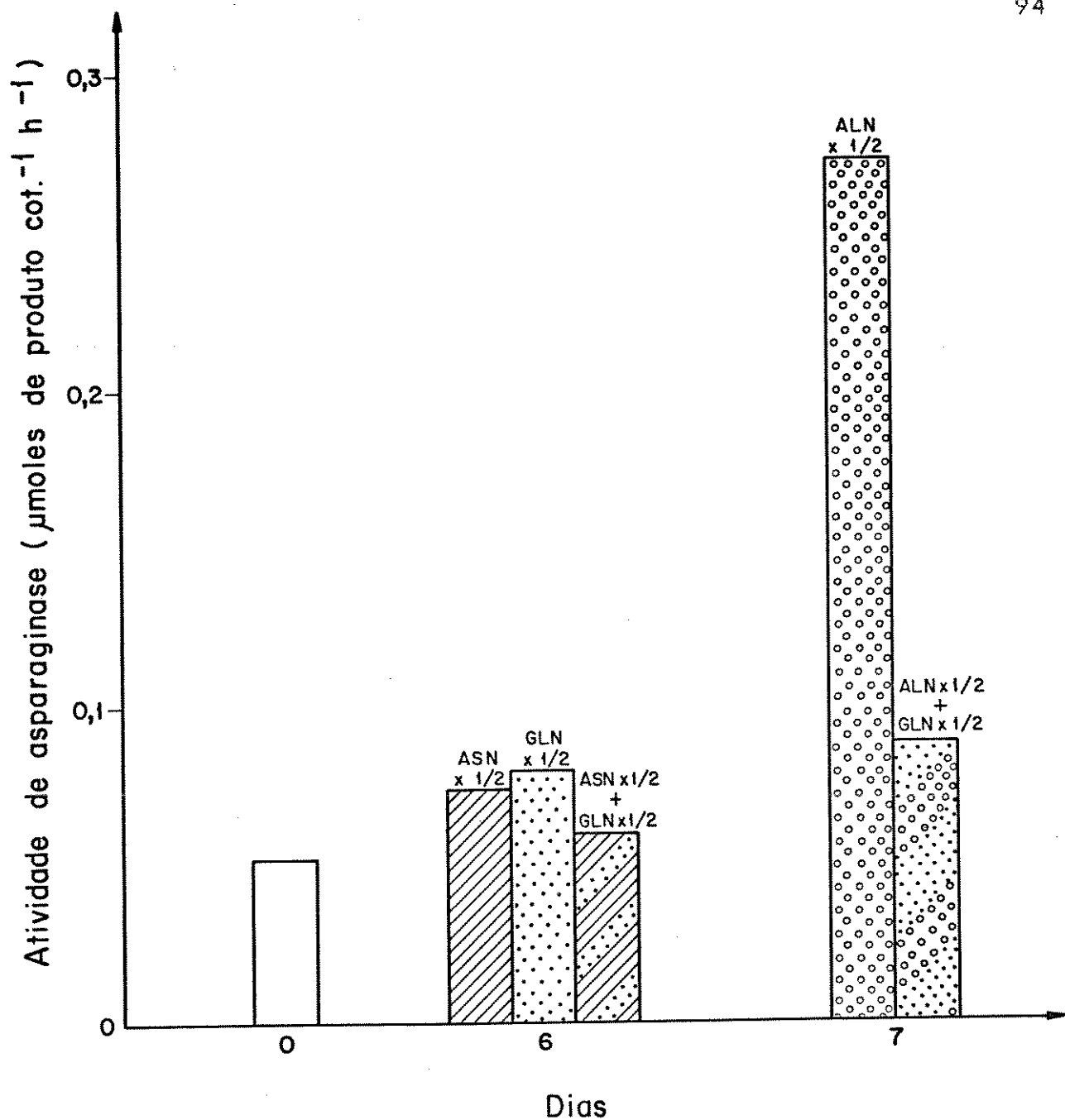


Figura 22. Medidas de atividade da enzima asparaginase em extratos de cotilédones de soja mantidos em cultura tendo como fonte nitrogenada ALN $\times$ 1/2, ASN $\times$ 1/2, GLN $\times$ 1/2, ALN $\times$ 1/2 + GLN $\times$ 1/2 ou ASN $\times$ 1/2 + GLN $\times$ 1/2. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento com peso fresco de cerca de 35 mg cot.⁻¹.

Os resultados deste experimento são mostrados na figura 23.

Como pode-se verificar, nos resultados obtidos nas avaliações do 6º dia das culturas, GLN, com metade de sua concentração normal, mesmo na presença de ASN, desencadeou uma inibição total do aumento de atividade de asparaginase obtido com ASN sozinha. A atividade na mistura de ASN e GLN ficou próxima à baixa atividade registrada para GLN sozinha. Entretanto, no tratamento com 1/10 da concentração normal de GLN, aparentemente, não houve evidência de qualquer nível de inibição sobre a atividade de asparaginase. Isto sugere que em concentrações mais baixas, a GLN não tem um efeito sobre a asparaginase.

No 7º dia das culturas avaliou-se a atividade da enzima nos tratamentos cuja fonte de nitrogênio foi ASN ou GLN na sua concentração normal. Verificou-se, desta forma, que houve a confirmação dos resultados dos experimentos anteriores, isto é, quando GLN é a fonte nitrogenada os níveis de atividade de asparaginase são muito baixos e com ASN são altos.

Quanto à diferença nos resultados de atividade entre o 6º e 7º dias quando a fonte foi ASN ou ASN + 1/10 de GLN pederíamos relacionar estes dados com os anteriores que mostraram que há um pico de atividade no 6º dia das culturas. Consequentemente as avaliações realizadas no 7º dia apurariam níveis de atividade da enzima já no início da fase de declínio.

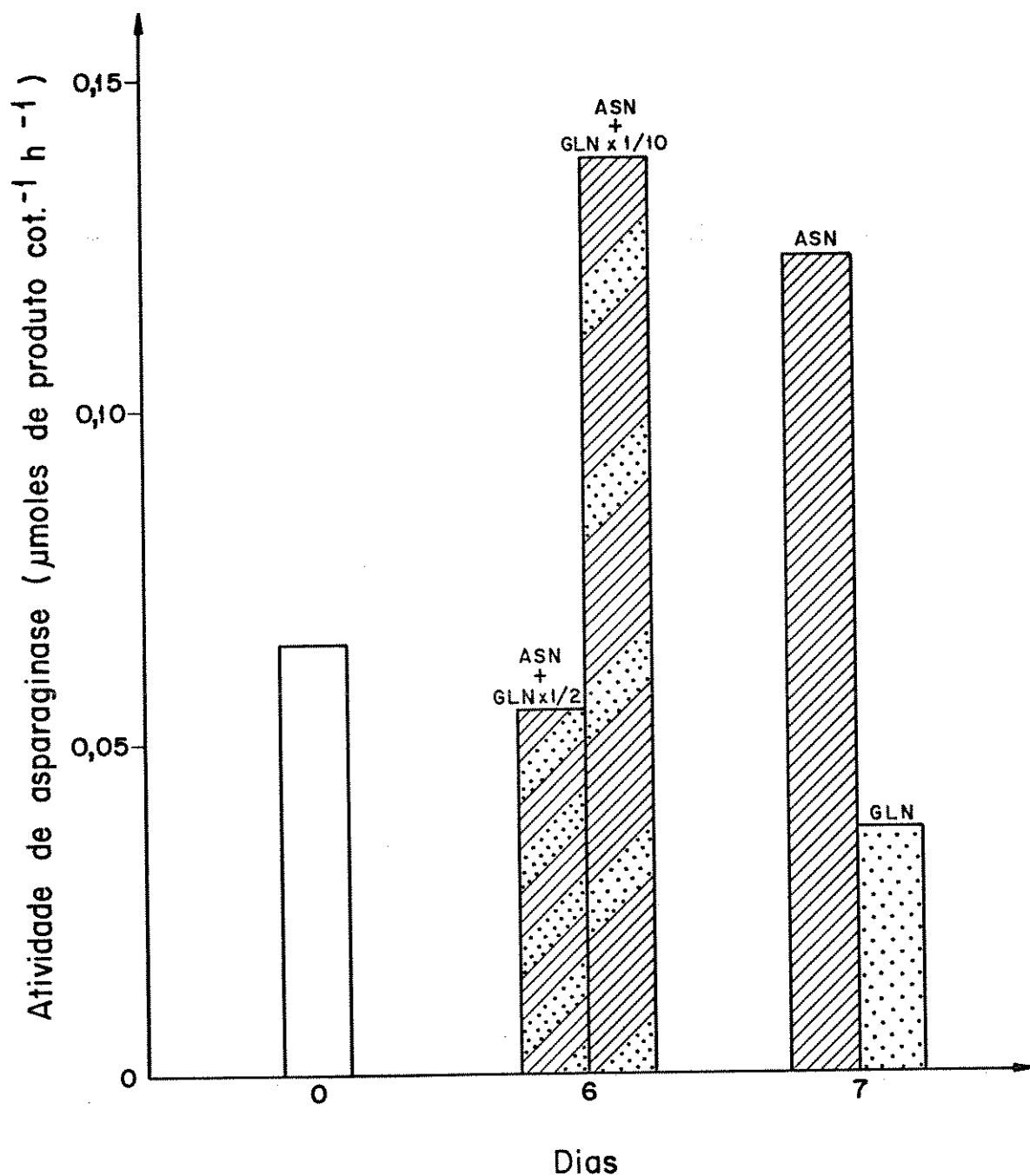


Figura 23. Medidas de atividade da enzima asparaginase em extratos de cotilédones de soja mantidos em cultura tendo como fonte nitrogenada ASN, GLN, ASN + GLNx1/2 ou ASN + GLNx1/10. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento com peso fresco de cerca de 35 mg cot.⁻¹.

O experimento seguinte foi realizado para investigar se a presença de GLN teria efeito sobre a atividade da enzima se os cotilédones fossem incubados no meio de cultura num momento em que já demonstrassem teores altos de atividade de asparaginase. Foi feito então, um experimento utilizando como fontes nitrogenadas ASN ou GLN e cotilédones com a idade de cerca de 35 dias após o florescimento e peso fresco de aproximadamente 90 mg por cotilédone, portanto maiores e mais desenvolvidos que os utilizados nos experimentos anteriores. Os resultados deste experimento podem ser observados na figura 24.

Verifica-se pelos resultados apresentados na figura, que no dia zero o nível de atividade da enzima demonstrou valores mais elevados do que nos experimentos anteriores com cotilédones na faixa de 35 mg. No 6º dia das culturas quando a fonte nitrogenada foi ASN os valores de atividade demonstraram aumentos de mais de duas vezes os valores iniciais. Quando a fonte foi GLN, houve um decréscimo nos valores de atividade de asparaginase com níveis inferiores aos do dia zero. Portanto, mesmo quando asparaginase estava em plena fase de aumento na sua atividade a GLN não só impediu um aumento maior como, neste caso, provocou uma diminuição nítida na atividade da enzima.

A seguir, procurou-se obter mais evidências sobre o efeito de GLN na atividade de asparaginase. O objetivo desse experimento foi comparar a atividade da enzima fazendo a transferência de cotilédones mantidos em ASN até o 3º dia das culturas

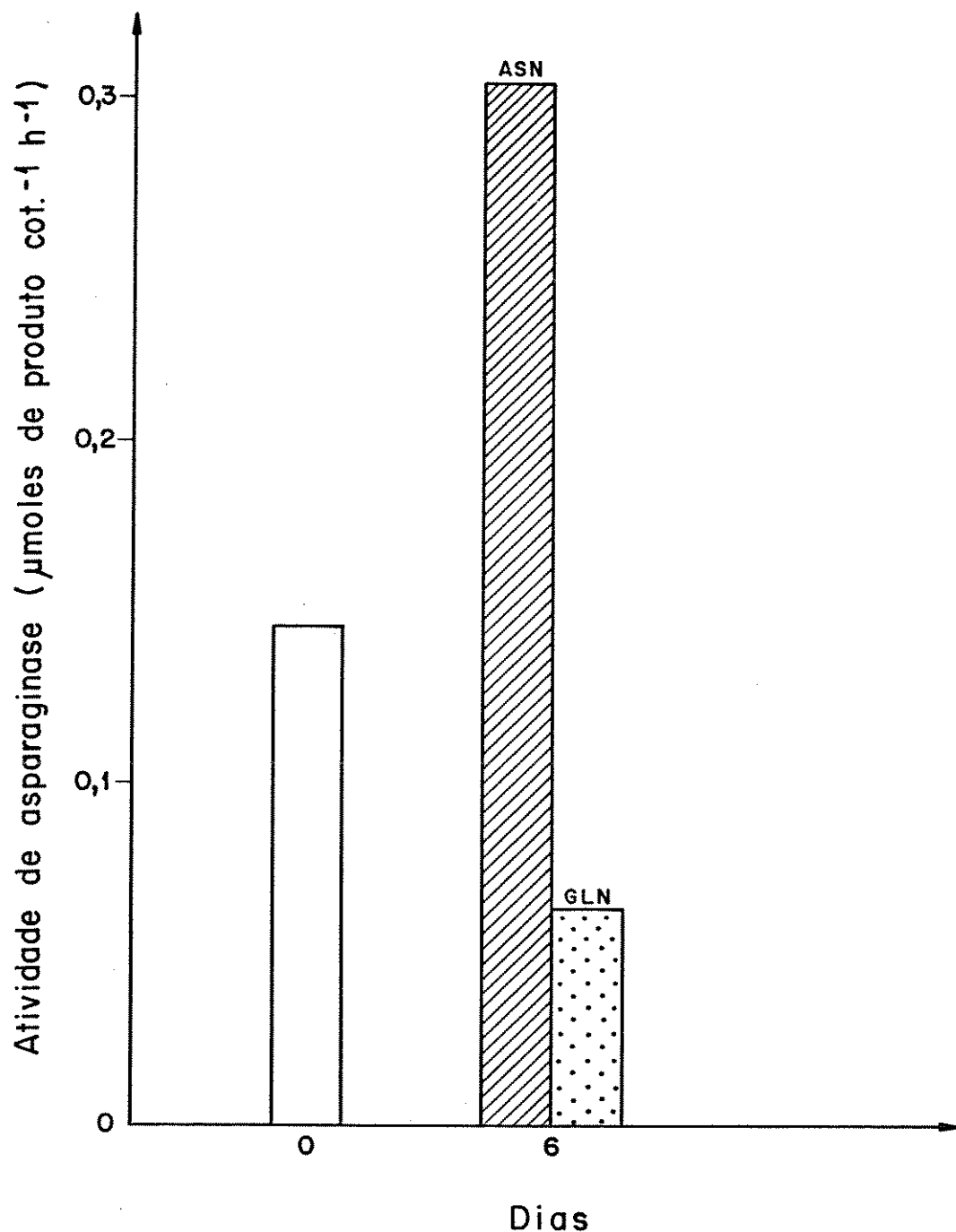


Figura 24. Medidas de atividade da enzima asparaginase em extratos de cotilédones de soja mantidos em cultura tendo como fonte de nitrogênio ASN ou GLN. O dia zero corresponde à cerca de 35 dias após o florescimento com peso fresco de cerca de 90 mg cot.⁻¹.

e portanto num momento em que a enzima apresentaria níveis altos de atividade, para um novo meio com ASN (controle) ou GLN como fonte nitrogenada.

Os resultados desse experimento são mostrados na figura 25.

Analizando o histograma podemos observar que no dia 3 (dia da transferência dos cotilédones para o novo meio) os níveis de atividade de asparaginase eram altos, (como esperado dos experimentos anteriores). Após a transferência para o meio contendo GLN, a atividade caiu sensivelmente (medida do dia 6). No tratamento em que ASN continuou sendo a fonte nitrogenada a partir do 3º dia, verificou-se que os níveis de atividade da enzima também foram mais baixos no 6º dia se comparados aos dos experimentos anteriores com a mesma fonte. Poderíamos questionar duas causas para que isso tivesse ocorrido. Talvez a idade fisiológica dos cotilédones no início da cultura fosse um pouco diferente dos experimentos anteriores, fazendo com que o pico de atividade da enzima (ver figura 19) fosse alcançado antes. Ou, porque a presença de níveis elevados de ASN no meio, tendo-se repetido no 3º dia das culturas, desencadeou um processo que teve efeitos negativos sobre a atividade de asparaginase como acontece, normalmente, a partir do 6º dia da cultura (figura 19).

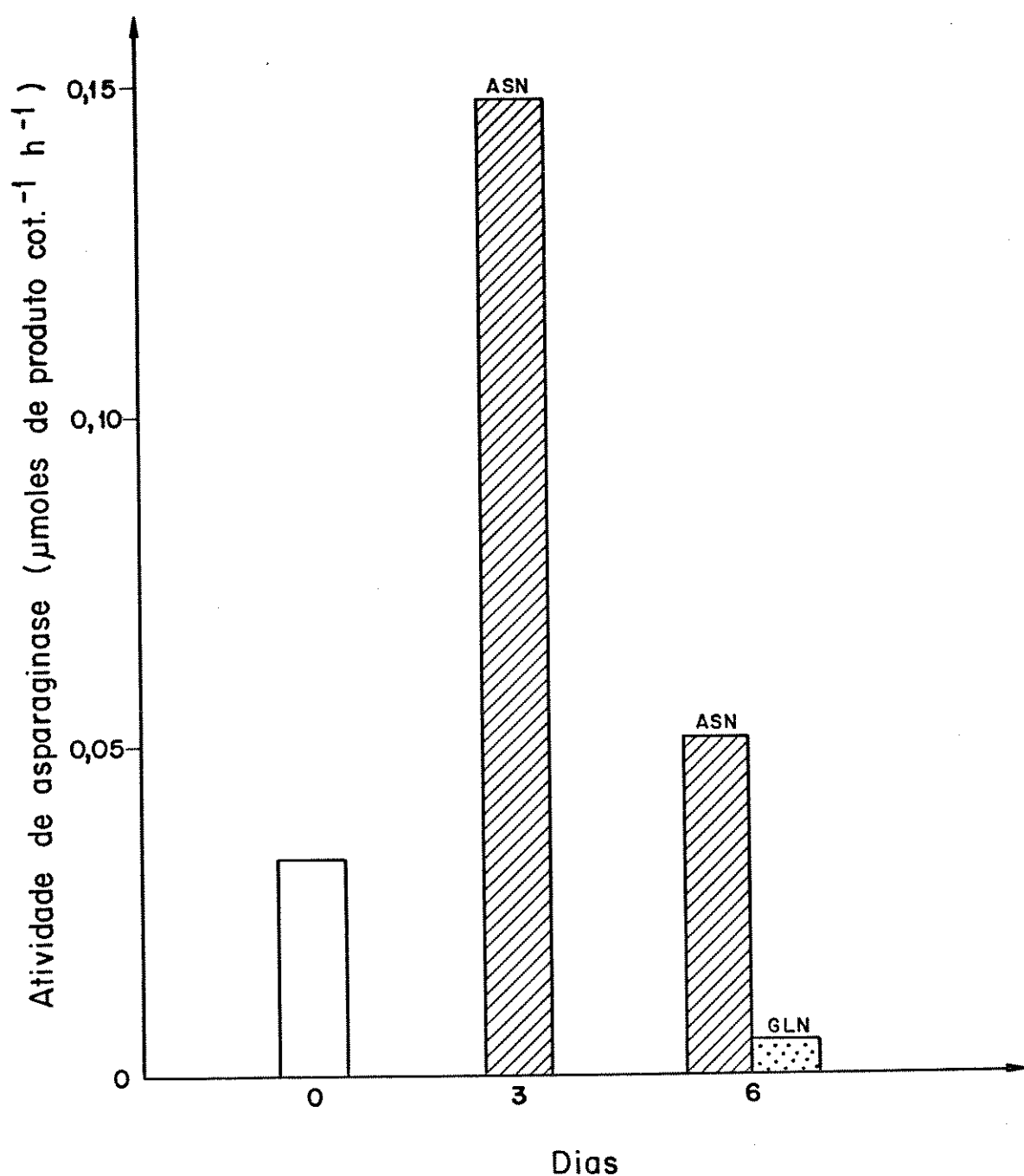


Figura 25. Medidas de atividade da enzima asparaginase em extratos de cotilédones de soja mantidos em cultura tendo como fonte nitrogenada ASN ou GLN. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento e com um peso fresco de cerca de 35 mg cot.⁻¹.

Com o objetivo de investigar a natureza da inibição sobre a enzima asparaginase provocada pela presença de GLN no meio de cultura e também daquela provocada por ASN após o período em que se verifica o pico de atividade (alcançado entre o 3º e 6º dias da cultura) realizou-se um experimento com as seguintes características. Foi feita a incubação de cotilédones com peso inicial entre 30 e 40 mg, em ASN ou GLN como fonte nitrogenada, iniciando as culturas em dias diferentes, de tal forma que quando fossem feitas as avaliações enzimáticas houvesse simultaneamente cotilédones em três situações. Primeiro, (situação A), cotilédones em ASN num momento em que a enzima apresentasse alta atividade (3 a 4 dias em cultura). Chamou-se de B a situação em que os cotilédones foram mantidos em GLN, portanto com baixíssimo teor de atividade de asparaginase. Na situação C haveria cotilédones mantidos em ASN num momento em que a atividade da enzima estivesse em declínio (7 a 8 dias em cultura). Ter-se-ia, portanto, cotilédones em ASN com alto teor de atividade enzimática (A), cotilédones em GLN com baixo teor de atividade enzimática (B) e em (C) cotilédones com ASN com teores de atividade menores do que em (A). As avaliações foram feitas em dois dias subsequentes para que houvesse confirmação dos resultados.

Na primeira avaliação cujos resultados estão apresentados na figura 26 detectou-se altos níveis de atividade de asparaginase na situação A, níveis muito baixos na situação B e em C os níveis de atividade foram menores do que em A. Estes resultados vieram corroborar os resultados obtidos nos experimentos

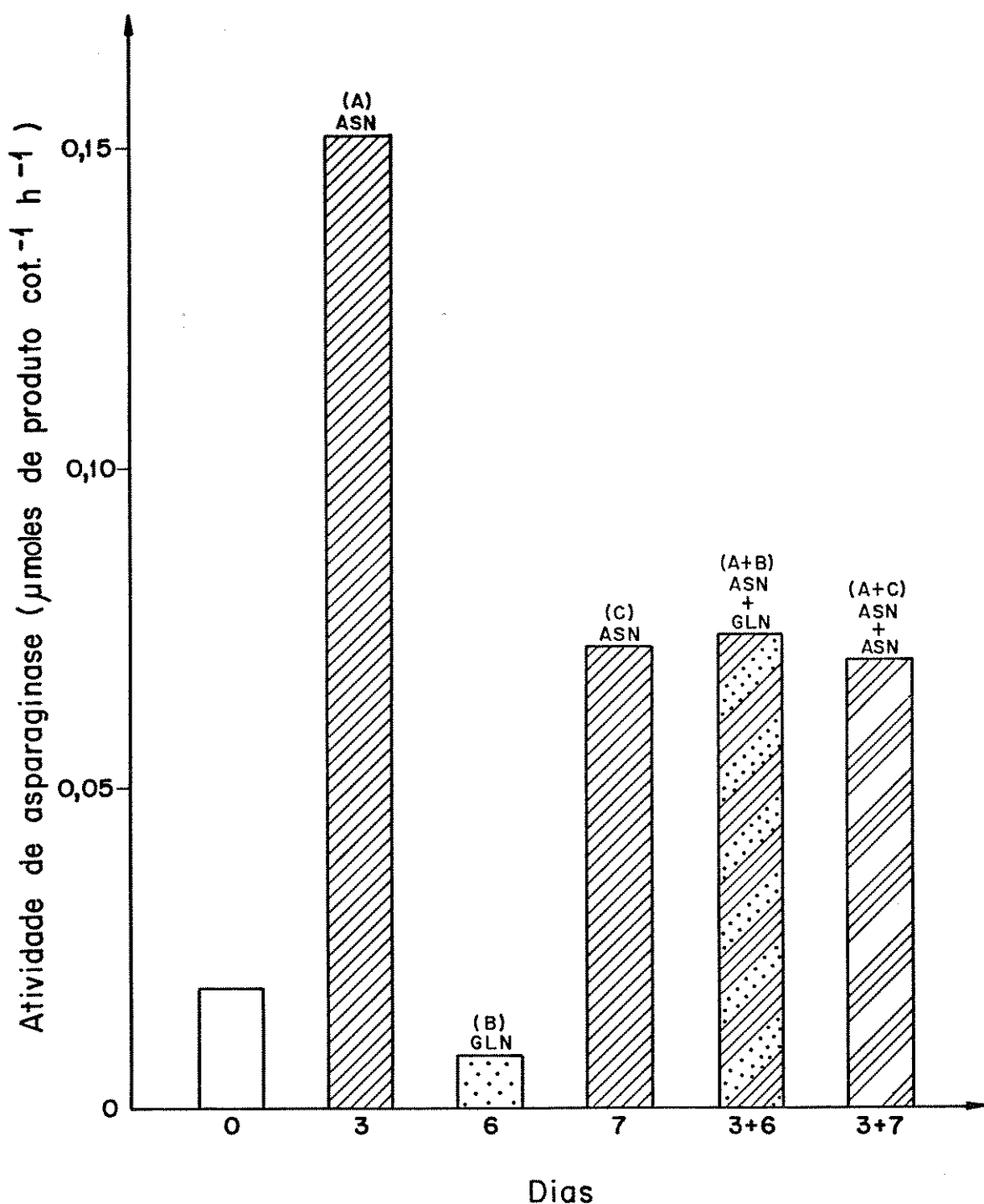


Figura 26. Medidas de atividade da enzima asparaginase em extratos de cotilédones de soja mantidos em cultura tendo como fonte de nitrogênio ASN ou GLN, e em misturas desses extratos. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento com peso fresco de cerca de 35 mg cot.⁻¹.

anteriores. Para avaliar a possibilidade da existência de inibidores nos extratos cuja atividade era baixa, misturou-se em partes iguais os extratos da situação A com B e A com C.

Como podemos verificar na figura 26 o resultado de atividade do extrato dos cotilédones em ASN adicionado do extrato dos cotilédones mantidos em GLN é igual a 50% da atividade constatada no extrato A o que equivale a dizer que o extrato dos cotilédones mantidos em GLN não aumentou e nem inibiu a atividade de asparaginase no ensaio. O resultado demonstrou que não houve fatores interferentes (por exemplo, inibidores) da atividade de asparaginase no extrato dos cotilédones mantidos em GLN confirmado na figura 27).

Para avaliar a natureza da queda em atividade de asparaginase provocada por ASN em cotilédones em cultura, misturou-se em partes iguais extratos obtidos por volta do pico de atividade com extratos obtidos depois do pico, ambos oriundos de cotilédones cultivados em ASN como única fonte de nitrogênio (situação A e C do experimento respectivamente). Se não houvesse nenhum tipo de inibidor presente o resultado esperado seria 50% da soma das atividades de A e C. Como está mostrado na figura 26 o que se encontrou foi um valor inferior. Metade da soma das atividades de A e C é igual a $0,11 \text{ umol. cot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, enquanto que a mistura dos extratos A e C apresentou um valor de apenas 0,7. A figura 27 mostra outra avaliação confirmando esse resultado. Metade da soma das atividades de A e C é $0,10 \text{ umol. cot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,

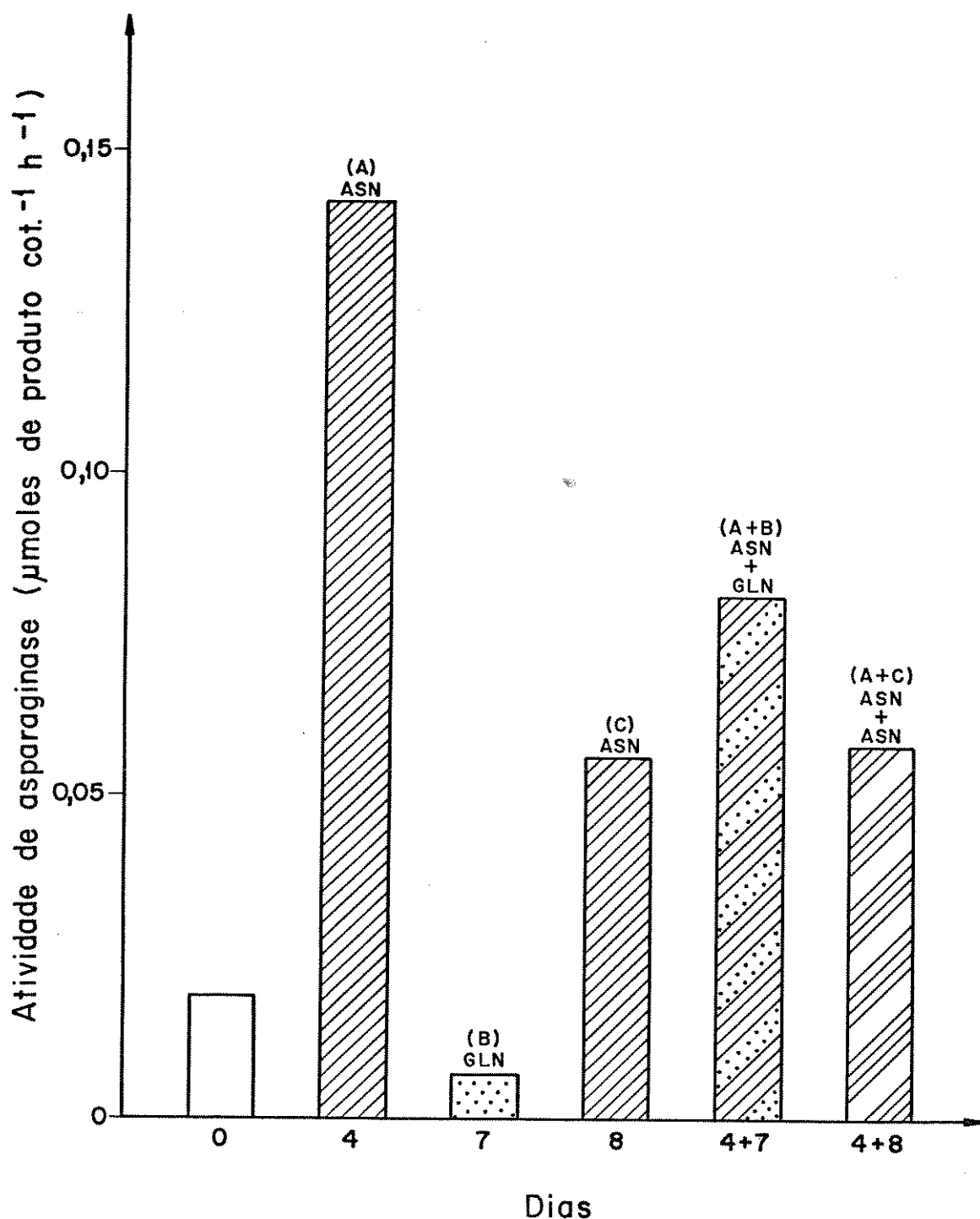


Figura 27. Medidas de atividade da enzima asparaginase em extratos de cotilédones de soja mantidos em cultura tendo como fonte de nitrogênio ASN ou GLN, e misturas desses extratos. O dia zero corresponde à cerca de 25 dias após o florescimento com peso fresco de cerca de 35 mg cot.⁻¹.

enquanto a mistura A + C apresentou um resultado de 0,06, ou seja, bastante inferior.

Há dessa forma, uma inibição na atividade de asparaginase em cerca de 50%, por alguma substância (inibidor) que provavelmente foi sintetizada nos cotilédones à partir do quinto ou sexto dia em cultura que corresponde ao período onde a enzima mostra o pico de atividade máxima. Este inibidor deve ser de alto peso molecular, uma vez que não foi eliminado dos extratos após passagem pela coluna de Sephadex G25.

6. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos podemos fazer uma avaliação em termos do aproveitamento comparativo das fontes de nitrogênio entre si, correlacioná-las com o desenvolvimento dos cotilédones in vitro e in situ e ao padrão de atividade das enzimas estudadas.

Nas medidas de desenvolvimento realizadas (peso fresco), constatou-se que ASN e GLN demonstraram graus de eficiência bastante próximos e uma menor eficiência foi observada quando ALN foi a fonte. Estes resultados são normais se comparados com dados da literatura para cotilédones de soja em cultura (THOMPSON et al, 1977; COKER e SCHAEFER, 1985 e HAGA E SODEK,

1987)). O menor aproveitamento de ALN pode significar que os processos de transformação deste composto em amônia são menos eficientes que os de ASN e GLN. Pelo menos a alta atividade de alan-toinase no cotilédone (figura 13) sugere que qualquer deficiência que possa existir no metabolismo de ALN, não envolve esta enzima.

Outros motivos do baixo aproveitamento de ALN são possíveis. Estudos com cotilédones de soja em cultura (COKER e SCHAEFER, 1985), demonstraram que quando (^{13}C - ^{14}N) ALN foi a fonte única de N houve apenas uma incorporação parcial do amônio marcado. Cerca de 50% do amônio marcado foi recuperado no meio de cultura. Isto não ocorreu quando (^{13}C - ^{14}N) GLN foi a fonte nitrogenada. Na utilização de ALN + GLN como fonte o resultado de crescimento e desenvolvimento foi inferior ao verificado com GLN sozinha. Estes resultados levaram os autores à conclusão de que o menor crescimento observado na presença de ALN seria devido ao teor elevado de amônio proporcionado por ALN como única fonte nitrogenada e da incapacidade dos cotilédones em acumular nitrogênio (proteína) nestas condições.

Outra possibilidade para a baixa eficiência de utilização de ALN pode estar relacionada com a reduzida taxa de absorção do ureídeo pelo cotilédone in vitro (RAINBIRD et al, 1984).

Quanto às medidas de ureídeos, os dados (figura

11) sugerem que a fonte de N tem pouco efeito sobre os níveis de ureídeos no cotilédone. Principalmente pelo fato de que praticamente o mesmo nível de ureídeos foi encontrado quando a fonte foi um ureídeo (ALN) ou uma amida (ASN ou GLN). Apesar do problema de absorção de ureídeos (discutido anteriormente), isto significa que pelo menos os primeiros passos do metabolismo de ureídeos devem funcionar com bastante eficiência, uma vez que não há acúmulo de ureídeos.

No caso dos aminoácidos livres (figura 12), embora houvesse diferenças com a fonte nos níveis nas fases iniciais das culturas, no final da incubação as diferenças foram bastante reduzidas. Neste caso parece que o acúmulo mais lento de aminoácidos na presença de ALN pode estar relacionado simplesmente com a reduzida taxa de crescimento.

A efetividade de ALN, ASN e GLN como fontes isoladas de N demonstra que os cotilédones de soja em cultura *in vitro* estão aptos a realização dos processos metabólicos de síntese dos outros aminoácidos protéicos a partir dessas substâncias com maior ou menor eficiência, dependendo do composto fonte. Evidenciando esta capacidade, foi encontrada atividade de todas as quatro enzimas consideradas importantes no metabolismo desses compostos. Além disso, todas as enzimas estudadas (com exceção de ASNase quando GLN foi a fonte) apresentaram padrões de atividade crescentes no período, acompanhando a um certo grau, os padrões de atividade dos órgãos mantidos nas plantas de origem.

6.1. ASPARAGINASE

A enzima asparaginase foi detectada em cotilédones e tegumentos de frutos de soja por GOMES e SODEK (1984), embora sua presença já fosse conhecida em sementes imaturas de várias outras leguminosas (ATKINS et al, 1975; LEA et al, 1978; SODEK et al, 1980 e IRELAND e JOY, 1981).

Os resultados aqui apresentados demonstram que a enzima tem atividade crescente nos cotilédones mantidos nas plantas (figura 20) durante o período acompanhado, que corresponde à cerca de 25 a 33 dias após o florescimento das plantas. Este período corresponde a parte do período de acúmulo máximo de proteína em sementes de soja (GOMES E SODEK, 1984). De acordo com os autores a atividade de asparaginase, em cotilédones de soja em desenvolvimento de plantas noduladas ou não, demonstrou um crescimento no transcorrer do desenvolvimento das sementes, com um pico de atividade cerca de 45 dias após o florescimento. Esse período de maior atividade coincidiu com o período de acúmulo rápido de proteínas.

Para os resultados obtidos para asparaginase nas culturas de cotilédones in vitro precisamos analisar cada uma das fontes de nitrogênio utilizadas (figura 19).

Quando a fonte única de N foi ASN, temos de acordo com os resultados, de início um estímulo para a atividade da enzima, pois desse fluxo metabólico depende a síntese de todos os compostos nitrogenados e em especial dos aminoácidos protéicos

necessários à biossíntese das proteínas enzimáticas e de reserva. Esta é uma fase de intensa atividade metabólica nos tecidos cotilédones e corresponde aproximadamente ao 42 dia das culturas. A partir desse ponto o nível de asparaginase começa a entrar em declínio. Esta situação sugere a possibilidade do desencadeamento de um processo inibitório sobre a enzima asparaginase que possibilitaria a atenuação da degradação da amida. Obteve-se evidências para a existência de um inibidor de asparaginase nesta fase de desenvolvimento do cotilédono, após verificar que as misturas de extratos de cotilédones na fase de "queda" de atividade com extratos da fase de "pico" apresentaram atividades menores do que a soma dos dois extratos separados (figuras 26 e 27). O mesmo processo inibitório poderia explicar a situação *in situ* (GOMES e SODEK, 1984), em que após a fase onde foi verificado o pico de atividade iniciou-se um período de declínio na atividade da enzima. Pelos resultados mostrados nas figuras 19 e 20 verificou-se que, *in vitro*, o padrão de atividade da enzima mostrou níveis mais elevados do que *in situ*. Isto talvez tenha acontecido porque os teores de ASN que chegam aos cotilédones neste estágio de desenvolvimento de fruto são menores do que aqueles do meio de cultura. Então é possível que *in vitro* o período em que a enzima teria um pico de atividade seria antecipado.

Quando a fonte nitrogenada foi ALN obteve-se um comportamento de asparaginase semelhante ao observado com ASN. Como com ALN o desenvolvimento dos cotilédones mostrou sempre um certo atraso, o período de atividade máxima da enzima também foi

alcançado depois de ASN. Este fato é interessante, uma vez que não seria necessária a atividade asparaginase para o metabolismo de ALN. Chega-se à conclusão de que asparaginase é uma enzima constitutiva, não estando sujeita a regulação pelo influxo do seu substrato na semente.

Considerando-se os resultados para asparaginase quando a fonte nitrogenada foi GLN, obteve-se uma situação totalmente diferente das anteriores.

A GLN não somente causou um efeito negativo sobre a atividade de asparaginase no início das culturas in vitro, como também afetou negativamente a atividade da enzima em momentos fisiológicos onde esta já se estabelecera com níveis mais elevados de atividade. Os resultados obtidos e mostrados nas figuras 24 e 25 demonstram uma situação de inibição compatível com o modelo no qual a enzima seria sintetizada mas sujeita ao efeito de "turnover", isto é, na presença de GLN a síntese é inibida e, conseqüentemente, a degradação se torna maior que a síntese acarretando um declínio brusco na atividade da enzima.

Os resultados mostrados nas figuras 19, 21, e 23 representam a situação onde GLN impediria a síntese da enzima, neste caso partindo de níveis baixos de atividade. Possivelmente, o mecanismo de inibição envolve GLN como repressor da enzima.

Descartamos a hipótese de que asparaginase seria sintetizada por indução do substrato (ASN) e que sua baixa atividade na presença de GLN seria simplesmente devido à ausência de

ASN, tendo em vista que nos experimentos em que utilizou-se ALN como fonte nitrogenada (figuras 19, 21 e 22), ou seja, também na "ausência" de ASN, a enzima demonstrou altos níveis de atividade. Além disso, a presença de ASN juntamente com GLN (figuras 22 e 23) não impediu a baixa atividade de ASNase.

Descartamos também a possibilidade de um inibidor de asparaginase formado na presença de GLN, uma vez que a mistura de extratos não evidenciou a presença de tal substância em cotilédones cultivados com GLN (figuras 26 e 27).

Não encontramos, na literatura, dados a respeito de inibição ou repressão de asparaginase por glutamina e nem por asparagina. Encontramos uma situação com alguma semelhança para a enzima redutase de nitrato. Aminoácidos, e em especial as amidas glutamina e asparagina, em conjunto ou separadamente, mostraram um efeito de inibição sobre a biossíntese da enzima redutase de nitrato em raízes de milho (OAKS et al, 1977).

Em algas cianofícias e fungos (*Neurospora*) é relatada existência de um composto nitrogenado orgânico formado a partir de amônia e na presença da enzima glutamina sintetase, que atua como repressor da síntese da enzima redutase de nitrato (PREMAKUMAR et al, 1978; DUNN-COLEMAN et al, 1981; HERRERO et al, 1981).

Em fungos *Neurospora* sugeriu-se ser glutamina este suposto repressor da redutase de nitrato (DUNN-COLEMAN et al, 1979 e PREMAKUMAR et al, 1979). PREMAKUMAR et al (1978), já haviam demonstrado que glutamina impede a síntese do mRNA para redutase de

nitrato, o mesmo mRNA que ausente em *Neurospora*, em que cresceram em amônia como fonte nitrogenada.

6.2. ALANTOINASE

A existência da enzima alantoinase nas folhas e caules de soja foi relatada por TAJIMA e YAMAMOTO (1975), por TAJIMA et al (1977) e em cotilédones por THOMAS e SCHRAEDER (1981 e 1982) e por GOMES e SODEK (1984).

Pelos resultados mostrados nas figuras 13 e 14, percebe-se que a enzima mostrou padrões de atividade muito semelhantes, tanto nos órgãos mantidos nas plantas quanto nos mantidos *in vitro*, com qualquer uma das fontes de nitrogênio utilizadas. Alantoinase só seria necessária para o metabolismo de ALN, e não tem qualquer ligação com o metabolismo de ASN e GLN. Isto sugere que a enzima é constitutiva, ou seja, não precisa da presença do seu substrato para ser sintetizada durante o desenvolvimento da semente de soja. Uma conclusão semelhante foi sugerida por GOMES e SODEK (1984), quando foi verificado um padrão de atividade de alantoinase nos cotilédones *in situ* pouco diferente para plantas noduladas e não noduladas. Entretanto, embora o nível de ureídeos translocados para os frutos fosse bastante reduzido em plantas não noduladas, estes não são totalmente eliminados, o que deixou dúvida se uma pequena quantidade de ureídeos não seria suficiente para a indução da enzima. Pelos dados da li-

temperatura a partir de 1984, parece haver um consenso de que os níveis de ALN que chegam aos tecidos cotilédonares não são elevados o suficiente a ponto de justificar os teores da enzima.

Tem-se, então, razões para considerar que a enzima alantoinase não só atua no catabolismo da ALN que chega aos locais de consumo do fruto, como é o caso dos cotilédones, mas que ALN poderia ser formada a partir da decomposição de bases púricas resultantes de um metabolismo amplo nos cotilédones, como foi proposto por FUJIHARA e YAMAGUCHI (1978). Desse ponto de vista, ALN é um metabólito intermediário normal da reciclagem de nucleotídeos e outros compostos nitrogenados nas sementes.

6.3. GS - GOGAT

Analisando-se os resultados da enzima GS (figura 15) verifica-se que os níveis de atividade nas culturas *in vitro* são cerca de duas vezes maiores do que *in situ*. Este resultado pode ser melhor avaliado se for levado em consideração que as culturas *in vitro* foram mantidas sob luz contínua (4.1.4). Dessa forma, os cotilédones mantidos em cultura estiveram expostos à luz diretamente, enquanto que os mantidos nas plantas, além de permanecer no escuro no período noturno, mesmo durante o dia estavam protegidos da luz direta pelo tegumento e casca da vagem. Essa diferença ambiental na condução dos dois tipos de experimentos poderia ter efeito sobre a atividade da enzima e/ou sobre sua

síntese "de novo".

A interferência na atividade da enzima GS pela luz é citada na literatura. RHODES et al (1975 e 1976), demonstraram que a enzima GS é reversivelmente inativada no transcurso de um período de seis horas, quando as plantas de *Lemna minor*, que cresceram em amônia, foram colocadas no escuro. A reativação da enzima in vivo ocorreu quando as plantas foram recolocadas na luz. ROWELL et al (1979) também relataram que a atividade da enzima GS da cianobactéria *Anabaena cylindrica* foi interrompida quando as culturas foram colocadas no escuro.

Os níveis altos de atividade de GS sugerem que deve estar ocorrendo síntese intensa de GLN no transcurso do processo estudado e que a enzima é constitutiva nos tecidos cotiledonares, pois não se verificou um padrão de atividade diferente quando a fonte única de N foi GLN, ASN ou ALN. Embora a enzima GS seja necessária no metabolismo de ASN e ALN, pois é responsável pela assimilação do amônio produzido a partir destes dois compostos, no caso do metabolismo de GLN a enzima é totalmente desnecessária. COCKER e SCHAEFER (1985) sugeriram que o baixo aproveitamento de ALN por cotilédones de soja in vitro, fosse devido a uma deficiência na assimilação de NH_4^+ no meio de cultura. Nossos dados não apoiam esta ideia, uma vez que a capacidade de assimilação de NH_4^+ , em termos da atividade de GS, é alta. Dados da literatura demonstraram (MURRAY e KENNEDY, 1980) que os níveis de atividade da enzima GS em cotilédones de ervilha foram suficientes e adequados para a utilização do amônio derivado de ASN ou

GLN como fontes nitrogenadas. Esta conclusão foi o resultado do estudo comparativo entre a taxa média diária de atividade da enzima e o acúmulo de nitrogênio amínico como proteína no mesmo período.

Conforme discutido na revisão de literatura, a enzima GOGAT age em conjunto com a enzima GS no processo de assimilação de N, proporcionando na sequência metabólica a síntese de outros aminoácidos protéicos. A enzima é necessária para o metabolismo de todas as três fontes estudadas.

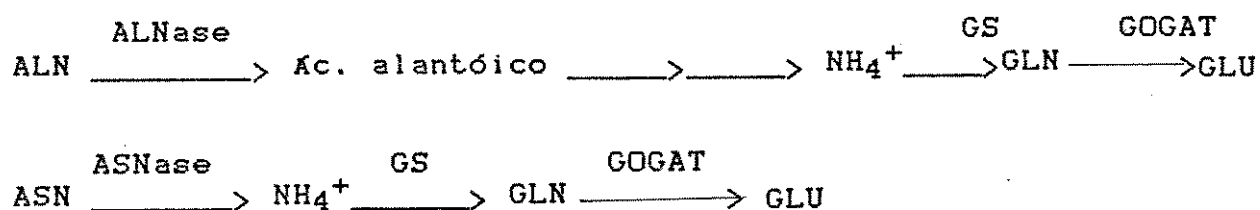
Pelos resultados obtidos com a enzima GOGAT (figura 17) verificou-se que, quando as fontes nitrogenadas foram ASN ou GLN, houve aumento na atividade de GOGAT, principalmente a partir do 42 dia das culturas. Relacionando-se estes resultados com os da enzima GS nota-se que ambas demonstraram atividade mais elevada nesse período. Também, se estes resultados forem relacionados com os de peso, quando a fonte foi ASN e GLN, evidencia-se que houve coincidência entre o período de intenso desenvolvimento dos cotilédones e a alta atividade tanto de GS quanto de GOGAT. Fazendo a mesma correlação com os resultados de peso e atividade de GOGAT quando a fonte foi ALN, verifica-se que há coincidência entre a baixa atividade de GOGAT e o reduzido acúmulo de matéria fresca.

6.4. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DOS DADOS

O objetivo do presente trabalho foi de investigar o grau de dependência dos processos metabólicos envolvidos na utilização das principais fontes de N que suprem o fruto de soja. Também, pelo acompanhamento do padrão de atividade das enzimas chaves de cada processo, obter evidências se as enzimas estudadas teriam um papel fundamental no processo como um todo.

Foi verificado que cada enzima, individualmente, apresenta um padrão característico de atividade durante o transcorrer do processo de desenvolvimento dos cotilédones, com valores elevados de atividade que correspondem ao período *in situ* de síntese intensa de proteína. É exatamente nesta fase que as enzimas que estão realmente envolvidas no fornecimento de aminoácidos para síntese de proteína são mais necessárias.

Aceitando-se a evidência de que alantoinase e asparaginase são responsáveis pelo metabolismo de alantoina e asparagina no fruto de soja, tem-se como consequência a formação de amônia de acordo com o esquema:



É importante observar que, em ambos os casos, a amônia é reassimilada via GS e GOGAT.

Neste trabalho foram constatados padrões de atividade crescentes de ambas as enzimas nos cotilédones de soja, com ALN, ASN ou GLN como fontes nitrogenadas. Isso seria compatível com a hipótese de que estas enzimas estão envolvidas no metabolismo desses compostos, do modo como representado 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 proteínas de reserva nos cotilédones. Embora a enzima glutamato desidrogenase possa também estar envolvida, ao invés do sistema GS/GOGAT, uma revisão do assunto (MIFLIN e LEA, 1975), demonstrou que é o sistema GS/GOGAT, e não GDH, que normalmente desempenha esta função nos frutos.

Constatou-se pelos resultados que houve grande diferença no crescimento com ALN, que era esperado, mas o padrão de atividade de GS, alantoinase e, de certa forma asparaginase, mostra independência da fonte, sugerindo que o aumento dessas enzimas já está "programado", e independe a um certo grau, de variação na taxa de crescimento.

No caso específico da enzima GOGAT, cuja atividade pouco aumentou na presença de ALN, contrastando com a situação de ASN ou GLN, é possível que este comportamento da enzima esteja relacionado com o reduzido crescimento do cotilédone incubado com ALN. Isto pode significar que a enzima GOGAT está sob controle mais rígido, controle este associado ao desenvolvimento do coti-

lédone.

As medidas de atividade enzimática podem também ser utilizadas como parâmetro para se avaliar o teor de metabolização do N que chega aos tecidos cotiledonares e sua posterior utilização na biossíntese protéica. Sob este aspecto procurou-se relacionar a atividade das enzimas com a taxa de acúmulo de proteína nos cotilédones e questionar se a atividade das enzimas individualmente é suficiente para processar todo o N necessário ao acúmulo de proteína nos cotilédones quando suprido na forma de ASN, GLN ou ALN.

A taxa de acúmulo de proteína nos cotilédones em cultura tendo como fonte nitrogenada GLN é de 0,62 mg por cotilédone por dia (MOSQUIN e SODEK comunicação pessoal, valor este obtido em estudos com o mesmo material desta tese). Isto representa um acúmulo de N de 0,29 umoles de N por cotilédone por hora (expresso da mesma forma da atividade enzimática), empregando o fator 6,25 para transformar mg de proteína em mg de N.

Tendo-se estes valores como parâmetro de comparação pode-se então avaliar o desempenho de cada enzima individualmente.

No caso de alantoinase as atividades registradas (figura 13) estão bem acima do valor necessário para o processamento de todo o N acumulado em proteína nas sementes. O motivo para esta elevada atividade enzimática é desconhecido, mas pode estar relacionado com o baixo nível de alantoina normalmente encontrado no cotilédone (RAINBIRD et al, 1984), o que diminuiria a

atividade da enzima.

Para a enzima GS os resultados mostraram que pelos valores de atividade medidos entre os dias zero e 6 (figura 15) haveria uma capacidade para processar 1,2 a 4,0 umoles de N por cotilédone por hora ($GLN = 2N$). Portanto, a atividade da enzima é mais do que suficiente para processar todo o N necessário ao acúmulo de proteína. Dessa forma não há dúvida que a enzima possa desempenhar a função que lhe foi atribuída.

Para asparaginase, entre os dias zero e 6 das culturas (figura 19), a atividade da enzima aumenta de 0,02 a 0,25 umoles de asparagina hidrolizada por hora, por cotilédone, ou seja de 0,04 a 0,50 umoles de N processado por hora ($ASN = 2N$). Levando em conta que ASNase só é necessária para metabolizar ASN, e quando ASN é fonte a quantidade de proteína sintetizada é cerca de 70% daquela formada com GLN (HAGA e SODEK, 1987), calcula-se um acúmulo de N no cotilédone de 0,20 umoles por hora (70% do valor de 0,29 umoles de N por cotilédone por hora). Deve ser lembrado que não foi levado em consideração o fato de que nem toda a ASN é processada pela ASNase (parte é incorporada diretamente em proteína). Desses resultados pode-se inferir que a atividade de ASNase é suficiente para processar o N necessário à biossíntese protéica.

Entre os dias zero e 6 da cultura, a atividade de GOGAT (figura 17) permite o processamento de 0,035 a 0,1 umoles de GLN, ou seja a formação de 0,07 a 0,2 umoles de N por hora ($\text{GLN} = 2\text{N}$). Este valor está um pouco abaixo do valor considerado necessário para o processamento do N para o acúmulo de proteína no cotilédone (0,29). Mesmo levando em consideração que parte da GLN é incorporado diretamente em proteína, e portanto não seria processada por GOGAT, a dúvida permanece. De qualquer forma, seria prematuro descartar o envolvimento de GOGAT no processo, principalmente considerando que a discrepância é pequena. Em se tratando de extratos brutos, os valores relativamente baixos registrados para GOGAT podem ter sido consequência de alguma interferência no método de dosagem da enzima *in vitro*. Será necessário um estudo mais detalhado desta enzima para elucidar esta questão.

Quanto ao significado fisiológico da suposta repressão de asparaginase por GLN, pode-se lançar hipóteses especulativas sobre o assunto, como mostrado na figura 28.

A sequência (A), mostra a situação normal para a utilização do N translocado na forma de ASN, na síntese de outros aminoácidos cujos esqueletos de carbono são originados no metabolismo de carboidratos (LEA et al, 1978). Esta sequência envolve as enzimas asparaginase, GS, GOGAT e transaminase e assegura a formação de todos os aminoácidos protéicos.

Numa situação fisiológica de baixo teor de carboidratos, a tendência seria acumular inicialmente GLN como é

mostrado na situação (B) da figura. Este acúmulo pode decorrer da falta de alfa-KG para a enzima GOGAT ou da falta de esqueletos de carbono para aceitar o N de GLU, em consequência da deficiência do metabolismo de carboidratos. Em qualquer das hipóteses, o GLU seria utilizado para sintetizar GLN numa tentativa de evitar um acúmulo de amônio em níveis tóxicos (a toxicidade de amônio em plantas é bem conhecida, HAYNES e GOH, 1978). A GLN pode ser, então o sinal para diminuir a produção de amônio, através da inibição da ASNase. Este pode ser também o mecanismo para a repressão da redutase de nitrato nos órgãos de assimilação e talvez para qualquer outra enzima cuja atividade implique na produção de amônio como por exemplo a GDH.

Na terceira situação (C), considera-se o caso envolvendo especificamente um influxo de GLN, que além de ser metabolizada pelo sistema GOGAT/transaminase, será utilizada na formação de ASN pela ASN sintetase. É conhecido que GLN é o doador de N para a formação de ASN (ROGNES, 1975; RHODES et al, 1979). Entretanto, nesta situação, é necessário a desativação da asparaginase para não formar um ciclo vicioso de liberação e assimilação de amônio. Outra vez, GLN seria o fator de modulação lógico para regular a atividade de asparaginase. É compatível com esta hipótese a baixa atividade de ASNase encontrada no endosperma de milho ($0,016 \text{ umoles endo}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ - SODEK dados não publicados), esta planta utiliza GLN como principal forma de transporte (ARRUDA e SILVA, 1979).

7. RESUMO

Na soja, as principais formas de transporte para nutrição dos frutos são os ureídeos (plantas noduladas) e asparagina (plantas não noduladas). Glutamina é encontrada em menor proporção. Estes compostos são metabolizados nos frutos de forma a tornar seu nitrogênio disponível para a síntese de proteínas de reserva na semente.

A fim de verificar a influência das diversas fontes nitrogenadas sobre a atividade de enzimas chaves do seu metabolismo, cotilédones imaturos de soja (*Glycine max* L. Meril, cv

Santa Rosa) foram cultivados *in vitro* durante 8 dias em meio definido, variando-se a fonte de N, ou seja, asparagina, glutamina ou o ureídeos alantoína. As plantas de soja que originaram os cotilédones foram cultivados em casa de vegetação em condições naturais de luz e temperatura. As plantas foram cultivadas em vasos com vermiculita e solução nutritiva, até cerca de 25 dias após o florescimento.

Durante o período em que os cotilédones foram mantidos em cultura, foram feitas avaliações do padrão de atividade das enzimas alantoinase (ALNase), asparaginase (ASNase), glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT). Durante o mesmo período foram acompanhadas as atividades das mesmas enzimas em cotilédones mantidos nas plantas.

Constatou-se que ALNase, GS e GOGAT mantiveram padrões de atividade crescentes durante o período em estudo, tanto na planta como nas culturas *in vitro*, independente da fonte de nitrogênio. A enzima GOGAT é necessária para o metabolismo das três fontes, ao passo que ALNase só participa do metabolismo de ALN e GS participa do metabolismo de ALN e ASN. Aparentemente, tanto ALNase como GS são sintetizadas normalmente mesmo na ausência do seu substrato no meio. Este fato evidencia que estas enzimas são constitutivas.

A enzima ASNase, entretanto, demonstrou um padrão de atividade nas culturas diferente da planta, com forte influên-

cia da fonte de N empregada. Na planta, a atividade de ASNase nos cotilédones cresceu durante o período estudado. Por outro lado, nos cotilédones em cultura constatou-se inicialmente uma grande aumento, seguido por uma queda na atividade a partir do 6º dia quando as fontes nitrogenadas foram asparagina e alantoína. Isto sugere que ASNase também é constitutiva. Quando a fonte nitrogenada foi glutamina, a enzima demonstrou um padrão de atividade muito baixo e decresceu durante todo o período, sugerindo que a enzima ASNase está sob o controle de glutamina.

8. LITERATURA CITADA

- ARRUDA, P. e SILVA, W.J. 1979. Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncule. *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.
- ATKINS, C.A., PATE, J.S. e PEOPLES M.B. 1982. Metabolism and translocation of allantoin in ureide-producing grain legumes. *Plant Physiol.* 70:476-482.

- BEEVERS, L. e STOREY, R. 1976. Glutamate synthetase in developing cotyledons of *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 57:862-866.
- BIELESKI L.R. e TURNER, N.A. 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.* 17:278-293.
- BOLLARD, E.G. 1959. Translocation of organic nitrogen in the xylem. *Aust. J. Biol. Sci.* 10:292-301.
- BRAY, C.M. 1983. Purines, pyrimidines and their derivatives. In: Nitrogen metabolism in plants. Logman Group Limited. Longman Inc New York, pp.88-119.
- CHANG, K.S. e FARNDEN K.J.F. 1981. Purification and properties of asparaginase from *Lupinus angustifolius*. *Arch. Biochem. Biophys.* 208:49-58.
- COKER, G.T. e SCHAEFER, J. 1985. ^{15}N and ^{13}C NMR determination of allantoin metabolism in developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 77:129-135.
- COOKSON, C., HUGHES, H. e COOMBS, J. 1980. Effects of combined nitrogen on anapleurotic carbon assimilation and bleeding sap composition in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 143: 338-345.

- DAVIES, H.M. e MIFLIN, B.J. 1978. Advantages of o-phthalaldehyde for visualization ^{14}C -labelled amino acids on thin-layer chromatograms and an improved method for their recovery. J. Chromatogr. 153:284-286.
- DOUGALL, D.K. 1974. Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures. Biochem. Biophys. Res. Com. 58:693-649.
- DUNN-COLEMAN, N.S., TOMSET, A.B. e GARRET, R.H. 1979. Nitrogen metabolism repression of nitrate reductase in *Neurospora crassa*: Effect of the gen-La locus. J. Bacteriol. 139:697-700.
- FERGURSON, A.R. e SIMS, A.P. 1971. Inactivation in vivo of glutamine synthetase and NAD-specific glutamate dehydrogenase its role in the regulation of glutamine synthesis in yeast. J. Gen. Microbiol. 69:423-427.
- FOWDEN, L. 1954. The nitrogen metabolism of groundnut plants the role of methyleneglutamine and methyleneglutamic acid. Ann. Bot. 18:417-440.
- FOWLER, M.W., JESSUP, W. e SARKISSIAN, G.S. 1974. Glutamate synthase activity in higher plants. FEBS Lett. 46:340-342.

- FUJIHARA, S. e YAMAGUCHI, M. 1978. Effects of allopurinol (4-hydroxypyrozolo (3,4-d) pyrimidine) on the metabolism of allantoin in soybean plants. *Plant Physiol.* 62:134-138.
- FUJIHARA, S., YAMAMOTO, K. e YAMAGUCHI, M. 1977. A possible role of allantoin and the influence of nodulation on its production in soybean plants. *Plant Physiol.* 48:233-242.
- GIFFORD, R.M. e THORNE, J.H. 1986. Phloem unloading in soybean seed coats: dynamics and stability of efflux into attached "empty ovules". *Plant Physiol.* 80:464:469.
- GOMES, M.A.F. e SODEK, L. 1984. Allantoinase and asparaginase activities in maturing fruits of nodulated and non-nodulated soybeans. *Plant Physiol.* 62:105-109.
- HAGA, K.I. 1982. Nutrição nitrogenada do cotilédone imaturo de soja. Tese de Mestrado. Inst. de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP.
- HAGA, K.I. e SODEK, L. 1987. Utilization of nitrogen sources by immature soybean. *Ann. Bot.* 59:597-601.
- HALLIDAY, J. e PATE, J.S. 1976. Symbiotic nitrogen fixation by coralloid roots of the cycad, *Macrozamia riedlei*: Physiologi-

- cal characteristics and ecological significance. *Aust. J. Plant Physiol.* 3:349-359.
- HARTWIG, E.E. 1969. Breeding soybeans for high protein and quality. In: *New Approaches to Breeding for Improvement Plant Protein*. IAEA, Vienna, pp,67-70.
- HAYNES, R.J. e GOH, K.M. 1978. Ammonium and nitrate nutrition of plant. *Biol. Rev.* 53:465-510.
- HERRERO, A. FLORES, E. e GUERRERO, M.G. 1981. Regulation of nitrate reductase levels in the cyanobacteria *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp. strain 7119, and *Nostoc* sp. strain 6719. *J. Bacteriol.* 145:426-435.
- HERRIDGE D.F., ATKINS, C.A. PATE, J.S. e RAINBIRD, R.M. 1978. Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of the cow pea (*Vigna unguiculata* (L) walp). *Plant Physiol.* 62:495-498.
- HOAGLAND, D.R. e ARNON, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Sta. Circ.* 347.
- HOSTALACIO, S., SODEK, L. e VALIO, I.F.M. 1985. Atividade de alantoinase e asparaginase nas diferentes partes da semente de feijão (*Phaseous vulgaris* L.). *Revta. Brasil. Bot.* 8:81-85.

- HSU, F.C., BENNET, A.B. e SPANSWICK, R.M. 1984. Concentrations of sucrose and nitrogenous compounds in the apoplast of developing soybean seedcoats and embryos. *Plant Physiol.* 75:181-186.
- HUNGRIA, M., NEVES, M.C.P. e VICTORIA, R.L. 1985. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. I. Atividade da nitrogenase, da redutase do nitrato e transporte do nitrogênio na seiva do xilema. *Rev.Bras. C. Solo*, 9:193-200.
- IRELAND, R.J. e JOY, K.W. 1981. Two routes for asparagine metabolism in *Pisum sativum* L. *Planta*, 151:289-292.
- JOY, K.W., BAVER, A. e INGLIS, A. 1976. Amide metabolism in pea seedlings. *Plant Physiol.* 57:205.
- KAUL, A.K. 1973. Mutation breeding and crop protein improvement. In: *Improving Plant Protein by Nuclear Techniques*. IAEA, pp. 1-106.
- LAYZELL, D.B. e LARUE, T.A. 1982. Modeling C and N transport to developing soybean fruits. *Plant Physiol.* 70:1290-1298.
- LEA, P.J. e FOWDEN, L. 1975. Asparagine metabolism in higher plants. *Biochem. Biophys. Pflanzen*, 168:3-14.

- LEA, P.J. e MIFLIN, B.J. 1974. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, 251:614-618.
- LEA, P.J. e MIFLIN, B.J. 1980. Transport and metabolism of asparagine e other nitrogen compounds within the plant. In: *The Biochemistry of Plants*. Academic Press, Inc. vol.5, pp.569-607.
- LEA, P.J., FOWDEN, B.J. e MIFLIN, B.J. 1976. Asparagine breakdown in the leaves and maturing seeds. *Plant Physiol.* 57:5-40.
- 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., HUGHES, J.S. e MIFLIN, B.J. 1979. Glutamine and asparagine dependent protein synthesis in maturing legume cotyledons cultured in vitro. *J. Exp. Bot.* 30:529-537.
- LEE, K.L. e ROUSH, A.H. 1964. Allantoinase assays and their application to yeast and soybean allantoinases. *Arch. Biochem. Biophys.* 108:460-467.
- LEHNINGER, A.L. 1984. *Princípios de Bioquímica*. W.R.Lodi e A.A. Simões (trad.). Sarvier Editora, São Paulo, SP, pp. 71-90.

- LEWIS, O.A.M. 1975. An ^{15}N - ^{14}C study of the role of the leaf in the nutrition of the seed of *Datura stramonium* L. J. Exp. Bot. 26:361-366.
- LEWIS, O.A.M. e PATE, J.S. 1973. The significance of transpirationally derived nitrogen in protein synthesis in fruiting plants of pea (*Pisum sativum* L.). J. Exp. Bot. 24:596-609.
- LICHTNER, F.T. e SPANSWICK, R.M. 1981. Electrogenic sucrose transport in developing soybean cotyledons. Plant Physiol. 67:869-874.
- LINSMAIER, E.M. e SKOOG, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum 18:100-127.
- LLOYD, N.D.H. e JOY, K.W. 1978. Two-hydroxysuccinamic acid: a product of asparagine metabolism in plants. Biochem. Biophys. Res. Commun. 81:186-192.
- LYZNIK, L.A., ZDROJRWSKI, W., NEUMANN, M., MACEWICZ, J. e RACZYNSKA-BOJANOWSKA, K. 1982. A possible role of pedicel-placental-lazal tissue in the amino acids supply to the developing maize endosperm. Maydica, 27:191-198.
- MACCLURE, P.R. e ISRAEL, D.W. 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. Plant Physiol. 64:411-416.

- MACNICOL, P.K. 1977. Synthesis and interconversion of amino acids in developing cotyledons of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* 60:344-348.
- MATSUMOTO, T., YAMAMOTO, M. e YATAZAWA, Y. 1976. Role of root nodules in the nitrogen nutrition of soybeans. II. Fluctuation in allantoin concentration of the bleeding sap. *J. Sci. Soil Manure*, 47:463-469.
- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M. e YAMAMOTO, Y. 1977a. Distribution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulation soybean plants. *Plant Cell Physiol.* 18: 353-359.
- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M. e YAMAMOTO, Y. 1977b. Incorporation of $^{15}\text{N}_2$ into allantoin in nodulated soybean plants supplied with $^{15}\text{N}_2$. *Plant Physiol.* 18:459-462.
- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M. e YAMAMOTO, Y. 1977c. Effects of exogenous nitrogen compounds on the concentration of allantoin and various constituents in several organs of soybean plants. *Plant Cell Physiol.* 18:613-624.

- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M. e YAMAMOTO, Y. 1978. Allantoin metabolism in soybean plants as influenced by grafts, a delayed inoculation with *Rhizobium* and a late supply nitrogen compounds. *Plant Cell Physiol.* 19:1161-1168.
- MEINSTER, A. 1974. The enzymes. Ed. P.D. Boyer. Acad. Press. New York, Vol. 10, pp. 699-754.
- 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. *Plant Physiol.* 8:299-329.
- MIFLIN, B.J. e LEA P.J. 1980. Ammonia assimilation. IN: B. J. Miflin (ed.). *The Biochemistry of Plant*, vol.5, pp.169-202.
- MIFLIN, B.J. e LEA, P.J. 1982. Ammonia assimilation and amino acid metabolism. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*. D.Boulter, B. Partier, eds. Springer-Verlag, Berlin, pp.5-64.
- MINCHIN, P.E.H. e THORPE, M.R. 1984. Apoplastic phloem unloading in the stem of bean. *J.Exp. Bot.* 35:538-550.

- MILLERD, A., SPENCER, D., DUDMAN, W.F. e STILLER, M. 1975. Growth of immature pea cotyledons in culture. *Aust. J. Plant Physiol.* 2:9-51.
- MIRANDA, M. P. e SODEK, L. 1982. Controle de floração em soja (cv. Santa Rosa) como meio de obter plantas de tamanho de terminado em qualquer época do ano. XXXIV S.B.P.C., Campinas, SP, Resumo 11-G1-10.
- MIRANDA, M.A.C., MAYASAKA, S., MASCARENHAS, H.A.A. e ROSSETTO, D. 1977. Melhoramento de soja no estado de São Paulo. In: Soja no Brasil Central. Fundação Cargil, Campinas, SP, pp. 25-54.
- MISRA, S. e OAKS, A. 1985. Glutamine metabolism in corn kernels cultured in vivo. *Plant Physiol.* 77:520-523.
- MORI, T.E.S. 1981. Metabolismo do nitrogênio durante a fase do desenvolvimento reprodutivo da soja. Tese de Mestrado. Inst. de Biologia - UNICAMP- Campinas, SP.
- MURRAY, D.R. 1983. Changes in free amino acid and amide composition during fruit and seed development of garden pea, *Pisum sativum* L. *New Phytol.* 93:33-41.
- MURRAY, D.R. e CORDOVA-EDWARDS, M. 1984a. Amino acid and amide metabolism in the hulls and seeds of developing fruits of gar-

- den pea, *Pisum sativum*. I. Glutamine. *New Phytol.* 97:243-252.
- MURRAY, D.R. e CORDOVA-EDWARDS, M. 1984b. Amino acid and amide metabolism in the hulls and seeds of developing fruits of garden pea, *Pisum sativum*. II. Asparagine. *New Phytol.* 97: 253-260
- MURRAY, D.R. e KENNEDY, I.R. 1980. Changes in activities of enzymes of nitrogen metabolism in seedcoats and cotyledons during embryo developing in pea seeds. *Plant Physiol.* 66:782-786.
- MYASAKA, S. 1977. Botânica, origem e dissiminação. In: A soja no Brasil central. Fundação Cargil, Campinas, SP, pp. 3-21.
- OAKS, A., ASLAM, M. e BOESEL, I. 1977. Ammonium and amino acids as regulators of nitrate reductase in corn roots. *Plant Physiol.* 59:391-394.
- OHYAMA, T.K. e KAMAZAWA, 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. 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.* 25:9-19.

- PATE, J.S. 1971. Movement of nitrogen solutes in plants. In: Nitrogen-15 in soil plant studies. Int. At. Energy Agency, Vienna. IAEA - PL - 341/13:165-187.
- PATE, J.S. 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:313-340.
- PATE, J.S. WALLACE, W. 1964. Movement of assimilated nitrogen from the root system of the field pea (*Pisum arvense* L.). *Ann. Bot.* 28:83-99.
- PATE, J.S., SHARKEY, P.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. Functional economy in terms of carbon, nitrogen, water. *Plant Physiol.* 59:506-510.
- PATE, J.S., ATKINS, C.A., WHITE, S.T., RAINBIRD, R.M. e WOO, K.C. 1980. Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. *Plant Physiol.* 65:961-965.

- PATE, J.S., PEOPLES, M.B. & ATKINS, C.A. 1984. Spontaneous phloem bleeding from cryopunctured fruits of a ureide-producing legumes. *Plant Physiol.* 74:499-505.
- PATRICK, J.W. & MCDONALD, R. 1980. Pathway of carbon transport within developing ovules of *Phaseolus vulgaris* L. *Austr.J. Plant Physiol.* 7:671-684.
- PEOPLES, M.B., PATE, J.S., ATKINS, C.A. & MURRAY, D.R. 1984. Economy of water, carbon, and nitrogen in the developing cowpea fruit. *Plant Physiol.* 77:142-147.
- PEOPLES, M.B., PATE, J.S. & ATKINS, C.A. 1985a. The effect of nitrogen source on transport and metabolism in fruiting plants of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) walp). *J. Exp. Bot.* 36:567-582.
- PEOPLES, M. B. , PATE, J.S., ATKINS, C.A. & MURRAY, D.R. 1985b. Economy of water, carbon and nitrogen in the developing cowpea fruit. *Plant Physiol.* 77:147-157.
- POLACCO, J.C., THOMAS, A.L. & BLEDSOE, P.J. 1982. Soybean seed urease null produces in cell culture. *Plant Physiol.* 69: 1233-1240.

- PREMAKUMAR, R., SORGER, G.J. e GOODEN, D. 1978. Stability of messenger RNA for nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Acta* 519:275-278.
- PREMAKUMAR, R., SORGER, G.J. e GOODEN, D. 1979. Nitrogen metabolite repression of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 137:1119-1126.
- RAINBIRD, R.M., THORNE, J.H. e HARDY, R.W.F. 1984. Role of amides, amino acids, and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. *Plant Physiol.* 74:329-334.
- REIS, B.G. 1956. O feijão soja no Rio Grande do Sul. Secretaria da Agricultura. Sec. Inf. Agric. Circular nº 4.
- REYNOLDS, P.H.S., BOLANO, M.J., BLEVINS, D.G., SCHUBERT, K.R. e RANDALL, D.D. 1982. Enzymes of amide and ureide biogenesis in developing soybean nodules. *Plant. Physiol.* 69:1334-1338.
- RHODES, D., RENDON, G.A. e STEWART, G.R. 1975. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. *Planta*, 125: 201-211.
- RHODES, D., RENDON, G.A. e STEWART, G. R. 1976. The regulation of ammonia assimilation enzymes in *Lemna minor*. *Planta*, 129:

203-210.

- RHODES, D., SIMS, P.A.P. e ETEWART, G.R. 1979. Nitrogen assimilation in plants. E.J. Hewitt and C.V. Cutting (eds.). Academic Press, New York, pp. 501-520.
- RIJVEN, A.H.G.C. 1956. Glutamine and asparagine as nitrogen sources for the grow of plant embryos in vitro : a comparative study of 12 species. Aust. J. Biol. Sci. 9:511-527.
- ROBERTSON, J.G., WARBUTON, M.P. e FARDEN, K.J. 1975. Induction of glutamate synthase during nodule development in Lupin. FEBS Lett. 55: 33-37.
- ROGNES, S.E. 1975. Glutamine-dependent asparagine synthetase from *Lupinus luteus*. Plant Physiol. 6:3250-3258.
- SCHAEFER, J., SKOKUT, T.A., STEJSKAL, E.O., MCKAY, R.A. e VARNER, J.E. 1981. Asparagine amide metabolism in developing cotyledons of soybean. Proc. Natl. Acad. Sci. 78:5978-5982.
- SCHMITT, M.R., HITZ, W.D., LIN, W. e GIAQUINTA, R.T. 1984. Sugar transport into protoplasts isolated from developing soybean cotyledons. II. Sucrose transport kinetics, selectivity, and modeling studies. Plant Physiol. 75:741-746.

- SCHUBERT, K.R. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants : synthesis, transport, and metabolism. *Plant Physiol.* 37:539-574.
- SCHUBERT, K.R. e BOLAND, M.J. 1984. The cellular and intracellular organization of the reaction of ureide biogenesis in nodules of tropic legumes. In: *Advances in Nitrogen Fixation Research*. C. Veeger and W.E. Neutron (eds.), Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 445-451.
- SCOTT, D.B. 1978. Ammonia assimilation in N_2 -fixing systems. In: *Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics*. J. Dobereiner, R.H. Burris, A. Hollander, A.A. Franco, C.A. Neyra e D.B. SCOTT (eds.). Vol. 10, Plenum Pub. Co. New York, pp. 223-235.
- SHELP, B.J. e IRELAND, R.J. 1985. Ureide metabolism in leaves of nitrogen-fixing soybean. *Plant Physiol.* 77:779-783.
- SKOKUT, T.A., VARNER, J.E., SCHAEFER, J., STEJSKAL, E.O. e MCKAY, R.A. 1982. [^{15}N] NMR determination of asparagine and glutamine nitrogen for synthesis of storage protein in developing cotyledons of soybean in culture. *Plant Physiol.* 69:308-313.
- SODEK, L. 1976. Biosynthesis of lysine and other amino acids in developing maize endosperm. *Phytochemistry*, 15:1903-1905.

- SODEK, L. 1980. Enzymologia da utilização de amidas em sementes imaturas. Tese de Livre Docência. Instituto de Biologia. UNICAMP, Campinas, SP.
- 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.
- SPRENT, J.I. 1980. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. *Plant Cell Environ.* 3:35-43.
- STEWART, G.R., MANN, A.F. e FEUTEM, P.A. 1980. Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. IN: *The Biochemistry of Plants*. B. J. Miflin (ed.). vol.5. pp. 271-327.
- STOREY, R. e BEEVERS, L. 1978. Enzymology of glutamine metabolism related to senescence and seed development in the pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* 61:494-500.
- STOREY, R. e REPORTER, M. 1978. Amino acid metabolism in developing soybean (*Glycine max*): Glutamate syntase in the cotyledons. *J. Can. Bot.* 56:1349-1356.

- STEETER, J.G. 1977. Asparaginase and asparagine transaminase in soybean leaves and root nodules. *Plant Physiol.* 60:235-239.
- STEETER, J.G. 1979. Allantoin and allantoic acid in tissue and stem exudate from field-grown soybean plants. *Plant Physiol.* 63:478-480.
- TA, T.C., JOY, K.W. e IRELAND, R.J. 1984. Amino acid metabolism in pea leaves. Utilization of nitrogen from amide and amino groups of [^{15}N]asparagine. *Plant Physiol.* 74:822-826.
- TAJIMA, S. e YAMAMOTO, Y. 1975. Enzymes of purine catabolism in soybean plants. *Plant Physiol.* 16:271-281.
- TAJIMA, S., YAMAZAWA, 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
- THING, I.P. e ZSCHOCHE, W.C. 1970. Asparagine biosynthesis by cotton roots carbon dioxide fixation and cyamide incorporation. *Plant Physiol.* 45:429-434.
- THOMAS, R.J. e SCHRAEDER, L.E. 1981. Ureide metabolism in higher plants. *Phytochemistry*, 20:361-371.

- THOMAS, R.J., FELLER, V. e ERISMANN, K.H. 1979. The effect of different inorganic nitrogen sources and plant age on the composition of bleeding sap of *Phaseolus vulgaris*. *New Phitol.* 82:657-669.
- THOMPSON, J.F., MADISON, J.T. e MUENSTER, A.E. 1977. In vitro culture of immature cotyledons of soya bean (*Glycine max* L. Merrill). *Ann. Bot.* 41:29--39.
- THORNE, J.H. 1980. Kinetics of ^{14}C -photosynthate uptake by developing fruit. *Plant Physiol.* 65:975-979.
- THORNE, J.H. 1981. Morphology and ultrastructure of maternal seed tissue of soybean in relation to the import of photosynthate. *Plant Physiol.* 67:1016-1025.
- THORNE, J.H. 1982. Temperature and oxygen effects on ^{14}C -photosynthate unloading and accumulation in developing soybean seeds. *Plant Physiol.* 69:48-53.
- THORNE, J. H. 1985. Phloem unloading of C and N assimilates in developing seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36:317-343.
- THORNE, J.H. e RAINBIRD, R.M. 1983. An in vivo technique for the study of phloem unloading in seedcoats of developing soybean seeds. *Plant Physiol.* 72:268-271.

TRIPLET, E.W., BLEVINS, D.G. & RANDALL, D.D. 1980. Allantoic acid synthesis in soybean root nodules cytosol via xantine dehydrogenase. *Plant Physiol.* 65:1203-1206.

TROMP, J. & VAA, J.C. 1973. Spring mobilization of protein nitrogen in apple bark. *Physiol. Plant.* 29:01-05.

TULLY, R.E. & HANDSON, A.D. 1979. Amino acids translocated from turgid and water stressed barley leaves. I. Phloem exudate studies. *Plant Physiol.* 64:460-466.

TURNER, N.A. & REDGWELL, R.J. 1966. A mixed layer for separation of amino acids by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* 21:192-232.

URQUART, A.A. & JOY, K.W. 1981. Use of phloem exudation technique in the study of amino acid transport in pea plants. *Plant Physiol.* 68:750-754.

URQUART, A.A. & JOY, K.W. 1982. Transport, metabolism and redistribution of xylem-borne amino acids in developing pea shoots. *Plant Physiol.* 69:1226-1232.

VAN DER DRIFT, C. & VOGELS, G.D. 1966. Allantoin and allantoate in higher plants. *Acta Bot. Neerl.* 15:209-214.

- VAN DER DRIFT, C., DEWINDT, F.E. e VOGELS, G.D. 1970. Allantoate hydrolysis by allantoate amidohydrolase. Arch. Biochem. Biophys. 136:273-279.
- VOGELS, C.D. e VAN DER DRIFT, G.D. 1970. Differential analyses of glyoxylate derivatives. Anal. Biochem. 33:143-157.
- VOGELS, G.D. e VAN DER DRIFT, C. 1976. Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. Bacteriol. Rev. 40:403-468.
- WALLSGROVE, R.M., HAREL, E., LEA, P.J. e MIFLIN, B.J. 1977. Studies on glutamate synthase from leaves of higher plants. J. Exp. Bot. 28:588-596.
- WIGHTMAN, F. e FOREST, J.C. 1978. Properties of plant aminotransferases. Phytochemistry, 17:1455-1472.
- WINKLER, R.G., PALACO, J.C., BLEVINS, D.G. e RANDALL, D.D. 1985. Enzymatic degradation of allantoate in developing soybean. Plant Physiol. 79:787-793.
- WINKLER, R.C., BLEVINS, D.G., POLACCO, J.C. e RANDALL, D.D. 1987. Ureide catabolism of soybeans. II. Pathway of catabolism in intact leaf tissue. Plant Physiol. 83:585-591.

WHEELER, C.I., WATTS, S.H. e HILLMAN, J.R. 1983. Changes in carbohydrates and nitrogenous compounds in root nodules of *Alnus glutinosa*. *New Phytol.* 95:209-218.

WOLSWINKEL, P. 1974. Enhanced rate of ^{14}C -solute release to the free space by the phloem of *Vicia faba* stems parasitized by *Cuscuta*. *Acta Bot. Neerl.* 23:177-188.

YEMM, E.M. e COOKING, E.C. 1955. Estimation of amino acids by ninhydrin. *Analyst.* 80:209-213.

YOUNG, E.G. e CONWAY, C.F. 1942. On the estimation of allantoin by Rimini-Schryver reaction. *J. Biol. Chem.* 142:839-853.