ATIVIDADE DA ENZIMA REDUTASE DO NITRATO (E.C. 1-6-6-1)
EM EMBRIÕES DE FEIJÃO (*Phaseolus*)
CULTIVADOS 'IN VITRO'

LEONARDO ALVES CARNEIRO

Orientador: Prof. Dr. OTTO JÉSU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1989

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Carneiro, Leonardo Alves

C289a Atividade da enzima redutase do nitrato
(E.C. 1-6-6-1) em embriões de feijão (*Phaseolus*)
cultivados "in vitro". Piracicaba, 1989.
140p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Feijão - Atividade enzimática 2. Feijão -
Cultivo "in vitro" 3. Feijão - Redutase do nitrato
I. Escola Superior de Agricultura Luiz de
Queiroz, Piracicaba

CDD 635.652

ATIVIDADE DA ENZIMA REDUTASE DO NITRATO (E.C. 1-6-6-1)
EM EMBRIÕES DE FEIJÃO (*Phaseolus*)
CULTIVADOS 'IN VITRO'

Leonardo Alves Carneiro

Aprovado em: 08/03/1990

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Murilo de Melo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Gilberto Kerbaux

Inst.Biociências/USP

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo
Orientador

A DEUS

pela oportunidade da vida e deste trabalho

A ANA MARIA

*pelo caminho, pelo entendimento, pelo desvelo, pela
responsabilidade, pelo amor, por além de esposa
ser companheira.*

DEDICO.

A PRISCILA, TALITA e LETÍCIA

*"quando brotarem as flores
quando crescerem as matas
quando colherem os frutos
digam o gosto pra mim".*

*pela felicidade de reencontrar vocês nesta vida,
as minhas filhas.*

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo, pela orientação, estímulo, amizade e lições de dinamismo.
- Ao Pesquisador José Barbosa Cabral (IPA) pelos ensinamentos, incentivo e amizade.
- À Direção do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ) e à Direção do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pela possibilidade de realização deste trabalho nas instalações dessas instituições.
- A Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP, em especial à Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas pela oportunidade na realização deste Curso.
- Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro para a realização do Curso.
- À Universidade do Estado do Rio de Janeiro pelo apoio durante a realização deste Curso.
- À Direção da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA pela concessão de alguns cultivares utilizados neste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Murilo de Melo pelas sugestões e incentivo.
- Aos Professores da ESALQ pelo incentivo e colaboração: Antonio Natal Gonçalves, Luis Antonio Gallo, Tarley Ariel Botrel, Marcos V. Folegatti, Antonio Roque Dechen, Quirino Augusto Carmelo.
- Aos Funcionários do CEBTEC - Enio Tiago de Oliveira, Maria Solizete Granziol, Claudionor Otavio Rocha, Romeu A. Rocha, João Chaddad, José Soares de Almeida, Euclides Valdo Filho, Egídio Miguel Campagnol, Vera Moretti, Antonio F. Amaral e Pedro Perim pela colaboração e solicitude.

- Aos Funcionários do CENA - Carlos Dorelli, João Salvador, José Benedito e Dirley Silva pela colaboração e atenção.
- Aos Pesquisadores e colegas de Pós-Graduação - Fernando Broetto, Helaine Carrer e Marina Y. Murayama pelas sugestões, incentivo e amizade.
- Aos Pesquisadores e colegas de Pós-Graduação - Sandra Tabai, Jeanette I. Miachir, Ila Cardin, José Contado, Paulo Kock, Maria Aparecida Schiavuzzo, Elba Moyses, Sergio Marques Junior e Marcelo Villon pelo incentivo a amizade.
- Aos Amigos do Rio de Janeiro - Sergio Marzulo, Fernando Arbex, Luiz Antonio da Silva Leite e José Carlos Vilella pela colaboração naquela cidade.
- Aos Colegas da UERJ que me substituíram no período de meu afastamento.
- A José Alves Carneiro e Emilia Conceição meus pais, meus agradecimentos especiais pelo estímulo e formação e auxílio em diversas oportunidades.
- A José Barros, Iracy Barros e Maria Conceição Barros (sogra e cunhada) pelo apoio.
- Ao Dr. Caiuby de Arruda por sua competência médica.
- A Sra. Diva Crocomo por sua amizade.
- A Jorge Luiz Diorio pelos serviços datilográficos.
- A todos com quais convivi no transcorrer desse curso, mesmo aqueles que não consegui entender.

"Por toda a parte a Ciência contribui para crescer o bem-estar. Poder-se-á dizer que já se haja chegado à perfeição? Oh! não, certamente; mas, o que já se fez deixa prever o que, com perseverança, se logrará conseguir, se o homem se mostrar bastante avisado para procurar a sua felicidade nas coisas positivas e sérias e não em utopias que o levam a recuar em vez de fazê-lo avançar".

(Allan Kardec)

ÍNDICE

	Página
RESUMO	xiii
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Cultura de embriões "in vitro"	04
2.2. Eventos bioquímicos da germinação	08
2.3. Proteínas da semente	15
2.3.1. Classificação	15
2.3.2. Mobilização	17
2.3.3. Síntese	22
2.4. Enzima redutase do nitrato	25
2.4.1. Tipos de enzimas	25
2.4.2. Tipos de ensaios	27
2.4.3. Regulação	32
2.4.4. Distribuição	44
2.4.5. A enzima e a produção da cultura ..	49
3. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1. Obtenção de sementes	52
3.2. Cultivo "in vitro" dos embriões	55
3.2.1. Constituição dos meios de cultura .	55
3.2.2. Inoculação dos embriões	56
3.3. Germinação de sementes	58
3.4. Determinação da atividade da enzima <u>reduta</u> se do nitrato	59
3.5. Determinação de proteína solúvel	61
3.6. Determinação do nitrogênio total	61

3.7. Determinação da percentagem da massa de <u>ma</u> <u>t</u> éria seca	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1. Análise de eixos embrionários cultivados "in vitro"	63
4.1.1. Percentuais de massa de <u>ma</u> t <u>é</u> ria se- ca	63
4.1.2. Níveis de <u>n</u> itrogênio total, <u>pro</u> te <u>i</u> na solúvel e atividade da enzima <u>re</u> dutase de nitrato (EC 1-6-6-1) por grama de massa de <u>ma</u> t <u>é</u> ria seca	66
4.1.3. Níveis de <u>n</u> itrogênio, <u>pro</u> te <u>i</u> na solú- vel e atividade da enzima <u>re</u> du <u>t</u> ase de nitrato (EC 1-6-6-1) por unidade de embrião	74
4.1.4. Atividade específica da enzima <u>re</u> du- tase do nitrato (EC 1-6-6-1) em ei- xos embrionários "in vitro"	80
4.2. Análise de eixos embrionários retirados de sementes germinadas em água e em solução de nitrato	83
4.2.1. Percentuais de massa de <u>ma</u> t <u>é</u> ria se- ca	83
4.2.2. Níveis de <u>n</u> itrogênio total, <u>pro</u> te <u>i</u> - na solúvel e atividade da enzima <u>re</u> dutase de nitrato (EC 1-6-6-1), por grama de massa de <u>ma</u> t <u>é</u> ria seca	86
4.2.3. Níveis de <u>n</u> itrogênio total, <u>pro</u> te <u>i</u> - na solúvel e atividade da enzima <u>re</u> du <u>t</u> ase de nitrato (EC 1-6-6-1) por unidade de tecido	96

4.2.4. Atividade específica da enzima redutase de nitrato (EC 1-6-6-1) em eixos embrionários retirados de sementes após a germinação	103
5. CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

ATIVIDADE DA ENZIMA REDUTASE DO NITRATO (E.C. 1-6-6-1)
EM EMBRIÕES DE FEIJÃO (*Phaseolus*)
CULTIVADOS 'IN VITRO'

Autor: LEONARDO ALVES CARNEIRO
Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CRÓCOMO

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo acompanhar alguns eventos bioquímicos ocorridos na germinação de embriões de feijão *Phaseolus* mantidos "in vitro". Para tanto, determinaram-se os níveis de atividade da enzima Redutase do Nitrato (NR) nestes embriões, estabelecendo-se comparações com o perfil de desenvolvimento quando os mesmos estão em presença dos cotilêdones.

Essa enzima foi escolhida primeiramente por ser de importância fundamental no metabolismo de compostos nitrogenados da planta, atuando na fase inicial de redução do nitrogênio nitrato, essencial para o desempenho de outros eventos metabólicos.

Os embriões foram cultivados em meio com nitrato e amônia, meio somente com nitrato e meio sem nitrato ou amônia.

Para os ensaios foram utilizadas sementes de feijão das espécies *Phaseolus vulgaris* (cultivares Gordo e Masterpiece), *Phaseolus acutifolius* (cultivar Tepari Branco)

e *Phaseolus lunatus* (cultivar CIAT) que estão sendo usados em cruzamentos interespecíficos na busca de híbridos mais tolerantes a estresse hídrico e a altas temperaturas através do resgate de embriões "in vitro". O conhecimento das características dos embriões dos pais quando germinados "in vitro" se faz necessária para assegurar que este processo, quando experimentado pelos embriões híbridos, não venha a ser um fator limitante na obtenção de plantas.

A atividade da enzima NR, a taxa de nitrogênio total, o nível de proteína solúvel e a porcentagem da massa de matéria seca foram analisadas no 3º, 7º, 10º e 14º dias.

Neste contexto a atividade da enzima NR poderia ser usada futuramente como um dos critérios para seleção de cultivares, para o programa de cruzamentos, com sucesso na fase de salvamento de embriões.

Os resultados obtidos indicaram que as quatro cultivares analisadas apresentaram aumento nos níveis da atividade da enzima ao longo de 14 dias. Em todos os tecidos a enzima se mostrou induzível pelo substrato.

Um dos cultivares (Tepari Branco) apresentou-se retardatário em relação aos demais, na fase de embebição do embrião em relação aos demais cultivares analisados.

A análise de nitrogênio total e proteína solúvel por embrião mostraram-se mais consistentes com os eventos da germinação já descritos na literatura.

x.

Os embriões germinados com os cotilédones têm todos os parâmetros acima referidos, mais elevados do que aqueles observados "in vitro".

Sementes embebidas em água por 18 horas apresentaram embriões com a atividade mínima da enzima NR.

O comportamento da atividade específica da enzima no período, indica a possibilidade de ser usada como critério para o acompanhamento do desenvolvimento de eixos embrionários "in vitro".

NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN BEAN (*Phaseolus*)
EMBRYOS CULTIVATED "IN VITRO"

Author: LEONARDO ALVES CARNEIRO
Adviser: Prof. Dr. OTTO JESU CRŐCOMO

SUMMARY

The objective of the present research work was to follow some biochemical events occurring during the germination of bean (*Phaseolus*) embryos maintained "in vitro" and "in vivo" conditions. The biochemical parameter chose was the activity of nitrate reductase (NR)(E.C. 1-6-6-1), comparing its profiles in excised embryos with those in the presence of cotyledons.

Nitrate reductase was selected due to the fundamental role this enzyme plays in plant nitrogen metabolism, starting with the reduction of nitrate nitrogen, essential to the development of subsequent metabolic events, leading to proteins and other nitrogen compounds.

The embryos were cultivated in medium with nitrate and ammonia, in the presence of only nitrate, and in medium without nitrate or ammonia.

Seeds of three different *Phaseolus* species were used: *P. vulgaris* (cv. Gordo and Masterpiece), *P. acutifiliolus* (cv. Tepari Branco), and *P. lunatus* (cv. CIAT). These species

and cultivars are being used in interespecific crosses followed by embryo rescue in the search for hybrids tolerant to stress conditions such as drought and high temperature. The knowledge of biochemical characteristics of the embryos of the parents, as they are maintained "in vitro", is important because they will influence in the behavior of the hybrid embryos.

NR activity could be used in the future as a selection criteria for cultivars in a wide cross program, with success in the embryo rescue phase.

In this research work was measured NR activity, total nitrogen, soluble protein, dry matter in the: 3rd, 7th, 10th and 14th days. All 4 cultivars showed about the same pattern of NR levels along the experimental period, and in all tissue the enzyme was induced by the substrate.

The cv. Tepari Branco was less effective than the other cultivars in relation to water uptake by the embryo.

Total nitrogen and soluble protein, when measured in relation to embryo unit, showed the same pattern as those found in the pertaining literature.

When in presence of the cotyledons ("in vivo" conditions), the embryos showed increase in all above parameters.

The enzyme activity was reduced to a minimum in embryos maintained in water for 18 hours.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de feijão no Brasil tornou-se importante pela quantidade de proteína existente em suas sementes (CROCOMO et alii, 1976 e ROMANI, 1983). Como compõe a dieta básica da população, torna-se o complemento parcial, quando não o único suplemento da sua necessidade proteica. Anualmente um número cada vez maior de pessoas são alijadas do consumo de proteína animal pelo seu elevado custo, aumentando a demanda do uso de proteína vegetal na alimentação e a importância social desta leguminosa. O feijão apresenta ainda a vantagem de ser uma cultura de tempo curto e gerar renda para a população rural.

Apesar de ser um dos maiores produtores mundiais de feijão, a produtividade média entre 1983 e 1986 no Brasil foi de apenas 441,5 kg/ha, segundo dados de IBGE (1986). A cultura de feijão apresenta potencial para produzir 3 toneladas/hectare segundo GUAZELLI & ROCHA (1983). O rendimento bem abaixo das reais possibilidades são explicados por que o feijão neste país é uma cultura de subsistência, o que acar-

reta o uso generalizado de cultivares menos produtivos, utilização deficiente de fertilizantes e corretivos, além de estar frequentemente consorciado com outras culturas. Somados a estes problemas se verifica em algumas regiões irregularidade na distribuição da precipitação pluvial, solos de baixa profundidade efetiva e baixa capacidade de retenção de umidade.

Assim sendo, uma das contribuições que pode ser oferecida para a reversão deste quadro, é a obtenção de genótipos adaptados às condições de clima adverso, acompanhado de manuseio adequado da cultura.

Através do cruzamento interespecífico procura-se obter híbridos que reúnam características desejáveis visando aumentar a produtividade em condições consideradas adversas como o estresse hídrico, altas temperaturas e elevada salinidade do solo. Como uma das fases do processo de obtenção do híbrido é o resgate do embrião através do cultivo "in vitro" antes que ocorra seu abortamento na vagem torna-se importante entender como se comportam os embriões dos pais quando submetidos à germinação "in vitro", para formalizar previsões do desenvolvimento do embrião híbrido e consequentemente esta fase não se constituir num passo limitante na obtenção da planta.

Por ser uma enzima importante, tanto na redução inicial do nitrogênio, como na aferição de fatores metabólicos como o estado energético, utilização de esqueletos

carbônicos e presença da síntese proteica, escolheu-se a determinação da atividade da enzima redutase de nitrato (E.C.-1-6-6-1) como marcador bioquímico do desenvolvimento de embrião "in vitro".

Este trabalho se propõe a acompanhar o desempenho da enzima redutase de nitrato ao longo de um determinado período de desenvolvimento do embrião mantido "in vitro" estabelecendo-se comparações com embriões que germinam junto com os cotilédones.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura de embriões "in vitro"

A tecnologia de melhoramento de plantas utiliza em escala crescente os cruzamentos interespecíficos, que ensinam a transferência de caracteres desejáveis de uma espécie nativa para outra comercial.

Desde MENDEL (1866) que foi o primeiro a relatar hibridização interespecífica do gênero *Phaseolus* até hoje, tenta-se resolver com esta técnica problemas tais como adaptações a baixa disponibilidade de água, altas ou baixas temperaturas, resistência a doenças, tolerância a altas concentrações de sais ou elementos específicos, aumento da produtividade e características nutricionais desejáveis dos grãos.

Nas plantas que receberam o material genético a fertilização é seguida do início de desenvolvimento do embrião. Entretanto, a partir de um dado momento surgem irregularidades fisiológicas levando eventualmente o embrião a morte e a semente aborta segundo relato de RAGHAVAM (1977).

HOHMA (1955) conseguiu "salvar" embriões considerados "não viáveis" provenientes de cruzamentos entre *P. vulgaris* e *P. acutifolius* utilizando a técnica de cultura "in vitro" do embrião.

BRAAK & KOOISTRA (1975) usaram meio de cultura para o crescimento de embriões híbridos de espécie *Phaseolus* para auxiliar a transferência de tolerância a baixas temperaturas.

O embrião de feijão tem possibilidade de ser retirado do tecido materno e cultivado "in vitro" em condições assépticas originando plantas intactas e férteis segundo confirmação de CROCOMO et alii (1979). São vários os fatores que interferem na nutrição, no crescimento e diferenciação dos eixos embrionários "in vitro" e devem ser bem conhecidos se a técnica for utilizada para cultivá-los fora do meio natural que é o óvulo, conforme relato de CROCOMO & CABRAL (1986).

BANDEL (1979) cita que células fora da estrutura da planta não sofreram a influência de todas as demais células do organismo mas somente daquelas que se encontram na cultura.

CABRAL (1985) demonstrou a possibilidade de cultivo "in vitro" de embriões advindos de cruzamentos interespecíficos entre espécies de *Phaseolus*, levando a formação de plantas híbridas. O objetivo de seu trabalho era realizar a fertilização entre *P. vulgaris* (♀), *P. acutifolius* (♂), e *P. vulgaris* (♀) e *P. lunatus* (♂).

P. vulgaris L. cultivados na região semi-árida do Nordeste e em outras regiões semi áridas dos Estados Unidos e México e *P. acutifolius* A. Gray foram usados como fontes de resistência a tais condições climáticas.

Foi obtido sucesso no cruzamento de *P. vulgaris* e *P. acutifolius* conseguindo-se uma planta híbrida com a transferência para *P. vulgaris* da característica do sistema radicular pivotante com mais de 90 centímetros de comprimento encontrada na espécie *P. acutifolius*.

Diversos eixos embrionários provenientes da polinização cruzada de outras espécies de *Phaseolus* não conseguiram se desenvolver no meio de cultura constituindo-se este fator limitante no fluxograma de obtenção da planta híbrida. Outro grande obstáculo foi a passagem das plântulas do meio de cultura para o vaso. ALVAREZ et alii (1981) já haviam relatado perda de 50% das plantas transplantadas.

Muitos estudos foram feitos sobre o desenvolvimento embrionário de *Phaseolus*, a sua morfologia e os fatores que podem influenciar seu desenvolvimento.

MARTIN et alii (1980) estudaram o período embrionário no desenvolvimento de sementes de *Phaseolus vulgaris*, o qual durou 55 dias.

MORRIS (1978) observou que extratos de sementes imaturas de *Phaseolus vulgaris* continham quantidades de um regulador de crescimento com propriedades cromatográficas e fisiológicas semelhantes às do ácido abscísico (ABA).

PADMANABAHAN (1967) usou embriões de sementes de *Phaseolus vulgaris* "in vitro" para estudar relações hospedeiras-parasitas.

GALLO et alii (1978) estudaram a simbiose de plântulas de *Phaseolus vulgaris* obtidas de eixos embrionários cultivados "in vitro" inoculadas com *Rhizobium phaseoli*; os nódulos formados dessas plantas "in vitro" foram caracterizadas por uma alta atividade de nitrogenase que foi medida pela técnica da redução de acetileno.

SACCHI (1986) estudou alguns aspectos bioquímicos e histológicos do desenvolvimento de embriões de feijão (*Phaseolus vulgaris*) "in vitro" e concluiu que a idade mínima de embrião imaturo de feijão (*Phaseolus vulgaris*) capaz de originar plantas intactas "in vitro" é de 13 dias e que o desenvolvimento de eixos embrionários retirados de sementes maduras de feijão pode ser acompanhado pelas variações nos níveis de proteína solúvel, atividade de peroxidase e pelo perfil eletroforético das isoperoxidasas.

O Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 1987), divulgou num documento de trabalho que estavam adiantados os procedimentos de recuperação de embriões em cruzamento de *P. vulgaris* com *P. acutifolius* e *P. lunatus* e recomendou para futuras pesquisas a possibilidade de se realizar polinizações "in vitro".

CABRAL (1989) conseguiu sementes híbridas de cruzamento de feijão *Phaseolus vulgaris* cultivar Gordo com

linhagens segregantes de *Phaseolus acutifolius*. O mesmo autor realizou cruzamentos de *Phaseolus vulgaris* cultivar Gordo com linhagens segregantes de *Phaseolus lunatus*, porém obteve plantas cujas flores não chegavam a originar vagens.

2.2. Eventos bioquímicos da germinação

LABOURIAU (1983) escreveu acerca de estudos bioquímicos da germinação que da mesma forma que ainda sucede com a palavra "dormência", o termo "germinação" também é muitas vezes empregado em acepção um pouco elástica. Há estudos bioquímicos muito precisos sobre metabolismo, cujos objetos experimentais são, de fato, plântulas provenientes de sementes já germinadas e não sementes germinantes. Outros trabalhos abrangem o que se passa no embrião **antes** e **depois** da emergência: em alguns desses trabalhos a época da emergência está assinalada; em outros, não. Nos casos em que está claramente expresso tratar-se de plântulas, isto é, do produto do desenvolvimento de sementes já germinadas, nada se perde do trabalho: a informação simplesmente se transfere para o capítulo, correlato, do desenvolvimento pós-germinativo. Nos dois outros casos, porém (e especialmente no último), a informação só é útil para o estudo da germinação na medida em que se demonstra que o fenômeno em estudo não sofre alteração significativa após a emergência. O postulado, implícito em muitos trabalhos, de que isso sempre se observa, não é necessariamente verdadei-

ro, como se pode observar a propósito da absorção de água e das trocas gasosas da semente. Segundo LABOURIAU (1983) esses fenômenos sofrem alteração muito significativa após a emergência e como eles são, em alto grau, básicos, é presumível que disso possam resultar mudanças importantes em muitos outros efeitos fisiológicos quando o embrião emerge de dentro dos envoltórios seminais.

Desde o século passado, as observações de Boussingult (in STILES, 1950) demonstraram que o peso seco das sementes diminui progressivamente durante a germinação. Também, o calor de combustão das sementes, medido em amostras sucessivas por meio de um calorímetro, também decresce durante a germinação (MALHOTRA, 1934). Esses dois tipos de bem estabelecidas evidências demonstram que o processo global de germinação é um processo endergônico, que consome energia. Deste fato e do segundo Princípio da Termodinâmica decorre que o processo de germinação não é espontâneo, necessitando de contribuição de energia externa. Contudo, parte da energia consumida provém da própria semente, pois como se sabe, as sementes mortas (pelo calor, por irradiação ou por envelhecimento) não germinam, mesmo quando contêm reservas intactas e não submetidas às condições ambientais que permitem a germinação de sementes viáveis da mesma espécie conforme afirma LABOURIAU (1983).¹¹

Um resultado comum é que o início da embebição é logo seguido de rápido aumento das velocidades de con-

sumo de O_2 e de produção de CO_2 (STILES & LEACH, 1932; LEACH & DENT, 1935; BARNELL, 1937; LEOPOLD & GUERNESEY, 1954; EVENARI et alii, 1955; SPRAGG & YEMM, 1959; STILES, 1960). Es se incremento da atividade respiratória concentra-se especialmente no eixo embrionário (BARNELL, 1937; BROWN, 1943; STILES, 1960; YEMM, 1965). A coincidência sugere que o processo de germinação está estreitamente ligado ao metabolismo respiratório da semente, tanto mais que essa correlação se repete nos resultados de numerosos e variados estudos, dentre os quais ressaltam os seguintes:

- a exposição das sementes a temperaturas inadequadas para a germinação também reduz significativamente a velocidade de respiração (DAVIS, 1930; BARTON, 1945).

- a irradiação com luz ultra-violeta em doses que estimulam o crescimento embrionário também estimulam a respiração da semente.

- a diminuição e a elevação da pressão artificial de O_2 do ar afetam a respiração e a germinação do mesmo sentido (MORINAGA, 1926; WILSON, 1928; TANG, 1931).

Daí o interesse em entender os mecanismos pelos quais se inicia o metabolismo respiratório, pouco após o começo da embebição.

BEWLEY & BLACK (1978) enumeraram 4 fases para caracterizar o consumo de oxigênio dos embriões durante a germinação: 1ª fase - grande consumo de oxigênio: a respiração aumenta linearmente com o grau de hidratação do tecido. Isto

é atribuído a ativação das enzimas; 2ª fase: estabiliza-se o consumo de O_2 . A hidratação é completada e todas as enzimas respiratórias pre-existentes já estão em atividade. Estima-se também que devido a embebição do embrião e do tecido de reserva da semente (cotilédones no feijão) dispondo temporariamente de condições anaeróbicas, realizam fermentações porque a ativação das vias glicolíticas são mais rápidas do que o desenvolvimento de mitocôndrias; 3ª fase: existe um novo aumento na respiração no embrião. Aumenta a atividade enzimática por mitocôndrias recém-criadas para atender a proliferação celular. O número de mitocôndrias no tecido de reserva também aumenta associada com a mobilização das reservas; a 4ª fase só ocorre nos tecidos de reserva e coincide com sua senescência. Os níveis respiratórios das fases 1 à 4 variam de espécie para espécie para cada fator como a taxa de embebição, permeabilidade do oxigênio, taxas metabólicas e condições ambientais como a temperatura.

Os resultados dos estudos sobre a respiração das sementes germinantes, consistem em que depois da fase inicial de aumento impressionante de velocidade de respiração intervém uma fase de estabilização, seguida de novo aumento acelerado após a emergência. Também tem sido repetidamente observado que a velocidade de consumo de oxigênio se estabiliza antes da velocidade de produção de CO_2 . Essas diferenças cinéticas entre o consumo de O_2 e a produção de CO_2 também aparecem nos experi-

mentos em que se estudam os efeitos, da supressão dos tegumentos (decorticação) e do aumento da pressão parcial do O_2 no metabolismo respiratório da semente germinante. Em ambos os casos, a velocidade de consumo de O_2 aumenta consideravelmente, enquanto a velocidade de produção de CO_2 praticamente não é afetada.

Em suma, o estudo cinético da respiração traz três aspectos de grande interesse para a análise do metabolismo energético da semente germinante: 1) o da investigação dos mecanismos pelos quais se inicia o metabolismo respiratório pouco após o começo da embebição; 2) a necessidade de esclarecer o sentido bioquímico das diferenças cinéticas entre a absorção do O_2 e a produção de CO_2 ; e 3) a inadagação de como se dá o acoplamento entre o metabolismo respiratório e os processos parciais da germinação.

Em consequência da defazagem entre estabilização da velocidade de consumo de O_2 e a da velocidade de produção de CO_2 e coeficiente respiratório sobe de um valor próximo de 1 a um nível entre 2 e 3. Isso indica que os substratos respiratórios nesta segunda fase de respiração das sementes germinantes, passam de carboidratos a ácidos, denunciando a existência de uma etapa fermentativa.

Todas as informações acima consideradas estabelecem que o metabolismo oxidativo das sementes germinantes comporta vários caminhos metabólicos que competem pelos mesmos substratos e que podem suceder uns aos outros no de-

curso do tempo de germinação ou em diferentes regiões do embrião (GOODARD & MEEUSE, 1950).

Em 1952, Stumpf, em 1959 Axelrod e Beevers e em 1959 HACKELL detectaram os substratos e as enzimas da "glicólise". Os resultados da marcação da glicose nos carbonos 1 e 6 (AXELROD & BEEVERS, 1956), a presença de NADP e não de NAD no início da germinação de trigo e de arroz MAYER & SHAIM (1974), bem como a alta atividade da desidrogenase da glicose-6 fosfato desde o início da germinação (MAYER et alii, 1966), indicam a ocorrência da "via das pentoses".

TAYLOR (1942) já atestava a fermentação alcoólica como fonte de energia em cariopses de arroz que germinaram em atmosfera de N_2 . GOKSÖYR (1953) encontrou etanol em sementes germinantes de ervilha antes da emergência sinalizando a existência de fermentação.

BONNER (1948) foi o primeiro pesquisador a evidenciar a ocorrência de "ciclo de Krebs" nas plantas. HABER & TOLBERT (1958) utilizando ^{14}C verificou que existia o "ciclo de Krebs". Várias enzimas e coenzimas desse ciclo foram detectadas em sementes germinantes conforme o trabalho de HACKETT (1959).

Hoje, tem-se então conhecimento que diversos processos se realizam concomitantemente durante a germinação.

SINNOTT (1960) e RICHARDS (1969) encontraram

uma proporcionalidade entre as velocidades específicas, de um lado, do processo que libera energia pelo metabolismo oxidativo e, de outro, do processo de desenvolvimento do embrião. Esse tipo de relação entre velocidades específicas de processos parciais é denominado relação alométrica e ocorre em muitos padrões de crescimento de plantas. O que a existência desse tipo de relação sugere é que há "acoplamento" entre o metabolismo oxidativo e o crescimento embrionário na semente germinante.

"O estudo do metabolismo energético da semente germinante mostra claramente que todos os caminhos metabólicos convergem para um mesmo resultado final, que é a síntese dos compostos ricos em energia (ATP, GTP, CTP, UTP e assemelhados). Esses compostos constituem, assim, um exemplo bastante claro daquilo que se convencionou denominar o "fundo metabólico comum" (em inglês "pool") dos fosfatos ricos em energia. A manutenção desse fundo comum é um aspecto extremamente importante da fisiologia da germinação. Por um lado, porque esses compostos ricos em energia são os atores de quase todos os acoplamentos químicos. Por outro lado, porque são precursores da biossíntese dos ácidos nucleicos segundo LA-BOURIAU (1983)."

Outro fundo comum de grande importância é o dos nucleotídeos piridínicos (NAD, NADH, NADP, NADPH). Como se sabe (cf. CHING, 1972; BEWLEY & BLACK, 1978), o fator decisivo na competição entre a glicólise e o "shunt" de pentose (para o

substrato comum glicose-1-fosfato) é o valor da relação $r = (NADP + NADPH)/(NAD + NADH)$, sendo $r < 1$ para a glicólise e $r > 1$ para o "shunt". Em muitas sementes ocorre, simultaneamente, $r > 1$ nos órgãos de reserva e $r < 1$ no eixo embrionário (YAMAMOTO, 1963). Também as formas reduzidas (NADH, NADPH) predominam sobre as formas oxidadas (NAD, NADP) como fator de crescimento de muitas sementes (YAMAMOTO, 1963).

Para cada região do eixo embrionário, tanto o crescimento como o acúmulo de produtos de anabolismo seguem um modelo sigmoidal conforme foi inicialmente demonstrado nas sementes germinantes de *Vigna sesquipedalis* (OOTA et alii, 1953). Esse modelo é característico dos fenômenos dotados de controle por retroalimentação ("feedback") (ATKINSON, 1966). Daí o interesse em procurar os mecanismos pelos quais se poderia estabelecer esse tipo de controle dos fundos metabólicos comuns. Devido à evidente importância da catálise enzimática no acoplamento entre metabolismo e crescimento na semente germinante, uma possível expressão desse fenômeno estaria na biossíntese de proteínas.

2.3. Proteínas de reserva

2.3.1. Classificação

A semente, em relação a outras partes do vegetal, possui altos níveis de proteína. Dois grupos de plan-

tas, os cereais e as leguminosas são importantes por apresentar proteína em suas sementes que irão compor a dieta de animais inclusive o homem.

Os cereais, de um modo geral, possuem 10% da massa de matéria seca sob a forma de proteína. Em sementes maduras de muitos vegetais uma quantidade maior de proteína foi encontrada, por exemplo, soja, que possui 35-40%.

Em feijões *Phaseolus vulgaris* foi encontrado em sementes com cerca de 40% de amido e 20 a 30% de proteína por grama de massa de matéria fresca (MORAES & ANGELUCI, 1971 e CROCOMO, 1976).

Nas sementes proteináceas, as proteínas se acumulam durante a maturação sob a forma de corpos proteicos ou grãos de aleurona, freqüentemente cristalinos e com inclusões de fitina e de oxalato de cálcio. Muitas vezes contêm também fosfolipídeos, triglicerídeos, proteinases e fosfatases ácidas.

As proteínas de sementes são de dois tipos: proteínas metabólicas podendo ser de caráter enzimático ou estrutural, são necessárias para funcionamento normal da célula inclusive a síntese do segundo tipo que são proteínas de reserva e proteínas de reserva, bem como os carboidratos e lipídeos são sintetizados durante o desenvolvimento da semente.

OSBORNE (1908) classificou as proteínas vegetais com base na solubilidade em água e em várias soluções, em quatro grandes grupos.

Até hoje esta classificação é usada. Proteínas solúveis em água são chamadas de albumina. Proteínas solúveis em soluções salinas são as globulinas. As solúveis em meio ácido ou soluções básicas são chamadas gluteínas. Insolúveis em água, porém solúveis em etanol 70 a 80% são as poliaminas.

Em *Phaseolus vulgaris* a maior parte das proteínas de reserva estão sob a forma de globulina e podem se subdividir em legumina e vincilina segundo OSBORNE & CAMPBELL (1896). As proteínas do tipo globulina em *Phaseolus vulgaris* tem sido pesquisada por autores como McLEESTER et alii (1973), BARKER et alii (1976), e CROCOMO (1982).

2.3.2. Mobilização

Ao iniciar-se a germinação, esses corpos proteicos se fragmentam, seja por autólise devida às suas próprias proteases (YATSU & JACKS, 1968), seja por efeito de outras enzimas da célula, reativadas por hidratação ou sintetizadas de novo (HARRIS & CHRISPEELS, 1975 em MAYER, 1977). Os produtos dessas hidrólises, conforme a enzima atuante, são peptídeos ou aminoácidos. Os peptídios, por sua vez, são hidrolizados a aminoácidos pelas peptidases.

Em *Phaseolus vulgaris* o componente proteico

é cerca de 20-30% de matéria fresca dos quais 55-60% são proteínas de reserva (LEE & CROCOMO, 1979). Esses autores também identificaram 2 tipos de vicilinas denominadas I e II e um tipo de legumina, o restante 20-25% de albumina e 10-15% de glutaminas. A análise da composição dos aminoácidos dessas proteínas indica que a legumina por possuir mais aminoácidos sulfurosos é mais importante para a alimentação que a vicilina. LEE & CROCOMO (1980) isolando ao longo do tempo da germinação suas subunidades com auxílio de técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida verificaram que a diminuição de proteínas durante a germinação ocorre na seguinte ordem: primeiro é hidrolizado a legumina seguida da vicilina I e finalmente a vicilina II, indicando que a legumina é hidrolisada imediatamente após o início da germinação. JOU & STOTZKY (1970) afirmaram que globulina e proteínas básicas no feijão diminuem rapidamente durante os 11 dias iniciais da germinação, enquanto que o decréscimo de albuminas ocorre somente nos 2 primeiros dias. LEE & CROCOMO (1980) comprovaram que a diminuição de proteínas nos cotilédones após o 3º dia foi causada pela baixa taxa de globulina, o que já tinha sido estudado por BEEVERS & SPLITTSTOESSER (1968), CATSIMPOOLAS et alii (1968) e BEEVERS (1968) também verificaram que a atividade específica das proteases em extratos de cotilédones de ervilha aumenta durante a germinação. Novas bandas obtidas ao longo do tempo da germinação pela técnica de eletroforese usando extratos de coti-

lédones revelaram o aparecimento de outras proteínas que podem ter ou não caráter de enzimas proteolíticas. (FILNER, 1969). Isto foi confirmado por LEE & CROCOMO (1980) que encontraram novas bandas de proteínas aos 10 dias de germinação sugerindo a síntese de novas proteínas neste estágio.

As enzimas envolvidas na mobilização de proteínas de reserva das sementes durante a germinação podem ser classificadas como endopeptidases ou exopeptidases, conforme a hidrólise que se verifique interna ou externamente no corpo protéico. Além disso, existem também dipeptidases específicas que são hidrolisam dipeptídeos durante a germinação. RYAN (1973) e DECHARY (1970) realizaram revisões bibliográficas sobre estas enzimas bem como seus inibidores.

Endopeptidases estão presentes em sementes em germinação ou não. MOUNFIELD (1936) mostrou que a atividade da endopeptidase em sementes de trigo em germinação permanece constante nos 2 primeiros dias aumentando rapidamente do 2º ao 4º dia e continuando a aumentar até o 7º dia. Kudryashova (1960)* verificou um aumento dessas enzimas em *Phaseolus lunatus* durante a germinação, porém Tazawa (1956)* observou um aumento da atividade da enzima seguida de uma diminuição em soja. Frequentemente os trabalhos mostram um aumento da atividade da endopeptidase a partir do 2º dia de germinação. Alguns estudos mostram que o aumento foi seguido de diminuição.

* Citados por RYAN (1973).

LEES & THOMPSON (1975) estudaram a distribuição de colinesterase em cotilédones de *Phaseolus vulgaris* e seu efeito na germinação. A atividade desta enzima triplica entre o 2º e 3º dia após a germinação e continua alta até o 6º dia, diminuindo coincidentemente com o aparecimento de sintomas morfológicos visíveis de senescência do tecido. Esta enzima, presume-se, serve para regular acetilcolina endógena.

Guardiola & Sutcliffe (1971)*removeram os eixos embrionários das sementes após 4 a 5 dias do início da germinação e determinaram os níveis de proteína total, nitrogênio solúvel em TCA e atividade da endopeptidase em cotilédones de ervilha. Concluíram que o controle da hidrólise proteica em cotilédone de ervilha não é mediado pelo nível de proteases nem pela quantidade de compostos nitrogenados acumulados. A atividade da protease parece ser controlada pelo eixo embrionário e está relacionada com a senescência dos cotilédones e transporte de nitrogênio para os eixos.

PENNER & ASHTON (1966) estudaram o controle hormonal da atividade da endopeptidase em cotilédone de abóbora e observaram que a atividade aumentou nos cotilédones durante os 3 primeiros dias e diminuiu posteriormente. A presença de eixos embrionários durante as 32 primeiras horas de germinação parecem ser pré-requisitos para a máxima atividade proteolítica. A presença de citocinina na

*Citados por LEES & THOMPSON (1975).

solução nutritiva reproduziu o efeito dos eixos embrionários mas outros hormônios não induziram este aumento. Concluíram, assim, que a síntese de endopeptidase em cotilédones de abóbora em germinação é controlada hormonalmente pelo eixo embrionário.

Yomo & Varner (1973)* mediram a taxa de aminoácidos e acharam valores maiores em cotilédones excisados do que em cotilédones intactos em ervilhas. Eles também determinaram que a atividade da endopeptidase não aumentada em cotilédones excisados enquanto em cotilédones intactos a atividade desta enzima tornava-se maior. Cotilédones excisados colocados em solução de caseína hidrolizada desenvolvem menor atividade de endopeptidase que aqueles colocados em água. Isto sugeriu que o acúmulo de aminoácidos regula a atividade da endopeptidase.

VARNER et alii (1968) germinaram sementes de ervilha em vermiculita e acompanharam a atividade de pirofosfatase, adenosina trifosfatase e amilase nos cotilédones e verificaram que os eventos metabólicos que ocorrem nos cotilédones são controlados pelos eixos embrionários. Na ausência destes sinais, cotilédones sofrem um rápido declínio na respiração e diminuem as atividades de suas enzimas.

Aminopeptidases, carboxipeptidases e dipepti-

*Citado por MAYER (1977).

dases tem sido detectadas em sementes em germinação e não germinadas. Algumas delas hoje já estão identificadas, podendo aumentar ou diminuir durante a germinação da semente, conforme a espécie.

Tem sido sugerido como mecanismo de controle destas enzimas proteolíticas: o controle hormonal de síntese de novo, inibidores endógenos, zimogênios, compartimentação, pH, substrato específico e inibição pelo produto. O estudo do controle de endopeptidases tem sido maior do que de exopeptidases.

2.3.3. Síntese

Os experimentos de incubação das sementes em presença de inibidores da síntese de proteínas mostram claramente que o embrião da semente hidratada não cresce sem uma fase, prévia, de síntese de proteínas (WALTON & SOOFI, 1979 e KLEIN et alii, 1971). A primeira pergunta que ocorre a respeito é se, antes da hidratação da semente, existem todos ou são alguns dos (numerosos e variados) ingredientes indispensáveis a esse processo. Começou-se a fazer experimentos com sementes ainda não embebidas para verificar se eram capazes de incorporar aminoácidos marcados com ^{14}C . Os resultados indicaram que em sementes de amendoim e nas cariopeses de trigo, existem quase todos os componentes necessários, exceto a ativação de RNA mensageiro que foi experimentalmente subs -

tituído pela administração de um mensageiro artificial de ácido poluiridílico por MARCUS & FEELEY (1964). DURE & WATERS (1965) provaram que além de ribossomas, RNA-transportador específicos, respectivos cofatores e RNA funcionais já estavam na semente antes da embebição. MARCUS et alii (1966) analisando extratos de sementes embebidas encontrou a formação de polissomos 10 minutos depois de iniciada a embebição. A síntese de proteína precede bastante o reinício da transcrição de novos RNAs mensageiros. GORDON & PAYNE (1976) verificaram que as proteínas sintetizadas a partir dos RNAs mensageiros de vida longa (conservados desde o fim da maturação da semente) possuíam peso molecular pequeno. CUMMING & LANE (1979) mostraram diferenças nestas proteínas e são predominantemente proteínas ribossômicas. Esses dados complementam a explicação do fato de haver grande incremento da síntese de RNA ribossomal.

A capacidade dos ribossomos de germen de trigo, preparadas de material seco, de efetuar a tradução de vários mensageiros constitui até uma demonstração de que o papel dos ribossomos na tradução é bastante inespecífico para os mensageiros. Preparações desses ribossomos, com ingredientes necessários, não só traduzem mensageiros de vírus, produzindo as respectivas proteínas (KLEIN et alii, 1972 e SHIH & KAESBERG, 1973), mas também traduzem o mensageiro da globulina de coelho, produzindo a hemoglobina correspondente (EFRON & MARCUS, 1973) e as de nódulos radiculares de legu-

minosas, produzindo duas leghemoglobinas (VERMA et alii, 1974).

WALBOT (1973) observando o desenvolvimento em brionário de duas espécies de *Phaseolus*, determinaram as taxas de síntese de RNA usando adenosina tritiada como precursor. Ribossomos de sementes nutridas com uridina tritiada durante a embriogênese foram encontradas nos polissomos durante a germinação.

Os polissomos formados durante as seis primeiras horas da germinação utilizaram ribossomos formados na em briogênese. As duas espécies de *Phaseolus* não mostraram diferenças nas taxas de síntese de macromoléculas.

LEWIS & PATE (1973) usaram asparagina como fonte de nitrogênio e mostraram que o cotilédone crescido nes tas condições tinha capacidade de sintetizar e interconverter aminoácidos.

MILLERD et alii (1975) mostraram que cotilédones imaturos de ervilha quando separados dos eixos embrionários continuaram a crescer por vários dias em meio líquido contendo nitrogênio e sintetizaram consideráveis quantidades de clorofila, amido, DNA, RNA e proteína. A proteína foi sintetizada de aminoácidos endógenos mas o suprimento de aminoácidos exógenos aumentou a síntese de proteínas. Quando os cotilédones foram destacados um dia antes do apareci mento de vicilina, esta substância foi detectada um dia depois. Isto indica que a informação genética para vicilina

estava expressa em cada cotilédone cultivado. Estes resultados não se reproduziram em presença de reguladores de crescimento na síntese de legumina.

2.4. Enzima Redutase do Nitrato

2.4.1. Tipos de enzimas

A nitrato redutase (RN) é uma enzima que cataliza a redução de nitrato a nitrito.

Esta reação pode ser representada por duas meias reações:

Resultando assim na reação: $\text{NADH} + \text{NO}_3 \rightarrow \text{NAD} + \text{NO}_2 + \text{OH}$.

Hoje são conhecidos três tipos de RN.

A forma mais comum encontrada em plantas superiores é a RN monoespecífica de NADH (EC: 1-6-6-1), a que foi isolada de tecidos de vários vegetais (NOTTON et alii, 1977; WRAY, 1982).

O outro tipo de RN isolado de folhas de soja é bioespecífico, trata-se da NAD(P)H:RN (EC 1-6-6-2)

que aceita elétrons do NADH ou do NADPH. Esta forma tem sido encontrada em numerosos tecidos (NASON & EVANS, 1953 e CAMPBELL, 1976).

O terceiro tipo de RN é aquele descrito nos recentes estudos de atividade "constitutiva" ou "não induzível" de soja e feijão (ASLAN, 1982 e RYAN et alii, 1982).

TIMPO & NEYRA (1983) colocando *Phaseolus vulgaris* para crescer em meios com diferentes fontes de nitrogênio (N_2 , NH_4 , uréia e NO_3) encontrou atividade da enzima em presença de N_2 , NH_4 e uréia e denominou-a RN constitutiva para diferenciá-la daquela RN induzida por NO_3 conforme já tinha feito BEEVER et alii (1965). Observou também que a RN constitutiva pode participar do processo de indução pelo NO_3 .

Conforme CAMPBELL & SMARELLI (1986) A RN possui coenzimas de caráter redox. Estas coenzimas são flavina adenina dinucleotídeo (FAD) citocromo b_{557} e molibdênio. Um cofator ligado ao molibdênio tem sido também identificado.

A atividade fisiológica da RN parece ocorrer com o transporte do elétron doado pelo NADH (ou NADPH) seguindo uma cadeia formada pelo FAD, citocromo b e Mo. Um grupo tiol tem papel de importância no sítio de ligação do NADH. Uma reação parcial de desidrogenase pode ocorrer pela redução da molécula de ferrocianeto entre NADH e o FAD, a redução do citocromo C entre o FAD e o citocromo b. A atividade de redução parcial pode ser representada pela doação de

FADH_2 para citocromo b e de metil viologen reduzida (MV) para o Mo conforme mostrado na Figura 1.

A enzima RN é composta por uma cadeia polipeptídica simples formando uma proteína multifuncional. Isto é, ela se compõe de domínios distintos quando a cadeia polipeptídica se fecha se compactando, formando sub-partes separadas, que não se comunicam. Um modelo entre outros, já propõe que cada domínio apresente vários grupos prostéticos. Este modelo, deduzido do trabalho de REDINBAUGH & CAMPBELL (1983) explica as propriedades catalíticas e estruturais da NR, bem como, a regulação da enzima. Operacionalmente, existe dois níveis de regulação para ser considerado, a quantidade da enzima e o nível de atividade.

Figura 1. Modelo esquemático das propriedades catalíticas da redutase de nitrato, segundo CAMPBELL & SMARELLI (1986).

2.4.2. Tipos de ensaios

Existem três tipos de ensaios para a avaliação da atividade da redutase do nitrato: 1 - ensaio de toda planta; 2 - ensaio em tecido intacto; 3 - ensaio "in vitro". Cada um des-

ses ensaios medem diferentes aspectos da atividade de redução do nitrato.

O ensaio de toda a planta é na verdade um ensaio "in vivo", quantifica todo o nitrato absorvido e reduzido e é frequentemente acoplado a medidas do aumento do nitrogênio reduzido em toda a planta.

O ensaio em tecido intacto que é conhecido como ensaio "in vivo" (segundo alguns autores erradamente, CAMPBELL & SMARELLI (1986)) mede a produção de nitrato em plantas ou pedaços de tecidos na ausência e presença de nitrato. Este ensaio é muito usado e tem formas muito modificadas (HEVER, 1978 e LAWRENCE, 1982). É dependente da presença de surfactantes ou solventes orgânicos e tem sido usado como medida de nitrato disponível na planta quando na ausência de nitrato no meio (ASLAM, 1981).

O ensaio "in vitro" é feito em preparação isolada de NR e se constitui numa medida mais direta da capacidade total de redução do nitrato, quando nenhum doador de elétrons para a redução do nitrato for limitante.

Com algumas exceções, é usado o tampão fosfato 5 mM, pH 7,5. Por esse método pode ser avaliada: 1) a atividade parcial da RN (SMARELLI & CAMPBELL, 1985 e JOLLY et alii, 1976); 2) avaliar os doadores específicos de elétrons (monoespecífico NADH ou bioespecífico NADPH (JOLLY, 1976 e ORIBUEL-IEANZA, 1980)).

JAWORSKI (1971), trabalhando com soja pode demonstrar que os ensaios "in vivo" além de terem metodologia muito simples fornecem melhores resultados do que os ensaios "in vitro" pois nesse método a atividade da enzima decaía durante o preparo de extrato. Foi este autor também que no mesmo trabalho selecionou entre outros solventes orgânicos o propanol como fator para facilitar a permeabilidade da membrana celular.

KLEPPER et alii (1971) também compararam as eficiências das determinações "in vivo" e "in vitro" e apontaram o processo "in vivo" como o que apresentou mais confiabilidade. Os indícios do estado da célula quanto a sua capacidade de dispor de carboidratos durante a redução, evidenciam que a luz tem poder inibitório sobre a redução.

STREETER et alii (1972) não encontraram diferença na atividade da RN quando trabalharam com ensaios "in vivo" e "in vitro" porém reconheceram que a primeira é de mais fácil execução, além de ser mais rápida.

RADIN (1973) fazendo ensaios "in vivo" com folhas de algodão determinou que o oxigênio diminui a atividade da enzima enquanto que com nitrogênio isso não ocorre.

CHANTAROTWONG et alii (1976) publicaram que até a partir da concentração de 5 mM de nitrato a indução da

enzima se mantém constante e encontraram uma correlação exponencial entre as atividades "in vivo" e "in vitro" da RN.

BRUNETI & HAGEMAN (1976) também acharam correlações entre a atividade "in vivo" e "in vitro". A atividade conseguida no método "in vitro" foi maior, comparada com o método "in vivo". Neste último o uso de NADH aumentou a atividade da enzima.

HAGEMAN et alii (1976) citaram um trabalho de PURVIS (1972), de que a atividade RN está relacionada somente com o nível de nitrato no tecido mas com o conteúdo proteico do grão. Diferenças genotípicas entre variedades foram responsáveis por diferentes respostas da enzima a uma mesma quantidade de nitrato disponível.

HAGEMAN et alii (1976), comparando os métodos "in vivo" e "in vitro" determinaram que apesar do primeiro apresentar uma menor atividade é mais barato e dispense menos tempo.

Neste mesmo trabalho, concluíram que a RN se constitui num fator de seleção no melhoramento genético de variedades e que através de cruzamentos específicos torna-se possível conseguir-se variedades com alta atividade de RN.

NICHOLAS et alii (1967a) fazendo ensaios "in vivo" de plantas iluminadas, verificaram que a concentração de 100 mM de tampão fosfato a pH 7,5 foi ótima como meio de trabalho para enzima.

JONES (1979) observou que o propanol e a infiltração à vácuo diminuem a concentração de nitrato endógeno, não exercendo seu efeito inibitório na enzima.

SOARES et alii (1985) sugerem que a avaliação do decréscimo de nitrato por parte de um tecido seja o parâmetro para determinar a redução de nitrato "in vivo". Segundo a autora, este é o único método que permite a determinação de redução do nitrato "in vivo" nos tecidos sob qualquer condições fisiológicas.

BLANDEL & BLAN (1975) apontam a medida de atividade da NR "in vivo" em folhas como um método que permite: 1 - um teste rápido para o diagnóstico de carência de molibdênio; 2 - apreciar o nível ótimo de fertilizante nitrogenado em função das necessidades da planta e das condições de meio ambiente e solo.

GALLO (1980) concluiu que a melhor metodologia para se avaliar a enzima em condições "in vitro" é a de incubar o ensaio enzimático utilizando-se tampão fosfato na concentração de 0,05M, contendo também nitrato na concentração de 0,05M, o pH do meio deve ser ao redor de 7,3. A mistura de reação deve ser incubada em banho maria à temperatura de 30°C e ao abrigo da luz.

JONES & MHUIMHNEACHAIN (1985) concluíram que há uma queda da atividade da enzima NR quando da fase de extração devido a uma dissociação da enzima.

Vários fatores tem sido apontados como inati-

vantes da enzima tais como: compostos fenólicos (STULEN , 1971), proteases específicas ou não (WALLACE, 1973), e inativadores ligados a enzima (TAMAYA & OHIRA, 1977). Caseína tem possibilitado a estabilidade da enzima nos testes "in vitro".

2.4.3. Regulação

A atividade de RN de folhas em plantas superiores e de outros organismos aumenta sensivelmente em presença de nitrato. Isto é chamado de indução da enzima RN pelo nitrato e é um dos poucos exemplos conhecidos de indução pelo substrato em plantas superiores.

Nas plantas superiores, especialmente as plantas cultivadas, a atividade da RN parece ser influenciada tanto pela disponibilidade de nitrato quanto por vários outros fatores. As plantas não se comportam de maneira semelhante. Umas podem ter na amônia e nos aminoácidos os repressores da atividade da NR conforme observou STWART & RHODES (1977) enquanto outras não.

A regulação da atividade da RN pode ser dividida em dois aspectos: 1) controle da quantidade de enzima e 2) controle da atividade da enzima ativa.

O equilíbrio entre dois processos opostos, o da síntese "de novo" da RN e da degradação da RN ativa, controla o nível total da enzima (BEEVER & HAGEMAN, 1980).

O nível de atividade da enzima pode ser influenciado por ativadores e inibidores e isto tem sido frequentemente demonstrado pelos estudos do aumento da atividade durante a indução pelo nitrato conforme estudos de NAIK et alii (1986) e SRIVASTAVA (1980).

O controle da atividade dependerá da disponibilidade do substrato e cofatores (nitrato e NADH ou NADPH).

A indução e a atividade pode ser influenciada por inúmeros fatores a saber: luz, nutrição mineral, hormônios vegetais, fonte de N, estresse hídrico, temperatura, idade da planta, antimetabólitos e fonte de energia (sacarose, ácidos orgânicos) (BEEVERS & HAGEMAN, 1980 e NAIK, 1986).

Amônia parece reprimir a indução da atividade da NR em raízes conforme experimentos de OAKS (1979) e RODIN (1975), enquanto que contribui para aumentar a atividade em cotilédones verdes, botões florais, plântulas e folhas, conforme citações de BEEVERS & HAGEMAN (1980), NAIK (1986), OAKS (1979), RADIM (1975) e MEHTA (1982).

Estas diferenças podem ser devidas a diferentes absorções de nitrato em presença ou ausência de amônia, mas nem todos estudos encontravam que a amônia inibe a absorção de nitrato (MACKOWN, 1982).

A planta inteira tem se mostrado um sistema complexo para o estudo da indução da RN devido a muitos fatores interagindo no processo. DUKE (1979) usou como modelo raízes de milho cultivadas em meio sem agar como vários pes

quisadores sugeriram, ou seja, estudar as células vegetais cultivadas "in vitro" (FILNER, 1971; FOLNER, 1966; HUSEMANN, 1977 e MOHANTY & FLETCHER, 1976).

HAGEMAN & FLESCHER (1960) verificaram que em presença de luz e várias concentrações de nitrato a atividade da RN é dependente de nitrato. Propuseram também que um dos mecanismos que evitaria a intoxicação de plantas por amônia seria a regulação e controle da atividade da RN.

BEEVER et alii (1965) estabeleceram por seus estudos que a concentração de 10^{-1} M de nitrato é ótima para induzir a RN. Concentrações elevadas exercem inibição desta indução em cotilédones de beterraba.

A referida indução pelo nitrato apresenta uma fase "lag" de 30 minutos. O nitrito mostrou-se negativo na indução enquanto que a amônia parecia exercer um efeito inibitório.

CHANTAROTWANG et alii (1976) também observou que a RN é induzida por concentrações crescentes de nitrato entre 0 e 5 mM, não aumentando a indução a partir desta concentração. Quanto a velocidade de absorção do nitrato, verificaram que estava mais submetida a fatores intrínsecos à planta do que com a indução da enzima.

A luz não promoveu um efeito indutor direto sob a RN, porém, sua falta provocou uma diminuição de substratos necessários aquela indução. A temperatura ótima para a indução varia entre 35 e 40°C. Na ausência de luz o nitrato tende a se acumular no vacúolo (CAMPBELL & SMARELLI, 1986).

A luz ativa o movimento dos íons pela membrana do tonoplasto. Assim, o nitrato no interior de vacúolos não promoveria o efeito indutor da enzima. A síntese "de novo" durante a indução da enzima foi comprovada quando se adicionou inibidores da síntese proteica e observou-se decréscimo na indução. Pesquisadores se preocuparam em estabelecer relação entre a atividade da RN e a luz e observaram que plantas em presença de luz absorviam mais nitrato do que plantas no escuro evidenciando a proporcionalidade do aumento de transporte de elétrons na fotossíntese com a maior atividade da RN. Isto ficou comprovado quando plantas, na ausência de CO₂, diminuíram consideravelmente a absorção de nitrato, com menor disponibilidade de esqueleto carbônico.

INGLE (1968) estudando a indução da RN, verificou que o processo de síntese proteica e de RNA sendo inibidas por actinomicina D, puramicina e ciclohezimida provoca diminuição na indução. Entretanto, a síntese RNA ribossômica e solúvel não foi estimulada pelo nitrato bem como a indução de RNA não foi acompanhada pelo aumento de proteínas, indicando que provavelmente durante a indução as proteínas sintetizadas sejam moduladores da atividade da enzima e não a própria enzima.

SLUITERS-SCHOLTEN (1973) verificou que a atividade da NADH-nitrato oxiredutase (EC 1-6-6-2) era baixa em folhas de feijão crescido no escuro, o que não ocorreu quando as folhas foram iluminadas. Nestas condições, sô havia indução da enzima na presença de nitrato.

Estes dados foram confirmados por WALLACE & STEVENS (1973), através de experimentos usando inibidores da síntese de proteína verificou que síntese de novo da RN. O tempo médio da RNA mensageiro para a enzima é de 20 minutos. Os autores também concluíram que temperaturas elevadas diminuem a atividade da RN, sendo que a enzima é mais estável na raiz do que na folha e que as plantas mais velhas tem maior tempo "turnover" do que as partes mais novas.

FRITH (1972) verificou que a atividade de NR é maior quando o crescimento das plantas se dá em solução contendo somente nitrato como fonte de nitrogênio em raízes e folhas de maçã. Ao contrário, quando a solução amoniaca é usada, e em raízes que não estavam juntos na solução nutritiva a atividade também se apresentam pequena.

KADAN et alii (1974) isolaram uma proteína que inativava a redutase do nitrato em raízes de arroz.

RADIN (1977) estudando a relação entre as taxas de amoniácidos e a indução da RN verificou que glicina, asparagina e glutamina inibiram a indução da enzima, enquanto ácido aspártico e ácido glutâmico proporcionaram a indução. A leucina exerceu um efeito contra a inibição. Todos os testes foram realizados em raízes de algodão.

OAKS et alii (1977) também obtiveram dados indicando que glutamina e aspargina causam inibição da RN. Caseína hidrolizada tem efeito similar. No mesmo trabalho com milho, encontraram que a inibição é maior em raízes maduras do que em raízes jovens.

SHANER & BOYER (1970) trabalhando com milho, observaram que atividade da RN é regulada pelo fluxo de nitrato pois que plantas crescidas com carência de água tinham pequena atividade da RN e vice-versa.

MORILLA et alii (1973) constatarem uma diminuição da atividade da RN em função do decréscimo do potencial hídrico. Houve também uma queda no conteúdo de polirribossomos nestas células. Um aumento na quantidade de polirribossomos e subsequentemente, da atividade de NR, ocorreu após o restabelecimento dos níveis normais de água em plantas de milho.

SHANER & BOYER (1976a) correlacionaram a taxa de transpiração diretamente com a atividade da RN. Quanto maior a transpiração, maior o fluxo de nitrato, com consequente aumento na atividade da enzima em folhas.

MAGALHÃES et alii (1976) analisaram o efeito da temperatura sobre o metabolismo de nitrato e expansão da folha e constatarem que, entre as enzimas participantes da assimilação do nitrogênio, a RN é a mais termolábil, pois, com o aumento de 30 para 40°, após o terceiro dia, aumenta a inativação e a desnaturação da enzima. Apesar do aumento do

fluxo de nitrato. Isto evita que nitrito ou amônia se acumule na folha.

SASAKWA & YAMAMOTO (1977b) detectaram que a deficiência nutricional acarreta redução na atividade da RN. Plantas com deficiência de Mg e Fe não variam a absorção de nitrato, porém, tem baixa atividade da RN.

As deficiências de N, P, K e Ca promovem tanto a queda na absorção de nitrato como a da atividade de NR. Quanto as deficiências de micronutrientes, se mostraram excelentes inibidores da absorção de nitrato, porém, não provocaram alteração na atividade da RN, indicando que a atividade da NR não se relacionava com a concentração de nitrato na planta.

FERNANDES & FREIRE (1976) indicaram a viabilidade de fazer uma avaliação do teor de nitrogênio da planta através da atividade basal da RN baseado nos dados da atividade da RN de *Brachiaria* sp. ser diretamente proporcional ao teor de nitrato do solo.

SASAKAWA & YAMAMOTO (1977a) compararam plantas normais, com aquelas em que havia a remoção do endosperma da semente, e observaram a uma diminuição da atividade de RN destas. Quando se oferecia açúcar sob a forma de glicose ao embrião os níveis da atividade de RN aumentavam. Plântulas na ausência de luz, só cresciam em solução de glicose, indicando que a glicose substituiu o oferecimento de luz.

PURANIK & STIVASTAVA, 1983 observaram que o oferecimento de sacarose para feijões em germinação causou substancial aumento na atividade da RN em folhas, mas um pequeno aumento na proteína total.

GALLO, 1980 estudando parâmetros físicos e químicos que regulam a atividade de RN em feijões *Phaseolus vulgaris* L., verificou que a enzima possui atividade variável com a idade, sendo esta maior no período que precede o florescimento. Plantas crescidas no escuro não apresentaram atividade da enzima, porém, a adição de intermediários da glicólise promovem aumento da atividade.

A enzima foi induzível pelo substrato e as raízes possuem sempre uma menor atividade. Não foram encontradas diferenças significativas em relação a atividade da RN quando foram comparadas cultivares de feijão da mesma espécie.

EVANS & NASAN (1953) usando como cofator NADPH e NADH, verificaram que o primeiro mostrou-se com mais possibilidade de tornar a RN ativa e que a flavoproteína FDA neste caso foi usada como grupo prostético. Metais pesados são inibidores efetivos.

BEEVER et alii (1964) purificaram parcialmen

a enzima RN de 15 espécies de plantas onde NADH foi usada como cofator.

FILNER (1966) demonstraram que a RN extraída de células de fumo tem como cofator NADH_2 e que aminoácidos como arginina e lisina funcionam como repressores ou depressores da RN.

PANEQUE et alii (1965) demonstraram que FMN e FAD foram doadores de elétrons para a redução e propuseram uma mistura de duas diferentes enzimas: nitrato oxidoreductase FMNH_2 (FADH_2) e NADP redutase.

LOSADA et alii (1965) ao isolarem cloroplastos de espinafre, também reconheceram que a flavina nucleotídeo (FAD) é o único carregador de elétrons dos grana dos cloroplastos para o sistema nitrato-redutase.

SHARADER et alii (1968) encontraram como cofator da enzima tanto NADH como FMNH_2 . A meia vida estabelecida para a enzima foi de 4 horas. Propuseram o nome da enzima de NADH como sendo nitrato redutase (E.C. 1-6-6-1) devido a FMNH_2 estar em maior quantidade que NADH. Os estudos foram feitos em milho, abóbora e espinafre.

LEECE et alii (1972) encontraram RN em folhas de damasco e cereja e observaram que tanto NADPH e FMN foram os doadores de elétrons para a enzima. Para a extração "in vitro" era necessário usar um agente protetor porque fenóis de baixo peso molecular inibiram a atividade da enzima.

SLUITERS & SCHOELTEN (1975) trabalharam com

folha de feijão e verificaram aumento da atividade da enzima NADH-Nitrato oxiredutase (E.C. 1-6-6-2) pela luz. Verificaram que este fato ocorria paralelo ao início de desenvolvimento do cloroplasto. Resolveram administrar DCMU a planta iluminada, não obtendo atividade da enzima RN. Entretanto, se nessas condições fosse adicionado sacarose, a atividade da enzima aumentava.

Isto indicava, segundo os autores que o NADH, formado nas regiões fotossintéticas, era o doador de elétrons para a enzima.

Resultados diferentes encontraram KANANGARA & WOOLHOUSE (1957) ao verificarem que a indução causada pela luz em enzimas de folhas de *Perilla flutescens* não poderia ser substituída pela sacarose.

FRITH (1974) através de suas pesquisas, verificou que inibidores fotossintéticos poderiam produzir inibição da RN como consequência da influência da deficiência de esqueletos carbônicos que causariam um aumento da amônia sob a forma livre que seriam transportadas das folhas para as raízes.

RANDALL (1969) estudando folhas de trigo, encontrou pH ótimo de 6,0 e 30º a temperatura ótima. Análise "in vitro" da atividade de RN indicam um aumento quando as plantas cresceram em solução com Mo, porém, adição de Mo em plantas com crescimento normal não mostraram variações. Foi usado neste trabalho níveis de 0,005 até 5 µg Mo por planta.

SERRA et alii (1968) ofereceram nitrato como única fonte de nitrogênio para algas Diatomáceas e verificaram que o tungstênio inibe a RN porque estabelecia uma competição com o Mo pelo mesmo sítio da enzima e somente este último, permite o desempenho da enzima.

HIGGINS et alii (1974) induziram a RN de raízes em hipocótilos de feijão *Phaseolus aureus* após a germinação pela adição de NO_3 . Verificaram a existência de uma fase "lag" entre a adição de NO_3 e o estabelecimento da taxa constante de aumento da atividade da enzima. Essa atividade só declinou 6 horas após a retirada de NO_3 . O reoferecimento de NO_3 causou um imediato aumento na taxa normal da enzima, sem a manifestação de uma fase "lag".

DISA et alii (1982) trabalhando com embriões de aveia e analisando a atividade da enzima RN no período de germinação até 76 horas, concluíram que existe um período de 20 horas iniciais onde a enzima não é induzida. Embriões germinados em KNO_3 (60mM) mostraram picos da atividade enzimática a 32, 44, 56 e 60 horas e correlacionavam este fato com a flutuação da quantidade de nitrato absorvida e disponibilidade no tecido, conforme já tinha sido observado por WALLACE & PATE (1965), STEER (1973) e ROBIN (1979).

GUPTA et alii (1983) estudando a germinação de cevada, verificaram uma fase de 24 a 26 horas em que a RN não se apresentava induzível, mesmo em presença de nitrato. Logo em seguida, há uma fase induzida.

As hipóteses para explicar este fato, segundo os autores, são: 1 - o nitrato absorvido não alcança o lugar da enzima; 2 - presença de fatores de inativação; 3 - ativação da RN inativa por alguma mudança durante a fase não induzível; 4 - algumas alterações metabólicas durante a fase não induzível para o surgimento da enzima sob a forma induzível; 5 - o RNA mensageiro da RN é sintetizado só após esta fase; 6 - o RNA mensageiro é pré-formado, mas sua tradução é dificultada. Após a fase não induzível, a RN pode ser sintetizada pelo RNA mensageiro de estoque e mais tarde, um novo RNA mensageiro será necessário.

DISA et alii (1985) aprofundando seus estudos sobre a fase "lag" de 20 horas para iniciar-se a indução da RN em embriões durante a germinação, observaram que isto não era devido a falta de nitrato no embrião ou a presença de algum fator inativante ou síntese de inativantes da enzima. A indução da RN ocorria por síntese de novo, que não dependia da formação recente, mas do estoque de mRNA. Com o desenvolvimento, novos mRNA seriam então produzidos. Durante a fase "lag" foi essencial a síntese de certas proteínas que iriam favorecer a ocorrência da fase indutível.

Ritmicidade da atividade da RN são relativas a ciclos de luz que influenciam no fluxo de nitrato no xilema e mobilização do estoque de nitrato, bem como disponibilidade de elétrons segundo BEEVERS & HAGEMAN (1980), SRIVASTAVA (1980), GUPTA et alii (1983).

2.4.4. Distribuição

As folhas, na maioria das plantas, são os sítios de preferência para a redução do nitrato.

As raízes contribuem pouco, mas provavelmente, significativamente para a redução total do nitrato segundo RADIN (1977). Isto é muito importante no estágio de plântula em desenvolvimento após ter sido exauridas suas reservas e durante o crescimento, quando no tecido da raiz se localiza uma alta percentagem da atividade metabólica de toda planta. EVANS & NASON (1953), OAKS (1979), REDENBAUGH & CAMPBELL (1977) e OJI et alii (1982) encontraram estoque de NADH-NR em órgãos de reserva e raízes das plantas. COVE (1982) em comunicação pessoal citada por CAMPBELL & SMARELLI (1986), sugeriu que a NAD PH:NR pode ser uma possibilidade genética de todas as plantas e que em muitas folhas seu potencial é suprimido pela luz. Assim, pode ser explicada a ocorrência mais comum desta enzima em plântulas e tecidos não verdes. LOBEDEVA & OCHKIVS'KA (1978) estudaram a atividade da enzima NR em sementes de *Phaseolus vulgaris* durante 72 horas de germinação. Não foi encontrada atividade em sementes secas. Após 3 horas de germinação hipocótilo e testa apresentavam atividade da enzima. A atividade de RN foi alta na testa e baixa nos cotilédones somente após 24 horas de germinação.

WALLACE & PATE (1964) verificaram que em te-

cidos velhos, a diminuição da atividade de NR é provavelmente devido a queda no "turnover" da enzima ou que sítios ativos da enzima estariam ocupados por inibidores. O nitrato poderia estimular a síntese da enzima inativa. Em ervilha também foi encontrado redutase do nitrato em raízes, caules e folhas. HARPER & HAGEMAN (1972) observaram que no início do ciclo de vida da planta a atividade era pequena, aumentando no meio do ciclo e diminuindo novamente no final do ciclo. Folhas mais novas e mais velhas apresentam menores atividades. O nitrato aumenta do início ao fim do ciclo, o mesmo acontecendo com a fixação de nitrogênio de plantas de soja, colocadas em solução deficiente de nitrogênio.

DALLING et alii (1972) estudaram a localização da nitrato redutase e nitrito redutase. A primeira enzima foi extraída de raízes de aveia e não está associada a nenhuma organela da raiz ou da folha. A NR estava disposta no citosol. Frequentemente a localização da nitrato redutase é no citoplasma, enquanto a nitrito redutase está dentro do cloroplasto. Assim, o nitrito formado no citoplasma passa para o interior do cloroplasto. SWADER & STOCKING (1971) não conseguiram reduzir o nitrato em presença de luz, "in vitro", contando com cloroplastos isolados, provando que a NR não existe naquela organela. BALTHAN (1976) localizou nas células do mesófilo de várias espécies C_4 , tanto a NR como outras enzimas responsáveis pela assimilação do nitrato. YAMAYA & OHIRA (1976; 1977; 1978) encontraram em

raízes de arroz, que a atividade era de 10 a 20 vezes maior que nas folhas. A atividade em raízes jovens chegava a 30 vezes maior do que em raízes maduras. Plantas de pepino crescendo em presença de nitrato, não apresentaram atividade da enzima nos cotilédones, porém, se apresentaram nas raízes mesmo quando a planta cresceu no escuro (AMINDARI et alii, 1978). Em presença de luz a atividade da RN em folhas ficou bem diminuída. BADIN et alii (1978) observaram que a presença de açúcares em raízes mantém a atividade de NR. O teor de açúcar não alterou a absorção de nitrato. FRANCO et alii (1979) verificaram que nos estágios iniciais de desenvolvimento foliar a atividade da RN foi máxima e que a atividade da RN por planta foi maior após o florescimento. ANDREWS et alii (1984) mediram a atividade da RN em folha, caule e raiz de vários legumes entre eles *Phaseolus vulgaris* e encontraram que mais de 20% do total da atividade da RN ocorria no caule. SRIVASTAVA (1975) observou que folhas de *Phaseolus vulgaris* em germinação, tem níveis mais altos de atividade da enzima do que raízes e caule e o nível da enzima em folhas muito jovens foi baixo, aumentando aos 10 ou 11 dias de crescimento. A quantidade de enzima em folhas de plantas com 7 dias de excisão foi cerca de 2,5 vezes maior que em folhas de plantas intactas. O oferecimento de nitrato causou um aumento considerável no nitrogênio orgânico da planta intacta após 9 dias de crescimento, quando o suprimento de nitrogênio proveniente dos cotilédones é presumivelmente baixo. SANDERSON

& COCKING (1964) encontraram diferentes Kms para NADH e NO_3^- das RNs obtidas de raízes e folhas de plantas novas de tomate. RADIN (1975) provou que a adição de aminoácidos provoca diferentes repostas da enzima em raízes e folhas de algodão. Estas observações indicam que as enzimas dos dois tecidos são diferentes. FERRANO et alii (1982) observaram que a RN da raiz de espinafre é inativada pelo anticorpo porque é preparado a partir da RN da folha, mas no teste de Ouchterlony as duas proteínas parecem ser parcialmente relacionadas. Resultados semelhantes tem sido obtidos com RN de folhas e raízes de trigo. O aumento de NO_3^- provoca a elevação nas taxas da atividade de RN em raízes e folhas. Uma rápida queda da RN após a remoção do NO_3^- pode ocasionar uma inativação reversível conforme relataram ARYON et alii (1983) em trigo, SOMERS et alii (1983) em cevada e YAMAYA & OHIRA (1978) em arroz ou uma degradação irreversível da enzima, conforme observaram WALLACE (1973) em milho e YAMAYA et alii (1980) em arroz.

Proteínas com capacidade de inativar a RN tem sido encontrada em diferentes tecidos ligados especificamente a RN conforme JOLLY & TOLBERT (1978) trabalhando com soja, LEONG & SHEN (1980), trabalhando com arroz. Não foi estabelecido claramente ainda na literatura o papel da inativação proporcionada por essas proteínas e a regulação da enzima, conforme OARKS & HIREL (1985).

Existem muitos exemplos na literatura da regulação da atividade ou indução da RN feita pela amônia ou amí

noácidos comprovados por GUERRERO et alii (1981) e SRIVASTAVA (1980). Os aminoácidos dificilmente apresentam algum efeito na redução do NO_3^- em testes "in vivo".

FERRARI et alii (1973) demonstraram em células de fumo que existem dois "pools" ou reserva metabólica comum de NO_3 . O "pool" indutor do período curto e o "pool" substrato, de período longo. O NO_3 acumulado no "pool" substrato foi utilizado pela planta mas não substituiu o NO_3 do "pool" indutor ou metabólico no sentido da indução da síntese de novo ou de aumentar a atividade já existente da enzima. A queda da absorção de NO_3 era seguida da queda de atividade apesar do nível do NO_3 nas células permanecer em níveis altos. Fernandes (1975) citado por FERNANDES (1974) verificou que em arroz o acúmulo de altos níveis de NO_3 sem que houvesse concomitância no aumento do "pool" de N-aminoácidos livres ou no conteúdo de N-protéico nas plantas. Isto levou o autor a propor um "mecanismo de sequestro de nitrato" para explicar o deslocamento de NO_3 do "pool" metabólico para o substrato e sugerir que uma redução na disponibilidade de esqueletos de carbono seria o fator responsável pelo acionamento deste mecanismo, não sendo a atividade do sistema RN por si só, o fator limitante deste processo. Assim, a redução do N é acompanhada das disponibilidades de esqueletos carbônicos. Logo, a atividade de RN em qualquer momento é resultado das condições fisiológicas gerais da planta.

2.4.5. A enzima e a produção da cultura

Pesquisas realizadas com diversos cultivares de feijão mostraram que, dentro de uma mesma espécie, podem o correr respostas diferentes à adubação nitrogenada (JUNQUEIRA NETO, 1977 e SILVA, 1988). No caso do trigo a produção de nitrogênio por grão é determinada, primeiramente pela quantidade de nitrogênio acumulado durante a fase vegetativa e do direcionamento destas reservas para a formação do grão. Sabe-se, hoje, que os cultivares diferem entre si pela eficiência na redistribuição de nitrogênio. JOHNSON et alii (1967) e BEECH & NORMAN (1968) encontraram diferenças significativas no índice de nitrogênio da colheita dada pela relação do nitrogênio da colheita dada pela relação do nitrogênio do grão pelo total de nitrogênio da planta entre cultivares de trigo. ROMANI (1983) encontrou diferença na quantidade de nitrogênio total do grão de vinte diferentes cultivares de *Phaseolus vulgaris*. As diferenças existentes entre os cultivares na capacidade de acúmulo de nitrogênio reduzido durante o crescimento vegetativo foi atribuído a diferentes atividades da enzima RN (CROY & HAGEMAN, 1970; DECKARD et alii, 1973; EILRICHAND & HAGEMAN, 1973 e PALLING et alii, 1975).

O uso de critérios bioquímicos e fisiológicos como auxiliares dos programas de seleção de cereais melhorados foi proposto por CROY & HAGEMAN (1970). Analisando-se 36 cultivares de trigo, observou-se que 15 deles exibiram alta

atividade de RN no verão. Quando foi fornecido nitrato aumentou em 9 o número de cultivares de alta atividade da enzima. 13 desse número total na mesma época eram os melhores produtores de proteína nos grãos. A atividade da RN de cultivares é alterada quando ocorrem variação da temperatura noturna (de 13º para 18ºC) e diurna (de 24º para 30ºC). Foi encontrada relação positiva entre a atividade da enzima e os genótipos de proteína solúvel da folha no inverno e os genótipos de proteína no grão no inverno. O autor defende o ponto de vista de que é possível selecionar genótipos de alta atividade de RN com um potencial genético que pode ser avaliado em plantas jovens crescendo em casa de vegetação, com necessário fornecimento de nitrogênio. Entretanto, a avaliação do potencial, ao longo das estações do ano, seria necessariamente feito em condições de campo devido as variações ambientais. A avaliação dos diversos genótipos de atividade de nitrato redutase é somente um dos muitos tipos de critérios bioquímicos, que são necessários para a produção da planta. DALLING & LOYN (1985) estabeleceram comparações em 25 cultivares de trigo e encontraram relação significativa entre a atividade da enzima RN de plantas jovens germinadas em casa de vegetação e a quantidade de N no grão de plantas com 7 meses no campo.

Como pode ser visto na literatura, a semente durante a germinação, passa de um estágio de repouso para um

estágio dinâmico. O metabolismo aumenta rapidamente, quer nos cotilêdones, quer nos eixos embrionários. Tudo indica que a maioria desses eventos sejam controlados pelo eixo embrionário em germinação.

A literatura consultada afirma que são necessários mais estudos para o entendimento de como é controlado o metabolismo nesta fase da vida da planta. Este tipo de elucidação facilitará bastante a manipulação "in vitro" de embriões resgatados, como aqueles oriundos de cruzamentos interestecíficos, isolados dos cotilêdones.

Por sua importância no metabolismo de nitrogênio e sua ampla integração com outros eventos metabólicos como glicólise, respiração e fotossíntese, foi escolhida a enzima redutase do nitrato como uma referência ao desempenho dos eixos embrionários mantidos "in vitro".

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção de sementes

Nos ensaios deste trabalho foram utilizadas as sementes de feijão das espécies: *Phaseolus vulgaris* (cultivares: Gordo e Masterpiece); *Phaseolus acutifolius* (cultivar Tepari Branco), e *Phaseolus lunatus* (cultivar CIAT). As sementes foram cedidas pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), Recife, PE, exceto a cultivar Masterpiece oriunda do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAF-EMBRAPA), Goiânia, Goiás.

Primeiramente, as sementes foram plantadas em vasos de barro com capacidade de 8 kg de solo. O solo utilizado foi do tipo Latossolo Vermelho Escuro, textura média (conforme CABRAL, 1985), proveniente da Fazenda Experimental de Sertãozinho, pertencente a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) em Piracicaba, SP. Para a correção deste solo foi utilizado 1,5 t/ha de calcário (Mineral Agrícola), apresentando CaO = 45%; MgO = 15% e PRNT =

118%. Considerou-se que a camada de até 20 cm de profundidade, 1 hectare equivaleria em peso a $2,8 \times 10^6$ kg de solo para efeito de cálculo da quantidade de adubo ou corretivo a ser adicionado. A adubação foi realizada utilizando-se uma formulação: 100 kg de N: 200 kg de P_2O_5 : 100 kg K_2O (Sulfato de Amônia, Superfosfato Simples, Cloreto de Potássio), acrescentada de 30 t/ha de matéria orgânica (esterco de curral). O calcário, o adubo superfosfato simples e o esterco foram incorporados ao solo na mesma ocasião.

O sulfato de amônio e o cloreto de potássio foram incorporados juntos, parcelados cerca de 10, 20 e 30 dias após o plantio, conforme CABRAL (1985). Os cuidados fitossanitários foram tomados segundo orientação de VIEIRA (1967) para ácaros branco e rajado (*Polypagotarsonemus latus* Banks e *Tetranychus urticae* Koch) e oídio (*Erysiphe polygoni* DC). Os vasos foram colocados em casa de vegetação localizada no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA-USP, Piracicaba, SP com temperatura média diurna de 28°C e noturna de 19°C. Após obter-se sementes suficientes procedeu-se ao plantio no campo.

A 2ª fase do plantio foi realizada na área experimental de campo do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC - FEALQ - USP), Piracicaba, SP, em solo de textura média na parte superior/argilosa segundo VIDAL TORRADO (1989). O clima da região é CWA pela classificação climática de Köppen ou seja, subtropical úmida com estiagem no inverno (CAMARGO

et alii, 1974), e altitude de 57 m. Fez-se o plantio na primeira quinzena de agosto em parcelas de 27m x 5m (uma parcela para cada cultivar) com 6 linhas por parcela com espaçamento de 1m entre as linhas, 0,5m entre as plantas e 2m entre as parcelas. A adubação de plantio foi de 50 kg/ha de N, 100 kg/ha de P_2O_5 e 50 kg/ha de K_2O , usando-se 1,75 kg de adubo da formulação 4-14-8 por linha e 20 kg/ha do produto FTE-BR-12 como fonte de micronutrientes (Zn, Cu, B, Mn, Mo e Cl) usando-se 0,05 kg por linha. A adubação de cobertura foi feita 30 dias após a germinação com 275 g de sulfato de amônio por linha e 135 g de sulfato duplo de potássio e magnésio).

O pH médio do solo era de 6,0 não necessitando uso de corretivos. Cuidados fitossanitários foram tomados segundo VIEIRA (1967) para combate a ácaros branco e rajado (*Polyphagotarsonemus latus* Banks e *Tetranychus urticae* Koch) e oídio (*Erysiphe polygoni* DC) e vírus do mosaico comum do feijoeiro (VMCF) e vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF).

A produção em kg de grãos por planta e kg de grãos por hectare pesadas após 4 meses da colheita são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Produção de feijão na área experimental de campo do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC).

Cultivar	kg de grãos por planta	kg de grãos por hectare(**)
Gordo	0,0268	1240
Masterpiece	0,0194	1318
Tepari Branco	0,0270	972(*)
CIAT	0,0236	950

(*) A relação entre a produção por planta e a produção por hectare não foi a mesma em todas as cultivares devido a perdas de várias plantas atacadas pelo vírus mosaico dourado.

(**) O cálculo por hectare foi conseguido por projeção do resultado médio de 5 talhões de 3m x 1,5m.

3.2. Cultivo "in vitro"

3.2.1. Constituição do meio de cultura

Foram utilizados três meios de cultura. O primeiro, estabelecido por CABRAL (1985), com nitrato e amônia que neste trabalho foi denominado meio completo e simbolizado pela letra "C". O segundo meio é o meio completo, porém, contendo como fonte de nitrogênio somente 1000 mg/L de KNO_3 (sem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) foi denominado neste trabalho como meio com nitrato e simbolizado pe

la letra "N". O terceiro é o meio completo sem nenhuma fonte de N sob a forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou KNO_3 , neste caso, a quantidade de KCl foi aumentada para 500 mg/L para suprir o fornecimento de potássio e foi chamado nesse trabalho de meio sem nitrogênio e simbolizado pela letra "S". Os três meios estão apresentados na Tabela 2. O pH final foi ajustado a 5,6. 20 ml do meio de cultura foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 125 ml de capacidade, e em seguida esterilizado em autoclave a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos.

3.2.2. Inoculação de embriões

As sementes foram submetidas a uma desinfecção inicial por imersão em solução 20% (v/v) do produto comercial "Q-Boa" (hipoclorito de sódio) por um período de 5 minutos. Eram em seguida, imersa em água deionizada para lavagem do hipoclorito e colocadas em água deionizada para embebição. Os embriões foram extraídos das sementes após 18 horas de embebição. Estes embriões foram extraídos com bisturi depois de aberta a semente, evitando-se o contato manual. Após extraídas, eram colocados em água esterilizada. A desinfecção era feita na câmara de fluxo laminar sob condições assépticas mergulhando-os em solução de 20% (v/v) do produto comercial "Q-Boa" (solução de hipoclorito de sódio) por um período de 5 minutos, após o que os embriões eram imer

Tabela 2. Meios de cultura para cultivo de embriões de feijão usados neste trabalho (pH = 5,6).

	Meio C(*)	Meio N	Meio S
A. Sais minerais (mg/L)			
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100,00	Ausente	Ausente
KNO_3	800,00	1000,00	Ausente
KCl	200,00	200,00	500,00
CaCl_2	135,00	135,00	135,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250,00	250,00	250,00
NaH_2PO_4	173,00	173,00	173,00
Na_2PO_4	37,70	37,70	37,70
$\text{Na}_2 \text{ EDTA}$	37,30	37,30	37,30
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,80	27,80	27,80
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4,50	4,50	4,50
KI	0,05	0,05	0,05
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,40	2,40	2,40
B. Constituintes orgânicos			
Sacarose (g/L)	30,00	30,00	30,00
Inositol (mg/L)	100,00	100,00	100,00
Tiamina-HCl (mg/L)	8,00	8,00	8,00
Ácido nicotínico (mg/L)	5,00	5,00	5,00
Piridoxina-HCl (mg/L)	0,60	0,60	0,60
Niaciamida (mg/L)	1,25	1,25	1,25
D-pantotenato (mg/L)	1,00	1,00	1,00
Caseína hidrolizada (g/L)	2,00	2,00	2,00
Glutamina (mg/L)	25,00	25,00	25,00
Agar (g/L)	8,00	8,00	8,00

* Meio estabelecido por CABRAL (1985).

sos em água deionizada estéril para remoção de hipoclorito. Daí eram retirados por uma peça elaborada especificamente para esse fim com fio de aço inox para ortodontia marca Labordent nº 0,60, têmpera dura. A ponta da peça lembra um ancinho com $1,5 \text{ cm}^2$ de área e com capacidade de inocular no meio de cultura sólido de uma só vez em média, 15 embriões. Os embriões inoculados eram mantidos em sala a 25/21°C com fotoperíodo de 18/6 horas (luz/escuro) e uma intensidade luminosa de aproximadamente 2000 lux.

No 3º, 7º, 10º e 14º dias eram separados 7 frascos e feita análise dos embriões mais desenvolvidos.

3.3. Germinação de sementes

Inicialmente, as sementes eram submetidas a uma desinfecção prévia com imersão em solução 20% (v/v) do produto "Q-Boa" (solução de hipoclorito de sódio) por um período de 5 minutos. Eram em seguida lavadas em água deionizada estéril para a retirada do hipoclorito e colocadas em água deionizada estéril para embebição. Após 18 horas de embebição as sementes eram envolvidas em papel toalha crespa e colocadas em um becker de 2 litros de capacidade, de tal maneira que a parte inferior deste cilindro de papel ficasse em contato com a água e a parte superior onde se encontravam as sementes se localizasse próximo do bordo do becker. As

sim, todas as sementes mantiveram-se umedecidas e germinaram em boas condições.

Um grupo de sementes foi colocado para ser umidecido em água. Outro grupo em solução de KNO_3 800 mg/L.

As sementes germinaram na mesma sala e em condições ambientais semelhantes aquelas do cultivo "in vitro" dos embriões já descritos anteriormente neste trabalho.

3.4. Determinação da atividade da enzima redutase do nitrato

O ensaio "in vivo" da atividade da enzima redutase do nitrato foi feito utilizando o método de STREETER & BOLTERS (1972) com modificações.

Os embriões foram cortados com bisturi em pequenos pedaços (de 1mm) e 0,2g deste tecido foi incubado em tampão fosfato 5mM, pH 7, contendo 1% de propanol(v/v) e KNO_3 0,1M. O controle não continha KNO_3 , o que foi substituído por água. Os frascos contendo os tecidos foram tampados com rolha de borracha, evacuados durante 2 minutos para se retirar o ar dos tecidos e facilitar a infiltração do tampão. A seguir, foram incubados em banho-maria durante 30 minutos a 30°C. Após esse tempo, os tubos foram agitadas em agitador tipo Vortex, destampados e foi retirada uma alíquota de 1 ml do meio de incubação com pipeta automã-

tica, e em 1 ml de sulfanilamida 1% em 1,5N HCl foi adicionado para paralisar a reação e 1 ml de cloreto de naftil a 0,02% em água destilada, que promove o aparecimento da cor. O conteúdo de nitrito formado foi determinado pela leitura da absorbância a 540nm em espectrofotômetro Coleman modelo 285. A atividade da nitrato redutase foi expressa em μ M de nitrito formado e liberado para o meio extrator por hora e por grama de matéria fresca. Procedeu-se com cada frasco a testes para detecção de possível contaminação da seguinte maneira: colocava-se 3 ml de água deionizada autoclavada assim que os frascos com os embriões era aberto. Agitava-se, de modo que a água atingisse todos os embriões e toda a superfície do meio. Os embriões eram rejeitados para a análise quando: 1 - a água colocada no frasco após a agitação não se mantivesse límpida (sem nenhuma turvação); 2 - se após as reações para determinação da atividade da NR com uma alíquota de 1 ml desta água do frasco apresentasse alguma cor.

A determinação da atividade da NR nas plantas provenientes das sementes germinadas foram submetidas a mesma rotina descrita para a dosagem em embriões cultivados "in vitro". Neste caso, o teste para detecção de possível contaminação era feito com 3 ml de água de lavagem dos tecidos selecionados para serem cortados e analisados.

3.5. Determinação de proteína solúvel

A determinação de proteína solúvel foi feita pelo processo de LOWRY et alii (1951). O ensaio foi realizado a partir de 0,2g de tecido, que foram homogeneizados em uma concentração final de TCA 6,6%. Após 3 horas em temperatura de 39°C foi procedida uma centrifugação por 20 minutos, a 109°C, a 3000 rpm em centrífuga refrigerada IEC modelo B - 20. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 2 ml de solução de NaOH 1N. Após filtração em gaze foi retirada uma alíquota de 1 ml do filtrado para análise. Os resultados foram expressos em mg de proteína solúvel por grama de massa de matéria fresca.

3.6. Determinação do nitrogênio total

A determinação do nitrogênio total foi feita pelo processo de Kjeldahl.

3.7. Determinação da percentagem de massa de matéria seca

Cerca de 80 embriões eram retirados dos meios de cultura ou das sementes em germinação nas mesmas datas das análises bioquímicas. Eram lavados e secos em lenço de pa-

pel e com emprego de balança de precisão determinava-se a massa de matéria fresca. Os embriões eram então colocados em estufa de secagem por 5 dias a 50°C e pesados novamente, para se encontrar a massa de matéria seca. Comparando-se os dois valores estabelecia-se o percentual de matéria seca.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise de eixos embrionários cultivados "in vitro"

4.1.1. Percentuais de massa da matéria seca

A Fig. 2 registra percentuais de massa de matéria seca dos eixos embrionários, separados das sementes após 18 horas de embebição em água e embriões que foram cultivados "in vitro" nos meios sem nitrogênio (S), com nitrato e amônia (C) e somente com nitrato (N) durante 3, 7, 10 e 14 dias.

Observou-se em todas os cultivares que no período de 18 até 72 horas houve uma grande absorção de água pelos eixos embrionários que fez com que o valor percentual da massa de matéria seca diminuísse. O decréscimo nesse período foi maior nas cultivares da espécie *Phaseolus vulgaris*. Quando se observou o desempenho do 3º ao 14º dia o cultivar Gordo manteve-se praticamente estável no meio S e C e com discreto aumento no meio N. A cultivar Masterpiece elevou seu percentual de massa de matéria seca a partir do 7º dia.

Fig. 2. Percentuais de massa de matéria seca. Eixos embrionários após 18 horas de embebição em água. Eixos embrionários em meio (S), (C) e (N) no 3º, 7º, 10º e 14º dia. Média de 3 repetições.

(*) A legenda utilizada nesta figura é válida para as demais.

A cultivar CIAT foi a que apresentou comportamento no meio C muito próximo das cultivares Gordo e Masterpiece. Porém, no meio N seu desempenho acompanhou a cultivar Tepari Branco.

A diminuição progressiva do peso seco das sementes durante a germinação foi demonstrada por Boussingault citado por STILES (1950).

O outro fato que é bem ressaltado nesta figura é que a cultivar Tepari Branco, apropriada para ambientes secos, apresentou maior período para que ocorresse a absorção de água pelo embrião em comparação com as demais cultivares. As diferenças de embebição, bem como outros fatores que variam entre as cultivares, é confirmado pelo relato de BEWLEY & BLACK (1984).

Os resultados foram apresentados em percentagem de massa de matéria seca e não em massa de matéria fresca porque procurou-se eliminar variações determinadas pela maior ou menor absorção de água pelos tecidos vegetais ao longo do experimento.

A diminuição da massa de matéria seca demonstra que a germinação é um processo endergônico, ou seja, consome energia.

**4.1.2. Níveis de nitrogênio total, proteína solúvel
e atividade da enzima redutase do nitrato
(EC 1-6-6-1) por grama de massa de matéria seca**

A Tabela 3 apresenta os níveis por grama de massa de matéria seca de eixos embrionários de nitrogênio total, proteína solúvel e atividade da enzima redutase nitrato e atividade específica desta enzima de embriões separados das sementes após 18 horas de embebição em água.

Estes dados foram importantes para determinar o momento zero em que os embriões foram inoculados assepticamente no meio de cultura "in vitro". Destaca-se a baixa atividade específica da enzima redutase do nitrato.

A Fig. 3 mostra os níveis alcançados por grama de massa de matéria seca de eixos embrionários para o parâmetros nitrogênio total quando esses embriões foram cultivados "in vitro" nos meios S, C e N do 3º ao 14º dia.

Comparando-se a Tabela 3 com a Fig. 3 percebe-se que houve um decréscimo acentuado na quantidade de nitrogênio total nas 72 horas iniciais de cultivo semelhante ao que ocorreu com o percentual de matéria seca, conforme visto na Fig. 2.

Ficou também evidente, a tendência da queda na quantidade de nitrogênio total em função da matéria seca. Isso se deveu, em parte, a absorção de outros nutrientes,

Tabela 3. Níveis de nitrogênio, proteína solúvel e atividade da NR por grama de massa de matéria seca de eixos embrionários retirados das sementes após 18 horas embebidos em água.

Cultivares	mg N total	mg de proteína solúvel	Atividade de NR ($\times 10^{-3}$)*	Atividade específica da NR **
	g massa matê- ria seca	g massa matê- ria seca		
Gordo	84,99	84,28	0,075	$8,8 \times 10^{-4}$
Masterpiece	90,07	79,84	0,082	$1,0 \times 10^{-3}$
Tepari Branco	70,04	76,56	0,100	$1,3 \times 10^{-3}$
CIAT	58,83	63,47	0,052	$8,1 \times 10^{-4}$

* $\mu\text{moles NO}_2/\text{g de massa de matéria seca} \cdot \frac{1}{h}$

** $\frac{\mu\text{moles NO}_2/\text{g de massa de matéria seca} \cdot 1/h}{\text{mg proteína solúvel/g massa matéria seca}}$

Fig. 3. Quantidade de N total (mg de N total/g de matéria seca) dos eixos embrionários de feijão no 3º, 7º, 10º e 14º dia após inoculação em meio S, C e N. Média de 3 repetições.

pois esta queda não ocorreu no percentual de matéria seca a partir do 30 dia, exceto na cultivar Teparí Branco. Isto não deve ser confundido com menor absorção de N pelo embrião, conforme será discutido mais adiante neste trabalho.

A Fig. 3 também mostra que embriões crescidos no meio C e N continham maior teor de nitrogênio em comparação com o meio S e neste particular o resultado apresentou-se uniforme para todas as cultivares.

A Fig. 4 expõe os parâmetros de proteína solúvel por grama de massa de matéria seca. Verificou-se uma uniformidade na diminuição dos valores durante os 14 dias de crescimento dos embriões, com maior intensidade no meio S. Aqui também esses resultados não devem ser entendidos como menor quantidade de proteína solúvel no embrião, como será visto neste trabalho.

Quando se compararam os dados da Fig. 4 com aqueles da Fig. 3 observou-se, ao contrário do nitrogênio total, que a proteína solúvel não sofreu queda nos seus ní-veis nas 72 horas iniciais, o que ocorreu entretanto entre os 30 e 70 dias.

O que mereceu apreciação é que, nestas 72 horas iniciais de cultivo do embrião, houve um aumento nos cultivares Gordo e Masterpiece da ordem de 100% na quantidade de proteína solúvel, independente do meio em que ocorria o cultivo. Nos cultivares Teparí Branco e CIAT este aumento foi pouco pronunciado.

Fig. 4. Quantidade de proteína solúvel (mg de proteína solúvel por g de massa de matéria seca). Eixos embrionários em meio (S), (C) e (N) no 30, 70, 100 e 140 dias. Média de 3 repetições por tratamento.

Estes resultados sugerem duas hipóteses: 1. proteínas do embrião não se encontravam sob a forma solúvel, mas em consequência da absorção de água, no período de 72 horas, estas proteínas pré-existentes passaram a forma solúvel. 2. houve síntese de proteína nas 72 horas iniciais da germinação. Isto pode ser confrontado com os resultados de WALTON & SOOFTI (1969) e KLEIH et alii (1971) atestando que o embrião da semente hidratada não pode crescer sem uma fase prévia de síntese proteica. MARCUS & FEELEY (1965) e MARCUS et alii (1966) encontraram formação de polissomos 10 minutos depois de iniciada a embebição. DURE & WATERS (1965) propuseram que todo o aparato metabólico para a síntese proteica já se encontra na semente antes da embebição.

O aumento ocorrido no período de 72 horas não se verificou na cultivar Tepari Branco, resultados esses que estão de acordo com a grande taxa de matéria seca que essa cultivar conserva ao longo do experimento, conforme mencionado neste trabalho.

A Fig. 5 apresenta a atividade da enzima RN expressa em $\mu\text{moles de NO}_2$ por grama de massa de matéria seca por hora. Pela Tabela 1, notou-se que a atividade da RN é bem reduzida nos eixos embrionários mantidos em água durante 18 horas. Quando colocados no meio de cultura, a atividade dessa enzima nos embriões sofreu acréscimo nos meios C e N, principalmente nesse último. No meio S foram observadas variações bem discretas.

Fig. 5. Atividade da RN expressa em μ moles de nitrito formado por hora, e por g de massa de matéria seca. Eixos embrionários em meio (S), (C) e (N) no 3º, 7º, 10º e 14º dias. Média de 3 repetições por tratamento.

Provavelmente tenha ocorrido efeito indutor do nitrato sobre a enzima. No meio S esse composto não está presente, o que teria determinado baixos níveis na atividade, em comparação com os obtidos no meio C e N.

Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de FRITH (1972), SHANER & BOYER (1970), SASAKAWA & YAMAMOTO (1977), HIGGINS et alii (1974), BEEVERS et alii (1975), LAHAVET et alii (1976) e GALLO (1980), que realizaram estudos sobre a indução da RN em presença de nitrato.

A cultivar Tepari Branco foi, ao longo do experimento, a que mais demorou a apresentar níveis elevados de atividade da enzima.

Em muitas oportunidades, quando se seleciona um parâmetro (como a atividade de uma enzima) em uma determinada condição (como a massa de matéria seca ou a massa de matéria fresca), os resultados podem conduzir a falsas interpretações. Isto pode ocorrer também quando se apresenta a atividade específica de uma enzima. Em algumas situações, a proteína solúvel não é a melhor referência. Este foi o caso relatado por MELO (1989), que para expressar com mais fidelidade a atividade específica da enzima do peroxissoma, utilizou a atividade de outra enzima, a redutase do hidroxipiruvato.

A maioria das citações bibliográficas, quando utilizam o ensaio "in vivo" expressam a atividade da NR por grama de massa de matéria fresca (ou peso fresco). No

presente trabalho, entretanto, esta atividade foi apresentada em função da massa de matéria seca para melhor se tentar estabelecer comparações destes parâmetros entre as cultivares que apresentaram níveis diversos de absorção de água. Mesmo assim, como o percentual de massa de matéria seca em alguns casos se mostraram elevados, o que poderia gerar uma interpretação equivocada da evolução de comportamento da enzima no período, buscou-se mais uma alternativa para a expressão desta atividade relacionando-a com cada embrião.

4.1.3. Níveis de nitrogênio, proteína solúvel e atividade da enzima redutase do nitrato (EC 1-6-6-1), por unidade de embrião

Para melhor acompanhar os parâmetros nitrogênio total, proteína solúvel e atividade da enzima RN, foram efetuados cálculos para aferir o desempenho por unidade de eixo embrionário (Fig. 6, 7 e 8).

Antes de qualquer análise, tornou-se necessário conhecer a massa de matéria fresca de cada embrião ao ser retirado da semente sem embebição, o que é mostrado na Tabela 4.

Nota-se na Tabela 4 que a cultivar Tepari Branco possui cerca de 50% da massa das demais cultivares tomados individualmente. Isto acarretou baixos níveis em todos os parâmetros analisados por embrião desta cultivar.

Fig. 6. Quantidade de nitrogênio total (mg N total por unidade de eixo embrionário). Eixos embrionários em meio (S), (C) e (N) no 3º, 7º, 10º e 14º dias. Média de 3 repetições por tratamento.

Fig. 7. Quantidade de proteína total (mg de proteína solúvel por unidade de eixo embrionário). Eixos embrionários em meio (S), (C) e (N) no 3º, 7º, 10º e 14º dias. Média de 3 repetições por tratamento.

Fig. 8. Atividade da RN expressa em μmoles de nitrito formado por hora, e por unidade de embrião. Eixos embrionários em meio (S), (C) e (N) no 3º, 7º, 10º e 14º dias. Média de 3 repetições por tratamento.

Tabela 4. Peso por embrião ao ser retirado da semente sem embebição.

Cultivar	Massa em mg
Gordo	5,36
Masterpiece	5,54
Tepari Branco	2,28
CIAT	5,38

Os dados referentes a cada embrião deixam antever uma semelhança no comportamento dos cultivares Gordo, Masterpiece e CIAT. O cultivar Tepari Branco sempre apresentou menor valor em todas as análises (nitrogênio, proteína solúvel e atividade da enzima) relacionada a menor massa deste tipo de eixo embrionário (Tabela 4).

Com relação ao nitrogênio total, houve aumento nos 3 meios até o 7º dia. Nos meios N e S observou-se declínio nos dias subsequentes. Já no meio C, constatou-se aumento ao longo de todo o período, indicando absorção contínua desse elemento, como pode ser visto na Fig. 6. Por outro lado, comparando-se a quantidade de N total no meio C medida por grama de massa de matéria seca (Fig. 3) e por embrião (Fig. 6), constata-se que no primeiro caso houve um decréscimo na taxa de nitrogênio, enquanto que na análise por embrião, verifica-se um aumento sensível desses valores ao

longo do experimento. Esses resultados comprovam os de BEEVERS (1983), os quais indicam um aumento do nitrogênio total nos eixos embrionários de ervilha em germinação a partir do 30 dia. Este aumento na taxa de nitrogênio pode justificar também a síntese de proteína que ocorre neste período, conforme já descrito nesse trabalho.

Este aumento não ocorreu no meio N, provavelmente pela falta de disponibilidade de amônia.

A Fig. 7 mostra os níveis de proteína solúvel por embrião. A cultivar Masterpiece decresceu no 70 dia, tendendo em seguida, a aumentar A cv. Gordo mantém altos níveis com pequenos decréscimos a partir do 70 dia. A cv. Te-pari Branco sempre mostrou níveis ascendentes e CIAT conservou-se sem alteração no meio N e em declínio no meio C.

No meio S os níveis de proteína solúvel foram baixos comparados com os outros meios. Neste caso, não foi registrada nenhuma tendência diferente daquela obtida quando os dados foram relacionados a grama de matéria seca (Fig. 4).

Essa tendência para diminuição da proteína solúvel pode, por hipótese, ser explicada pela imobilização das proteínas.

CUMING & ÇANE (1979) mostraram que as proteínas sintetizadas a partir de RNAm de "vida longa", encontrados nos embriões no início da germinação, são proteínas predominantemente destinadas a formação de ribossomos. GORDON & PAYNE (1976) há haviam verificado que essas proteínas possuem peso molecular pequeno.

A Fig. 8 mostra os altos níveis da atividade de de NR em meio N a partir do 10º dia em todas os cultivares. No meio C destacou-se com maior atividade a cultivar Gordo. Houve uma ascendência dos níveis nos cultivares Tepari Branco e Masterpiece no decorrer do experimento. Notou-se que com o passar do tempo, a atividade tende a aumentar de acordo com o trabalho de HARPER & HAGEMAN (1972).

No meio S foram observados níveis bem baixos da atividade da enzima em todos os cultivares.

As variações destes dados são semelhantes às que foram obtidas na análise por grama de massa de matéria seca.

A preocupação de se apresentar os resultados referindo-os a cada embrião foi importante, principalmente, na análise dos parâmetros: 1) nitrogênio total, quando foi possível observar-se um aumento na taxa deste elemento; 2) proteína solúvel, que possibilitou a constatação da ocorrência de síntese de proteína no período.

4.1.4. Atividade específica da enzima redutase do nitrato (E.C. 1-6-6-1) em eixos embrionários "in vitro"

A Fig. 9 foi construída para reunir os valores das atividades específicas da enzima redutase do nitrato.

Fig. 9. Atividade específica da redutase do nitrato. Eixos embrionários em meio (S), (C) e (N) no 3º, 7º, 10º e 14º dias. Média de 3 repetições por tratamento.

A similaridade dos dados entre as cultivares mostrou que ocorreu uma tendência de aumento dos valores da atividade específica ao longo do período analisado. Isto pode ser explicado pela grande necessidade que o tecido tem de formas reduzidas de nitrogênio para a síntese de aminoácidos.

Este aumento da atividade da NR ao longo do experimento sugere que existe um aumento paralelo do metabolismo oxidativo. Como se sabe, a enzima para funcionar necessita de NADH. YAMAMOTO (1963) achou que a relação $\text{NADP} + \text{NADPH} / \text{NAD} + \text{NADH}$ é igual a $\pi < 1$, indicando a ocorrência predominantemente da glicólise no eixo embrionário. LABOURIAU (1983) afirma que os caminhos metabólicos convergentes para a síntese de compostos ricos em energia (ATP, GTP, CTP, UTP) é um exemplo de um "pool" importante para a manutenção das reações ocorridas na germinação e no caso deste trabalho, a redução do nitrogênio. Nestas condições, a enzima pode aumentar sua atividade. A diminuição na quantidade de proteínas solúveis no citoplasma, se refletiu nos valores das atividades específicas. Isto justifica plenamente o aumento da atividade específica de todas as cultivares no meio S onde se verificou uma pequena e constante atividade da enzima.

Os dados discutidos acima são relativos aos eixos embrionários que foram crescidos somente com auxílio de seus próprios componentes químicos e de substâncias absorvidas do meio de cultura. Essas condições são artificiais, entretanto, reproduzem as mesmas situações, às quais os em-

briões híbridos, resultantes do cruzamento interespecíficos, devem ser expostos objetivando seu crescimento "in vitro".

Importa agora, relacionar o desempenho "in vitro" com aquele em que os eixos embrionários germinam ligados aos cotilédones.

4.2. Análise de eixos embrionários retirados de sementes germinadas em água e em solução de nitrato

Foram analisados os eixos embrionários separados dos cotilédones nos 30, 70 e 100 dias. Nos 70 e 100 dias foram feitas análises de raiz e de folha separadamente. No 140 dia não foram feitos testes porque a esta altura do experimento, muitas plantas já apresentavam sinais de murchamento, provavelmente pela falta de nutrientes para a parte que já haviam adquirido.

4.2.1. Percentuais de massa de matéria seca

As Figuras 10 e 11 mostram os percentuais de massa de matéria seca em eixos embrionários extraídos das sementes após germinarem em água ou em solução de nitrato.

Nesse caso, também ocorreu uma queda da percentagem da massa de matéria seca no início da germinação. A partir do 30 dia, em todos os cultivares, não houve variações do parâmetro considerado.

Fig. 10. Percentuais de massa de matéria seca. Eixos embri_onários após 18 horas de embebição em água. Eixos embri_onários retirados de sementes germinadas em água no 30, 70 e 100 dias. Média de 2 repetições por tratamento.

Fig. 11. Percentuais de massa de matéria seca. Eixos embrionários appos 18 horas de embebição em água. Eixos embrionários retirados de sementes germinadas em solução de nitrato de potássio (800 mg/L) no 3º, 7º e 10º dias. Média de 2 repetições por tratamento.

No tecido foliar, algumas variações no sentido da diminuição da taxa de matéria seca, podem ser indício da expansão da folha em alongamento com grande ganho de água. A folha apresentou nível mais elevado de massa de matéria se ca do que a raiz.

As raízes não manifestaram variações consideráveis de matéria seca.

Na comparação de cultivo em água e em NO_3 não foram constatadas diferenças dignas de comentários.

4.2.2. Nitrogênio total, proteína solúvel e atividade da enzima redutase do nitrato (E.C. 1-6-6-1), por grama de massa de matéria seca

Nas Fig. 12 e 13 são apresentados os resultados de nitrogênio total por grama de matéria seca de eixos embrionários retiradas de sementes germinadas em água e em nitrato.

Comparando estes resultados com aqueles da Ta bela 3 houve, até o 30 dia, uma queda na quantidade de N total tal como ocorreu "in vitro" (vide Fig. 3). Com relação à plan ta inteira, as variações não foram significativas a partir do 30 dia em ambos os meios. A folha foi o tecido que apresentou maior quantidade de nitrogênio.

Os eixos embrionários, quando germinaram com os cotilédones em solução de nitrato, apresentaram níveis de

Fig. 12. Quantidade de nitrogênio total (mg de N total por g de massa de matéria seca). Eixos embrionários retirados de sementes germinadas em água no 3º, 7º e 10º dias. Médias de 2 repetições por tratamento.

Fig. 13. Quantidade de nitrogênio total (mg N total por g de massa de matéria seca). Eixos embrionários retirados de sementes germinadas em solução de nitrato de potássio (800 mg/L) no 3º, 7º e 10º dias. Média de 2 repetições por tratamento.

nitrogênio mais elevados e não evidenciaram queda das taxas de nitrogênio até o 10º dia de experimento como aconteceu no crescimento "in vitro". Este fato, comprova o trabalho de FOLKES & YEMM (1958), os quais estimaram que o eixo embrionário recebe até 75% de aminoácidos exigidos para a síntese de suas proteínas a partir da hidrólise de proteínas de seu tecido de reserva.

Nas Fig. 14 e 15 são apresentadas as quantidades de proteína solúvel por grama de massa de matéria seca.

Não foram apresentados os resultados relativos a planta inteira, aos 7º e 10º dias, para não se incorrer em erro de analisar maior quantidade de tecido em relação a outro, uma vez que havia já ocorrido diferenciação da raiz, caule e folha.

Ao contrário do que ocorreu nos eixos embrionários crescidos "in vitro", não houve redução dos níveis de proteína solúvel ao longo de 10 dias. As sementes crescidas em água não apresentavam tanta proteína solúvel quanto aquelas em solução de nitrato, principalmente a nível de raiz.

Se ambas receberam aminoácidos do cotilédone esta diferença pode ser imputada à síntese de proteína que ocorre quando o embrião tem disponibilidade de nitrato.

As folhas apresentaram aproximadamente o dobro da quantidade de proteína solúvel do que as raízes.

Comparando-se os resultados aqui apresentados de proteína solúvel com aqueles que compõem a Tabela 3 e a

Fig. 14. Quantidade de proteína solúvel (mg de proteína solúvel por g de massa de matéria seca). Eixos embrionários retirados de sementes germinadas em água no 3º, 7º e 10º dias. Média de 2 repetições por tratamento.

Fig. 15. Quantidade de proteína solúvel (mg de proteína solúvel por g de massa de matéria seca). Eixos embrionários retirados de sementes germinadas em solução de nitrato de potássio (800 mg/L) no 3º, 7º e 10º dias. Média de 2 repetições por tratamento.

Fig. 4, não foi verificado o aumento ocorrido nos cultivares Gordo e Masterpiece "in vitro" no meio N.

Nas Fig. 16 e 17 observa-se a atividade da NR em μmoles de NO_2 formado por grama de massa de matéria seca. Em meio contendo NO_3 a atividade da NR em folha e em raiz é bem maior do que aquela existente quando a semente germinou em água, conforme pode ser visto nos dados da Tabela 5, que relacionam as duas situações.

Tabela 5. Relação entre atividade de NR em eixos embrionários extraídos de sementes germinadas em NO_3 e água.

Cultivar	$\text{NO}_3/\text{Água}$				
	3 dias eixo embrionário	Folha		Raiz	
		7	10	7	10
Gordo	18,9	11,1	41,0	187,0	65,9
Masterpiece	12,6	25,2	18,3	35,9	183,7
Tepari Branco	19,2	18,5	12,5	47,9	64,2
CIAT	24,5	30,8	38,6	55,6	45,2

CHANTAROTWANG et alii (1976), SLUITERS-SCHOLTEN (1973), FRITH (1972), SHANER & BOYER (1970), SHARNER & BOYER (1976), GALLO (1980) e HIGGINS et alii (1974) são unân-

Fig. 16. Atividade da RN expressa em μ moles de nitrito formado por hora e por g de massa de matéria seca. Eixos embrionários retirados de sementes germinadas em água no 3º, 7º e 10º dias. Média de 2 repetições por tratamento.

Fig. 17. Atividade da RN expressa em μmoles de nitrito formado por hora, e por g de massa de matéria seca. Eixos embrionários retirados de sementes germinadas em solução de nitrato de potássio (800 mg/L) no 3º, 7º e 10º dias. Média de 2 repetições por tratamento.

nimes em afirmar que a presença de nitrato promove um aumento da atividade enzimática da RN. Conforme CAMPBELL & SMARELLI (1986) divulgam, a RN é um dos raros exemplos conhecidos em plantas superiores de indução pelo substrato.

Este experimento não permite concluir se houve fase "lag" de 20 horas onde a enzima não foi induzida, conforme relato de HIGGINS et alii (1974), DISA et alii (1982), WALLACE & PATE (1965); STEER (1973), ROBIN (1979) e GUPTA et alii (1983).

Em todas as cultivares, a atividade da enzima nas folhas foi bem maior do que nas raízes.

Quando estes resultados são confrontados com aqueles conseguidos por eixos embrionários cultivados "in vitro", no meio N (onde foram verificadas atividades elevadas), observou-se que a atividade da RN é sempre mais alta nos eixos embrionários extraídos de sementes germinadas em meio com NO_3 . Isto pode indicar que: 1) é formada maior quantidade de NR nestes eixos embrionários; 2) há melhores condições de funcionamento para enzima NR (como maior quantidade de NADH, FAD, ATP) quando os eixos permanecem ligados aos cotilédones.

A primeira hipótese está de acordo com os trabalhos de WALBOT (1972), que verificou a formação de polissomos após 6 horas do início da germinação, a partir de ribossomos formados na embriogênese e aqueles de KOZLOWSKI (1972) segundo o qual, as proteínas de reserva são transformadas em aminoácidos que são transferidos para o embrião, o que já ti

nha sido estudado por BEEVERS & SPLITTSTOESSER (1968) e CATSIMPOOLAS et alii (1968).

A segunda hipótese está corroborando os resultados de HALLO (1980), quando adicionou compostos intermediários da glicólise e promoveu aumento da atividade da NR. Assim, também, foi verificado que a respiração aumenta linearmente com o grau de hidratação do tecido, além das condições temporárias de anaerobiose, segundo BEWLEY & BLACH (1984). BEEVERS & ITAGEMAN (1980), NAIK (1982) e PURANIK & SRIVASTAVA (1983) também asseguram que a disponibilidade de NADH, sacarose, ácidos orgânicos como fontes de energia, controlam a atividade da enzima RN.

4.2.3. Níveis de nitrogênio, proteína solúvel e atividade da enzima redutase do nitrato (E.C. 1-6-6-1), por unidade de tecido

As Fig. 18 e 19 explicitam o parâmetro nitrogênio total, calculado em função da unidade de tecido considerado.

A grande quantidade de tecido caulicular foi provavelmente responsável pelas maiores taxas de nitrogênio total.

Folhas das cultivares Gordo e Masterpiece sempre apresentaram taxas elevadas de nitrogênio total.

A relação entre as taxas de nitrogênio total do eixo embrionário extraídas de sementes germinadas em NO_3 (planta inteira) e daquelas crescidas "in vitro" no meio N, são mostradas na Tabela 6. Por estes dados, ficou explicita

Fig. 18. Quantidade de nitrogênio total (mg N total por unidade de eixo embrionário, folha ou raiz). Eixos em brionários retirados de sementes germinadas em água no 3º, 7º e 10º dias. Média de 2 repetições por tratamento.

Fig. 19. Quantidade de nitrogênio total (mg N total por unidade de eixo embrionário, folhas ou raiz). Eixos embrionários retirados de sementes germinadas em solução de nitrato de potássio (800 mg/L) no 3º, 7º e 10º dias. Média de 2 repetições por tratamento.

do que quando o eixo embrionário está ligado aos cotilédones obtêm N mais facilmente ao longo do período analisado, conforme ANSTON (1976); GUARDIOLA & STICLIFFE (1971) e PENMER & ANSTON (1966 e 1967).

Tabela 6. Relação entre a taxa de nitrogênio total de eixos embrionários extraídas das sementes germinadas em NO_3 (planta inteira) e eixos embrionários crescidos "in vitro" no meio N.

Cultivar	3 dias	7 dias	10 dias
Gordo	2,1	18,3	36,0
Masterpiece	7,0	29,9	30,0
Tepari Branco	4,1	16,4	19,2
CIAT	1,9	11,7	27,4

Nas Fig. 20 e 21 são mostrados os dados de proteína solúvel, calculadas em função da unidade de tecido. Neste caso, os resultados confirmam aqueles já obtidos em função da massa de matéria seca e a maior quantidade de proteína solúvel na folha do que na raiz.

Na Tabela 7 está relacionada a quantidade de proteína solúvel de raiz e folha de sementes germinadas em NO_3 no 10º dia após a semeadura e eixos embrionários cultivados "in vitro" no meio N no 10º dia após a inoculação (análises feitas por tecido).

Ficou assim demonstrado, que o nitrato induz a RN da semente em germinação em maior escala na folha do que em raiz. Na folha, há maior quantidade de enzima, conforme RITENOUR et alii (1967), RTHAN (1976), FRANCO et alii (1979), CHAUTAROTWANG et alii (1976).

A relação entre a atividade da enzima NR de tecido de folhas e raízes de sementes germinadas em NO_3 no 10º dia após a semeadura e eixos embrionários cultivados "in vitro" no meio N no 10º dia após a incubação (análises feitas por tecido), foi mostrada na Tabela 8. Constatou-se que a cultivar Masterpiece apresenta a mais baixa relação.

Tabela 8. Relação entre a atividade da enzima redutase da nitrado de raiz e folhas de sementes germinadas em NO_3 no 10º dia após a incubação (análises feitas por tecido).

Cultivar	Relação Folha/embrião	Relação Raiz/embrião
Gordo	3,7	1,2
Masterpiece	0,9	0,3
Tepari Branco	7,2	2,2
CIAT	2,0	1,4

Ao contrário do nitrogênio total e da proteína solúvel, as atividades da enzima NR não foram, nos tecidos de folha e raiz, oriundos de sementes germinadas em solução

Fig. 20. Quantidade de proteína solúvel (mg de proteína solúvel por unidade de eixo embrionário, folha ou raiz). Eixos embrionários retirados de sementes germinadas em água no 3º, 7º e 10º dias. Média de 2 repetições por tratamento.

Fig. 21. Quantidade de proteína solúvel (mg de proteína solúvel por unidade de eixo embrionário, folha ou raiz). Eixos embrionários retirados de sementes germinadas em solução de nitrato de potássio (800 mg/L) no 3º, 7º e 10º dias. Média de 2 repetições por tratamento.

de NO_3 , diferentes daquelas detectadas em embriões cultivados "in vitro" no meio N. Essa observação foi feita quando se tomou por base a análise por unidade de tecido, ou seja, atividade da NR de 1 folha, de 1 raiz e de 1 eixo embrionário. No período de 10 dias, eixos embrionários e tecidos "in vitro" ainda não tinham tecido diferenciado em quantidade suficiente para análise da atividade enzimática. Por isso, todo o eixo embrionário foi analisado e tomado como um tecido unitário. Este fato, pode trazer algum prejuízo na análise desta relação.

Os baixos valores apresentados na Tabela 8 podem ser explicados, com base nos dados citados por SRIVASTAVA (1975), que encontrou atividade bem alta da enzima em folhas de plantas cujos cotilédones foram excisados. O embrião nesta fase "in vitro", ainda não está diferenciado, mas apresenta alta atividade da NR.

4.2.4. Atividade específica da enzima redutase de nitrato (EC 1-6-6-1) em eixos embrionários retirados de sementes após a germinação

As Fig. 25 e 25 mostram as atividades específicas da enzima NR de eixos embrionários extraídos de sementes germinadas em água e em solução de NO_3 .

A atividade específica em folhas sempre foi maior do que em raízes e em meio contendo NO_3 .

Tabela 7. Relação entre a quantidade de proteína de folha e raiz de sementes germinadas em NO_3 no 10º dia após a semeadura e eixos embrionários cultivados "in vitro" no meio N nos 10 dias após a incubação (análises feitas por tecido).

	Relação Folha/embrião	Relação Raiz/embrião
Gordo	14,3	2,7
Masterpiece	14,1	4,8
Tepari Branco	9,5	4,7
CIAT	15,7	4,7

Ficou evidente, por estes parâmetros, que a contribuição do cotilédone para o aumento da taxa de proteína solúvel nos embriões é efetiva, conforme KOZLOWSKI (1972), BEEVER et alii (1968) e CATSIMPOOLOS et alii (1968).

É oportuno lembrar que a planta inteira, oriunda da germinação da semente, não foi analisada por motivos já mencionados, entretanto, se isso tivesse sido feito, por certo estes valores estariam artificialmente alterados.

As Fig. 22 e 23 foram elaboradas com dados da atividade da enzima RN por unidade de tecido dos eixos embrionários extraídos de sementes germinadas em água e em solução do NO_3 .

Fig. 22. Atividade de NR expressa em moles de nitrito formado por hora e por unidade de eixo embrionário, folha ou raiz. Eixos embrionários retirados de sementes germinadas em água no 3º, 7º e 10º dias. Média de 2 repetições por tratamento.

Fig. 23. Atividade da NR expressa em μmoles de nitrito formado por hora e por unidade de eixo embrionário, folha ou raiz. Eixos embrionários retirados de sementes germinadas em solução de nitrato de potássio (800 mg/L) no 3º, 7º e 10º dias. Média de 2 repetições por tratamento.

Fig. 24. Atividade específica da redutase de nitrato de eixos embrionários, folhas ou raiz. Eixos embrionários retirados de sementes germinadas em solução de nitrato de potássio (800 mg/L) no 3º, 7º e 10º dias. Média de 2 repetições por tratamento.

Fig. 25. Atividade específica da redutase do nitrato de eixos embrionários, folhas ou raízes. Eixos embrionários retirados de sementes germinadas em solução de nitrato de potássio (800 mg/L) no 3º, 7º e 10º dias. Média de 2 repetições por tratamento.

A Tabela 9 relaciona as atividades específicas de folhas e raízes de sementes germinadas em NO_3 e eixos embrionários cultivados "in vitro" no meio N.

Nela, pode ser observado que nos eixos embrionários cultivados "in vitro" no meio N, a atividade específica é menor do que nos eixos embrionários ligados aos cotilédones até o 7º dia de experimento. No 10º dia, verificou-se que as atividades específicas tendem a se igualar. Este trabalho não é possível afirmar que esta relação continuará sem alteração.

Tabela 9. Relação entre as atividades específicas de NR de folha e de raiz de sementes germinadas em NO_3 e eixos embrionários cultivados "in vitro" no meio N.

Cultivar	Relação embrião germinado: eixo em- brionário "in vitro"	Relação		Relação	
		Folha:		Raiz:	
		embrião 7º	embrião 10º	embrião 7º	embrião 10º
Gordo	7,94	2,00	1,25	3,70	1,60
Masterpiece	2,05	1,50	0,08	1,10	1,46
Tepari Branco	4,20	3,10	0,98	3,40	1,97
CIAT	2,50	2,80	1,06	2,80	1,20

A alternativa de expressar os resultados por unidade de tecido nos embriões que germinaram com os cotilédones não demonstrou nenhuma diferença da tendência de au-

mento dos níveis ao longo do período, conforme observado quando os dados eram relacionados com a massa de matéria seca.

A análise global dos dados apresentados nesse trabalho permite afirmar que no início do experimento, os eixos embrionários, após 18 horas de embebição em água, já apresentam atividade da enzima redutase do nitrato. Isso pode ser um indício de que o embrião nesse período já tenha uma taxa mínima de enzima. Essa enzima, parece ser uma das primeiras a mostrar atividade no contexto metabólico.

Do instante inicial do experimento, até 72 horas de crescimento "in vitro", há uma queda bem maior na taxa de nitrogênio e de proteína solúvel, quando comparadas com eixos embrionários germinados na semente. No primeiro caso, as fontes de nitrogênio e demais nutrientes, estão no meio de cultura. O processo de absorção de outros elementos e água ocorrem continuamente. A síntese de moléculas orgânicas se dá a partir de carbono proveniente do meio sob a forma de sacarose, já que nesta fase de desenvolvimento não existe ainda o processo fotossintético.

Os resultados também confirmam que, no resgate de embriões, utilizando a cultura "in vitro", um maior tempo para a germinação é consumido, comparado com a germinação da semente intacta.

Nos eixos embrionários, que se desenvolveram na semente, a mobilização de compostos nitrogenados provenientes do cotilédone fez com que a taxa de nitrogênio não decrescesse

se a índices tão baixos como se verificou na cultura "in vitro".

Um melhor oferecimento de esqueletos carbônicos pode justificar uma maior atividade da NR, uma vez que a amônia formada no final da redução total do nitrato (depois da ação da nitrito redutase) poderia ser neles incorporados, não exercendo seu efeito inibitório a NR.

A folha apresentou-se como ideal para a atividade da enzima. O processo fotossintético explica este fato por ser responsável pela síntese de esqueletos carbônicos; por sua vez, a glicólise pode oferecer NADH para o funcionamento da enzima.

As avaliações da atividade da enzima, conseguidas neste trabalho não devem ser tomadas como critério bioquímico correlacionado com o desenvolvimento da planta mantida a campo (conforme CROY & HAGEMAN, 1970), mas sim, indicativas de que as quatro cultivares mostraram atividades da enzima com variações muito semelhantes nas diversas condições às quais foram submetidas.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

1 - Os quatro cultivares mostraram atividades da enzima RN com variações muito semelhantes nas diversas condições às quais foram submetidas, indicando compatibilidade geneticamente neste aspecto entre os cultivares aqui estudados.

2 - Em todos os tecidos, a enzima RN mostrou-se inditível pelo substrato.

3 - A cultivar Tepari Branco é mais tardia na embebição do embrião "in vitro" em relação aos demais cultivares analisados.

4 - Os cotilédones forneceram aos embriões melhores condições para a expressão da atividade da RN. Eixos embrionários crescidos "in vitro" possuem menor atividade da enzima RN do que embriões que germinam na semente "in vivo".

5 - Há uma pequena atividade da enzima RN em embriões retirados de sementes embebidas em água por 18 horas.

6 - A unidade de embrião se constituiu no melhor critério para a avaliação dos níveis de nitrogênio total e proteína solúvel para efeito de comparação entre os cultivares.

7 - O aumento da atividade específica da enzima redutase de nitrato mostrou ser um bom parâmetro para o acompanhamento do desenvolvimento dos eixos embrionários "in vitro".

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, M.N.; ASCHER, P.D.; DAWIS, D.W. Interespecific hybridization in *Euphaseolus* through Embryo Rescue. Hort-Science, Alexandria, 16(4): 541-3, 1981.
- AMINDARI, S.; DIR, M.A.; SPLITTSTOSSER, W.E. Induction of nitrate reductase in pumpkin seedlings. Plant and Cell Physiology, Kyoto, 19(2): 299-302, 1978.
- ANDREWS, M.; SUTHERLAND, J.M.; THOMAS, R.J.; SPRENT, J.I. Distribution in nitrate reductase in six legumes. the importance of the stem. New Phytologist, Cambridge, 98: 301-10, 1984.
- ARYAN, A.P.; BATT, R.G.; WALLACE, W. Recversible inactivation of nitrate reductase by NADH and the occurrence of partially inactive enzyme in the leaf. Plant Physiology, Rockville, 71: 582-7, 1983.
- ASLAM, M. Reevaluation of anaerobic nitrite production as an index for the measurement of metabolic pool of nitrate. Plant Physiology, Rockville, 68: 305-18, 1981.

- ASLAM, M. Diffrencial effect of tungsten on the development of endogenous and nitrate - induced nitrate reductase activities in soybean leaves. Plant Physiology, Rockville, 70: 34-72, 1982.
- ASLAM, M. & HUFFAKER, R.C. In vivo nitrate reduction in roots and shoots of barley (*Hordum vulgare* L.) seedlings in light and dark. Plant Physiology, Rockville, 70: 1009-18, 1982.
- ATKINSON, D.E. Regulation of enzyme activity. Annual Review of Biochemistry, Colchester, 35: 85-124, 1966.
- AXELROD, B. & BEEVERS, H. Mechanisms of carbohydrate breakdown in plants. Annual Review of Plant Physiology, Copenhagen, 7: 267-98, 1965.
- BANDEL, G. Desenvolvimento e diferenciação em Plantas. Piracucaba, ESALQ, 1979. 159p.
- BARKER, R.D.J.; DERBYSHIRE, E.; YARWOOD, A.; BOULTER, D. Purification and chacterization of the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* seeds, and their intracellular and cotyledonary distribution. Phytochemistry, New York, 15: 751-62, 1976.
- BARNELL, H.R. Analysistic studies in plant respiration. VII. Aerobic respiration in barley-seedlings and its relation to growth and carbohydrate suplly. Proceedings of the Royal Society of London, London, 123B: 321-42, 1937.

- BARTON, L.V. Respiration and germination studies of seeds in moist storage. Annual New York Academic Science, New York, 44: 185-208, 1945.
- BEECH, D.F. & NORMAN, M.J.T. The effect of wet land and nitrogen fertilizer on sunflower lissed and whart in the Ord Riber Valley. Australian Journal Experimental Agricultural Animal Husbandry, Melbourne, 8: 349-56, 1968.
- BEEVERS, L. Protein degradation and protelityc activity in the cotyledons of germinating pea seeds (*Pisum sativum*). Phytochemistry, New York, 7: 1837-44, 1968.
- BEEVERS, L. & HAGEMAN, R.H. Nitrate and nitrite reduction. In: MIFLIN, B.J. Aminoacids and derivation. New York, Academic Press, 1980. (The biochemistry of plants, 5).
- BEEVERS, L. & HAGEMAN, R.H. Uptake and reproduction of nitrate: bacteria and higher plants. In: LAUCHI, A. BIELESKF, R.L. eds. Inorganic plant nutrition. Berlin, Springer Verlag, 1983. p. 351-75. (Encyclopedia of plant physiology, 15A).
- BEEVERS, L. & SPLITTSTOESSER, W.E. Protein and nucleic acid metabolism in germinating peas. Journal of Experimental Botany, Oxford, 19: 698-711, 1968.
- BEEVERS, L.; FLESHER, D.; HAGEMAN, R.H. Studies on the pyridine nucleotide specificity on nitrate reductase in higher plants and its relationship to sylvhydryl level. Biochem. Biophys., San Diego, 89: 453-59, 1964.

- BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H.; SHRADER, L.E.; FLESHER, D. The role of light and nitrate in the induction of nitrate reductase in radish cotyledone in maize seedlings. Plant Physiology, Rockville, 40: 691-8, 1965.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. Physiology and biochemistry of seeds. Berlin, Springer Verlag, 1978. V. 1 306p.
- BLANDEL, A.M. & BLANC, D. Mise au point d'une methode de mesure in vivo de l'activit de la nitrate reductase. Annales Agronomiques, Paris, 26(3): 309-22, 1975.
- BONNER, J. Biochemical mechanisms in the respiration of the *Avena coleptille*. Archives Biochemistry, San Diego, 17: 311-26, 1948.
- BRAAK, J.P. & KOOISTRA, E. A successful cross between. *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus ritensis* Jones with aid of embryo culture. Euphytica, Dordrecht, 24: 669-79, 1975.
- BROWN, R. Studies on germination and seedling growth. I. The water content, gaseous exchange and dry weight of attached and isolated embryos of barley. Ann. Bot. N.S. New York, 7: 93-113, 1943.
- BRUNETTI, N. & HAGEMAN, R.H. Comparison of "in vivo" and "in vitro" assays of nitrate reductase in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. Plant Physiology, Rockville, 58: 583-7, 1976.
- CABRAL, J.B. Obteno de hbrido interespecfico de feijo (*Phaseolus*) "in vitro". Piracicaba, 1985. 63p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- CABRAL, J.B. (EMBRAPA, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), Recife). Comunicação Pessoal, 1989.
- CAMARGO, A.P. de; PINTO, H.S.; BRUNINI, O; PEDRO JUNIOR, M.J.; ORTOLI, A.; ALFONSI, R.R. Clima do Estado de São Paulo. In: São Paulo (Estado). Secretaria de Agricultura. Zoneamento Agrícola do Estado de São Paulo. São Paulo, 1974. v.1, p.51-87.
- CAMPBELL, W.H. Separation of soybean leaf nitrate reductases by affinity chromatography. Plant Science Letters, Limerick. 7: 239-45, 1976.
- CAMPBELL, W.H. & SMARRELLI Jr., J. Nitrate reductase: biochemistry and regulation. In: NEYRA, C.A. ed. Nitrogen Metabolism, Florida CRC Press, 1986. cap. 1, p-1-39. (Biochemical basis of plant breeding, 2).
- CATSIMPOOLAS, N.; CAMPBELL, T.; MEYER, E.W. Immunochemical study of changes in reserve proteins of germinating soybean seeds. Plant Physiology, Rockville, 43: 799-805, 1968.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Informe Anual 1986 - Programa de Frijol. Caly, 1987. 341p. (Documento de trabajo, 37).
- CHANTAROTWONG, W.; RUFFAKER, R.R.C.; MILLER, B.L.; GRANSTEDT, R.C. "In vivo" nitrate reduction in relation to nitrate uptake, nitrate content, and "in vitro" nitrate reductase activity in intact barley seedlings. Plant Physiology, Rockville, 57: 519-22, 1976.

- CHING, T.M. Metabolism of germinating seeds. In: KOZLOWSKI, T.T. ed. Seed Biology, New York, Academic Press, 1972. v. 2, 447p.
- CROCOMO, O.J. & CABRAL, J.B. Interespecific hybridization in *Phaseolus*: Embryo Axis Culture. In: CROCOMO, O.J.; TAVARES, F.C.A.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BRAVO, J.E.; PADDOCK, E.F. Biotechnology of plants and microorganisms. Columbus, The Ohio State University Press, 1986. 471p.
- CROCOMO, O.J.; TULMANN NETO, A.; MICHAELSEN, K. Breeding for protein in the bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). I. Inventory of some brasilian varieties and a number of lines of differing origin. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Evaluation of seed protein alternations by mutation bred. Vienne, IAEA, 1976. p. 197-208.
- CROCOMO, O.J.; CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.I.; DEUBER, R. Níveis de nitrogênio na produção, no teor de proteína e na composição de aminoácidos em sementes de variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista de Agricultura, Piracicaba, 57(1-2): 39-49, 1982.
- CROCOMO, O.J.; GALLO, L.A.; TONIN, G.S.; SACCHI, N. Developmental control of *Phaseolus vulgaris* using embryo axis culture. Energia Nuclear e Agricultura, Piracicaba, 1(1): 55-8, 1979.
- CROY, L.I. & HAGEMAN, R.H. Relationship of nitrate reductase activity to grain protein production in wheat. Crop Science, Madison, 10: 280-5, 1970.

- CUMING, A.C. & LANE, B.G. Protein synthesis and inhibiting wheat embryos. European Journal Biochemistry, New York, 99: 217-24, 1979.
- DALLING, M.J. & LOYN, R.H. Level of activity of nitrate reductase of the seedling state as a predictor of grain nitrogen. Yield in wheat (*Triticum aestivum* L.). Australian Journal of Agricultural Research, Melbourne, 28: 1-4, 1977.
- DALLING, M.J.; HALLORAN, G.M.; WILSON, J.H. The relations between nitrate reductase activity and grain nitrogen productivity in wheat. Australian Journal of Agricultural Research, Melbourne, 26: 1-6, 1975.
- DALLING, M.J.; TOLBERT, N.E.; HAGEMAN, R.H. Intracellular location of nitrate reductase and nitrite reductase. Biochimica et Biophysica. Acta, Amsterdam, 283: 513-9, 1972.
- DAVIS, W.E. Primary dormancy, after-rupening, and development of secondary formancy in embryos of *Ambrosia trifida*. American Journal of Botany, Columbus, 17: 58-76, 1930.
- DECHARY, J.M. Seed proteases and protease inhibitors. Economic Botany, New York, 24: 113-22, 1970.
- DECKARD, E.L.; LAMBERT, R.J.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reductase in corn leaves as related to yield of grain and glain protein. Crop Science, Madison, 13: 343-8, 1973.
- DISA, S.; GUPTA, A.; GUHA. MUKHERJEE, S.; SOPORY, S.K. Requirement for a lang lag period for the induction of nitrate reducta se in wheat (*Triticum aestivum*) embryos during germination. New Physiologist, Cambridge, 99(1): 71-80, 1985.

- DISA, S.; GUPTA, A.; BAJASEKHAR, V.K.; GUHA-MUKHERJEE, S.; SOPORY, S.K. Rhythmicity in nitrate reductase activity in wheat embryos during germination. New Physiology, Cambridge, 92: 495-9, 1982.
- DUKE, S.H. & DUKE, S.O. The photosynthetic independence of light induced nitrate reductase activity. Plant Physiology, Rockville, 63: 45-52, 1979.
- DURE III, L.S. & WATERS, L. Long-lived mRNA: Evidence from cotton seed germination. Science, Washington, 147: 410-2, 1965.
- EFRON, D. & MARCUS, A. Efficient synthesis of raabid globin in a cell-free system from wheat embryo. FEBS Letters, Amsterdam, 33: 23-7, 1973.
- EILRICH, G.L. & HAGEMAN, R.G. Nitrate reductase activity and its relationship to accumulation of vegetative and grain nitrogen in wheat (*Triticum aestivum* L.) Crop Science, Madison, 13: 59-64, 1973.
- EVANS, H.J. & NASON, A. Pyridin and nucleotide nitrate reductase from extracts of higher plants. Plant Physiology, Rockville, 28: 233-54, 1953.
- EVENARI, N.; NERMANN, G.; KLEIN, S. The influence of red and infra-red light in the respiration of photoblastic seeds. Physiol. Plantarum, Copenhagen, 8: 31-47, 1955.

- FERNANDES, M.S. & FREIRE, L.R. Efeitos do nitrogênio nítrico aplicado ao solo na atividade de nirtato redutase e na acumulação de N-solúvel em *Brachiaria* sp. Turrialba, San José, 26: 268-73, 1976.
- FERRARI, T.E.; YODER, O.C.; FILNER, P. Anaerobic nitrite production by plant cells and tissues evidence for two nitrate pools. Plant Physiology, Rockville, 51: 423-31, 1973.
- FERRARIO, S.; HIREL, B.; GODAL, P. Immunochemical characterization of nitrate reductase from spinach leaves and roots. Biochemical and Biophysical Research Communications, Amsterdam, 113: 733-7, 1982.
- FILNER, R. Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, 118: 299-307, 1966.
- FILNER, P. Enzyme induction in higher plant. Science, Washington, 165: 358-9, 1969.
- FILNER, P. & HEIMER, Y.M. Regulation of the nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells III. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, 230: 362-72, 1971.
- FOLKES, B.F. & YEMM, E.W. The respiration of barley plants. X. Respiration and the metabolism of aminoacids and proteins in germinating grain. New Phytologist, Rockville, 57: 106-31, 1958.
- FRANCO, A.A.; PEREIRA, J.C.; MEYRA, C. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiology, Rockville, 63: 421-4, 1979.

FRITH, G.J.T. Effect of ammonium nutrition on the activity of nitrate reductase in the roots of apples seedlings. Plant and Cell Physiology, Kyoto, 13: 1085-90, 1972.

FRITH, G.J.T. Light stimulated activity of nitrate reductase in apples roots. Plant and Cell Physiology, Kyoto, 15: 152-5, 1974.

GALLO, L.A. Atividade da redutase do nitrato (E.C. 1-6-6-2) sob influência de fatores físicos e químicos em feijão (*Phaseolus vulgaris*). Piracicaba, 1980. 118p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

GALLO, L.A.; RUSCHELL, A.P.; CROCOMO, O.J. Nitrogenase activity of nodulated plants obtained from embryos axis culture. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, 1: 131, 1978.

GODDARD, D.R. & MEESE, B.J.D. Respiration of higher plant. Annual Review of Plant Physiology, Rockville, 1: 207-32, 1950.

GOKSOYR, J.; BOEJI, E.; BONNICHSEN, R.K. The variation of ADH (alcohol dehydrogenase) and catalase activity during the germination of green pea (*Pisum sativum*). Acta Chemica Scandinavica, Copenhagen, 7: 657-62, 1953.

GORDON, M.E. & PAYNE, P.L. In vitro translation the long-lived messenger ribonucleic acid of dry seeds. Planta, New York, 130: 269-73, 1976.

GUAZELLI, R.J. & ROCHA, J.A.M. Uso de misturas de sementes no cultivo de feijão. Goiânia, CNPAF, 1983. 3p. (EMBRAPA/CNPAF. Comunicado técnico, 12).

GUERRERO, M.G.; VEG, J.M.; LOSADA, M. The assimilatory nitrate reducing system and its regulation. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, 32: 169-204, 1981.

GUPTA, A.; DISA, S.; SAXENA, I.M.; SATIN, N.B.; GUHA-MUKHERJEE, S.; SOPARY, S.K. Role of nitrate in the induction of nitrite reductase activity during wheat seed germination. Journal Experimental Botany, Oxford, 34(141): 396-404, 1983.

HABER, A.H. & TOLBERT, N.E. Metabolism of C^{14} - bicarbonate, p^{32} - phosphate or S^{35} - Sulfate by lettuce seed during germination. Plant Physiology, Rockville, 33: 24, 1958.

HACKETT, D.P. Respiratory mechanisms in higher plants. Annual Review of Plant Physiology, Rockville, 10: 113-46, 1959.

HAGEMAN, R.H. & FLESCHER, D. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content in nutrient media. Plant Physiology, Rockville, 34: 700-8,

HAGEMAN, R.H.; LAMBERT, R.J.; LOUSSAERT, D.; DALLING, M.; KLEPPER, L.A. Nitrate and reductase as factors limiting protein synthesis. In: WORKSHOP ON GENETIC IMPROVEMENT OF SEEDS PROTEINS, 1976. Proceedings. New York, National Academic Science, 1976. p. 37-48.

- HARPER, J.E.; HAGEMAN, R.H. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (*Glycine max* Merr.). Plant Physiology, Rockville, 49: 146-59, 1972.
- HEVER, B. & PLAUT, Z. Reassessment of the in vivo assay for nitrate reductase in leaves. Physiology Plant, Copenhagen, 43: 306-13, 1978.
- HIGGINS, T.J.; GOODWIN, P.B.; CARR, D.S. Nitrate reductase induction in seedlings of *Phaseolus aureus* Roxb. Bulletin the Royal Society of New Zealand, 12: 59-66, 1974.
- HONMA, S. A technique for artificial culturing of bean embryos. Proceedings of the American Society Horticultural Science, Alexandria, 65: 405-8, 1955.
- HUSEMANN, W. & BARZ, W. Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. Physiology Plant, Copenhagen, 40: 77-85, 1977.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Anuário do Brasil-1986. Rio de Janeiro, 1986.
- INGLE, J. Nucleic acids and protein synthesis associated with the induction of nitrate reductase activity in radish cotyledons. Biochemical Journal, Colchester, 108: 715-24, 1968.
- JAWORSKY, G.E. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. Biochemical and Biophysical Research Communications, San Diego, 46: 1274-9, 1971.

- JOHNSON, V.A.; MATTERN, P.J.; SCHMIDT, J.W. Nitrogen relations during spring growth in varieties of *Triticum aestivum* L. Differing in grain protein content. Crop Science, Madison, 7: 664-70, 1967.
- JOLLY, S.O. & TOLBERT, N.E. NADH-nitrate reductase inhibitor from soybean leaves. Plant Physiology, Rockville, 62: 197-203, 1978.
- JOLLY, S.O.; CAMPBELL, W.H.; TOLBERT, N.E. NADPH and NADH-nitrate reductase from soybean leaves. Archives of Biochemistry and Biophys., San Diego, 174: 431-8, 1976.
- JONES, P.W. Release of endogenous NO_2^- in anaerobic intact tissue nitrate reduction. Plant Physiology, Rockville, 63: 25-9, 1979.
- JONES, P.W. & MHUIMHNEACHAIN, M. The activity and stability of wheat nitrate reductase "in vitro". Phytochemistry, New York, 24(3): 385-92, 1985.
- JUNQUEIRA NETO, A. Resposta diferencial de variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) à adubação nitrogenada e fosfatada. Viçosa, 1977. 99p. (Doutorado - Universidade Federal de Viçosa).
- JUO, P.S. & STOTZKY, G. Changes in protein spectra of bean seed during germination. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 48: 1347-50, 1970.

KADAN, S.S.; GANDHI, A.P.; SAHENEY, S.K.; NAIK, M.S. Inhibition of nitrate reductase in the roots of rice seedlings and its effect on the enzyme activity in the presence of NADH. Biochimica Biophysica Acta. Amsterdam, 350: 162-70, 1974.

KANANGARA, C.G. & WOOLHOUSE, H.W. The role of carbon dioxide, light and nitrate in the synthesis and degradation of nitrate reductase in leaves of *Pesilla fulrescens*. New Phytologist, Cambridge, 66: 553-61, 1957.

KLEIN, S.; BARENHOLZ, H.; BUDNIK, A. The initiation of growth in lime bean axes physiological and fine structural effects of actinomycin D, ciclohexamide and chloramphenicol. Plant and Cell Physiology, Hyoto, 12: 41-60, 1971.

KLEIN, W.H.; NOLAN, C.; LAZAR, J.M.; CLARK Jr., L.M. Translation of satellite-tobacco necrosis virus ribonucleic acid. I. Characterization of in vitro procaryotic and eucaryotic translation products. Biochemistry, Colchester, 11: 2009-14, 1972.

KLEPPER, L.; FLESHER, D.; HAGEMAN, R.H. Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. Plant Physiology, Rockville, 48: 580-90, 1971.

KOZLOWSKI, T.T. Seed biology. New York, Academic Press, 1972. 103p.

LABOURIAU, L.G. Metabolismo. In: A germinação das sementes. Washington, OEA, 1983. cap. 10, p. 119-38. (Biologia. Monografia, 24).

- LAWRENCE, J.M. & HERRING, H.E. Media for in vivo nitrate - reductase assay of plant tissues. Plant Science Letters, Limerick, 24: 17-24, 1982.
- LEACH, W. & DENT, K.W. Researches on plant respiration. III. The relation between the respiration in air and in nitrogen of certain seeds during germination. (a) Seeds in which fat constitutes the chief food reservec. Proceedings of the Royal Society of London, London, 116B: 150-69, 1935
- LEBEDEVA, T.S. & OCHKIVS'KA, M.V. Nitrate-reductase activity of germinating *Phaseolus vulgaris* seeds. Ukrains Botaniichii Zhurnal, Krainian, 35(5): 458-61, 1978.
- LEE, T.S.G. & CROCOMO, O.J. The structure of storage proteins in *Phaseolus vulgaris* beans. Arquivos de Biologia e Tecnologia, San Diego, 22(1): 23-45, 1979.
- LEE, T.S.G. & CROCOMO, O.J. Protein pattern changes in the germinating bean seed. Turrialba, San José, 30(1): 87-91, 1980.
- LEECE, D.R.; DILLEY, D.R.; KENWORTHY, A.L. The occurrence of nitrate reductase in leaves of *Prunus* sp. Plant Physiology, Rockville, 49: 725-8, 1972.
- LEES, G.L. & THOMPSON, J.E. The effects of germination on the subcellular distribution of cholinesterase in cotyledons of *Phaseolus vulgaris*. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 34: 230-7, 1975.

- LEONG, C.C. & SHEN, T.C. Nitrate reductase inhibitor of rice. Biochimica Biophysica Acta, Amsterdam, 612: 245-52, 1980.
- LEOPOLD, A.C. & GUERNESEY, F.S. Respiratory responses to red and infra-red light. Physiologia Plantarum. Copenhagen, 6: 30-40, 1954.
- LEWIS, O.A.M. & PATE, J.S. The significance of transpirationally - Derived nitrogen in protein synthesis in fruiting plants of pea (*Pisum sativum*). Journal of Experimental Botany, Oxford, 24: 596-606, 1973.
- LOSADA, M.; RAMIREZ, J.M.; PANEQUE, A.; DELCAMPO, F.F. Light and dark reduction of nitrate in a reconstituted chloroplast system. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, 109: 86-96, 1965.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, Colchester, 193: 265-75, 1951.
- MACHOWN, C.T.; JACKSON, W.A.; VOLK, R.J. Restricted nitrate influx and reduction in corn seedlings exposed to ammonium. Plant Physiology, Rockville, 69: 353-60, 1982.
- McLEESTER, R.C.; HALL, T.C.; SUN, S.M.; BLISS, F.A. Comparison of globulin proteins from *Phaseolus vulgaris* with those from *Vicia faba*. Phytochemistry, New York, 12: 85-93, 1973.

- MAGALHÃES, A.C.; PETERS, D.B.; HAGEMAN, R.H. Influence to temperature on nitrate metabolism and leaf expansion in soybean (*Glycine max* L. Merr.). Plant Physiology, Rockville, 58: 12-6, 1976.
- MALHOTRA, R.C. Chemistry of corn seed germination. Cereal Chemistry, St. Paul, 11: 105-9, 1934.
- MARCUS, A. & FEELEY, J. Activation of protein synthesis in the inhibition phase of seed germination. Proceedings National Academic Science, Washington, 51: 1075-9, 1965.
- MARCUS, A.; FEELEY, J.; VOLCANTI, T. Protein synthesis in inhibited seeds. III. Kinetics of amino acid incorporation, ribosome activation and polysome formation. Plant Physiology, 41: 1167-72, 1966.
- MARTIN, G.G.; MUSATENKO, L.T.; NESTEROVA, A.N.; BERESTETS'KII, V.O. Morphophysiological characters of bean seed embryos during the embrionic period of development. Ukrains' Kii Botanichnii Zhurnal, Ukrainian, 37(4): 11-3, 1980.
- MAYER, A.M. Metabolic control of germination. In: KNAN, A.A., ed. The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. Amsterdam, North-Holland, 1977. 447p.
- MAYER, A.M. & SHAIN, Y. Control of seed germination. Annual Review of Plant Physiology, Rockville, 25: 167-93, 1974.
- MAYER, A.M.; POLJAROFF-MAYKER, A.; KRISHNARO, N. Properties and changes of glucose-6-phosphate dehydrogenase in germinating lettuce seeds. Plant Cell Physiology, Kyoto, 7 (1): 25-33, 1966.

- MEHTA, P. & SRIVASTAVA, H.S. Comparative stability of ammonium and nitrate induced nitrate reductase activity in maize leaves. Phytochemistry, New York, 19: 2527-34, 1982.
- MELO, M. (Centro de Biotecnologia Agrícola - ESALQ - Piracicaba). Comunicação pessoal, 1989.
- MENDEL, G. Versuch über Pflanzennhybriden. Verhandlungen des Natur-forschenden Vereins in Brunn, 1866. 4:3-47. (English translation in Experiments in Plant Hybridization). Edinburgh, Oliver & Boyd, 1965. 95p.
- MILLERD, A. Biochemistry of legume seed proteins. Annual Review of Plant Physiology, Rockville, 26: 53-72, 1975.
- MOHANTY, B. FLETCHER, J.S. Ammonium influence of the growth and nitrate reductase activity of Paul's Scarlet nose suspension cultures. Plant Physiology, Rockville, 58: 152-89, 1976.
- MORILLA, C.A.; BOYER, J.S.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reductase and polyribosomal content of corn having low leaf water potentials. Plant Physiology, Rockville, 51: 817-24, 1973.
- MORAES, R.M. & ANGELUCCI, E. Chemical composition and amino-acid contents of Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*). Journal of Food Science, Chicago, 34: 493-4, 1971.
- MORINAGA, T. Effects of alternating temperatures upon the germination of seeds. American Journal of Botany, Columbus, 13: 141-58, 1926.

- MORRIS, D.A. Germination inhibitors in developing seeds of *Phaseolus vulgaris*. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, Berlin, 86(5): 433-41, 1978.
- MOUNFIELD, J.D. The Proteolytic enzymes of Sprouted wheat II. Biochemistry Journal, Colchester, 30: 1778-86, 1936.
- NAIK, M.S. & NICHOLAS, D.J.D. Malate metabolism and its relation to nitrate assimilation in plants. Phytochemistry, New York, 25: 571-6, 1986.
- NASON, A. & EVANS, H.J. Pyridine nucleotide-nitrate reductase from extracts of higher plants. Plant Physiology, Rockville, 28: 233-45, 1953.
- NICHOLAS, J.C.; HARPER, J.E.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reductase in soybeans. I - Effect of light and temperature. Plant Physiology, Rockville, 58: 731-5, 1976.
- NOTTON, B.A.; FIDO, R.J.; HEWITT, E.F. The presence of functional haem in a higher plant nitrate reductase. Plant Science Letters, Limerick, 8: 165-70, 1977.
- OAKS, A. Nitrate reductase in roots and its regulation. In: HEWITT, E.J. & CUTTING, C.V. ed. Nitrogen assimilation of plants. London, Academic Press, 1979. p. 217-29.
- OAKS, A.; ASLAM, M.; BOESEL, I. Ammonium and amino-acids as regulators of nitrate reductase in corn roots. Plant Physiology, Rockville, 59: 391-4, 1977.

- OJI, Y.; MIKI, Y.; OKAMOTO, S. Extraction and affinity purification of NADH: nitrate reductase from barley (*Hordeum distichum* L.) rppts. Plants Cell Physiology, Kyoto, 23: 1025-31, 1982.
- OOTA, Y.; FUJII, R.; OSAWA, S. Change in chemical constituents during the germination stage of a bean, *Vigna sesquipedalis*. Journal of Biochemistry, Colchester, 40: 649-61, 1953.
- ORIHUEL-IRANZA, B. & CAMPBELL, W.H. Development of NAD(P)-H; and NADH: nitrate reductase activities in soybean cotyledons. Plant Physiology, Rockville, 65: 595-608, 1980.
- OSBORNE, T.B. Proteins of plants. Science, Washington, 28: 417-27, 1908.
- OSBORNE, T.B. & CAMPBELL, G.F. The proteins of lupin seed. Journal of the American Chemical Society, New York, 19: 454-82, 1896.
- PADMANABAHAN, S.Y. Rice in the coming the year. Intensive Agriculture, New Delhi, 4(8): 6-7, 1966.
- PANEQUE, A. Flavim nucleotide reductase from Spinach. Biochemica Biophysica Acta, Amsterdam, 109: 79-85, 1965.
- PENNER, D. & ASHTON, F.H. Proteolytic enzyme control in squash cotyledones. Nature, London, 212: 935-6, 1966.
- PURANIK, R.M. & SRIVASTAVA, H.S. Increase in nitrate reductase activity in the presence of sucrose in bean leaf segments. Phytochemistry, New York, 22(11): 2383-7, 1983.

- RADIN, J.W. "In vivo" assay of nitrate reductase in cotton leaf discs. Plant Physiology, Rockville, 51: 332-6, 1973.
- RADIN, J.W. Differential regulation of nitrate reductase induction in roots and shoots of cotton plants. Plant Physiology, Rockville, 55: 178-83, 1975.
- RADIN, J.W. Aminoacid interactions in the regulation of nitrate reductase induction in cotton tips. Plant Physiology, Rockville, 60: 467-9, 1977.
- RAGHAVAN, V. Applied aspects of embryos culture. In: REINERT, J. & BARAJ, P.S. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, Springer Verlag, 1977. p.375-97.
- RANDALL, P.J. Changes in nitrate and nitrate reductase levels on restoration of molybdenum to molybdenum deficient plants. Australian Journal of Agricultural Research, Melbourne, 20: 635-42, 1969.
- RATHNAM, C.K.M. & EDWARDS, G.E. Distribution of nitrate assimilating enzymes between mesophyll protoplasmic and bundle sheath cell in leaves of three groups of C_4 plants. Plant Physiology, Rockville, 57: 881-5, 1976.
- REDINBAUGH, M.G. & CAMPBELL, W.H. Purification of squash-NADH: nitrate reductase by zinc chelate affinity chromatography. Plant Physiology, Rockville, 71: 205-10, 1983.
- RICHARDS, F.J. The quantitative analysis of growth. In: STEWARD, F.C., ed. Plant Physiology a treatise. New York, Academic Press, 1969. V.5A, 435p.

- ROMANI, V.L.M. Estudos bioquímicos sobre a variabilidade da composição proteica em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Piracicaba, 1983. 101p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- RYAN, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. Annual Review of Plant Physiology, Copenhagen, 24: 173-96, 1973.
- RYAN, C.A.; NELSON, R.S.; HARPER, J.E. Nitrogen assimilation and inheritance of three soybean mutants with decreased leaf nitrate reductase activity. Plant Physiology, Rockville, 69S: 116-25, 1982.
- SACCHI, N. Aspectos bioquímicos e histológicos do desenvolvimento de embriões de feijão (*Phaseolus vulgaris*) "in vitro", 1985. 59p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- SANDERSON, G.W. & COCKING, E.C. Enzymic assimilation of nitrate in tomato plants. I. Reduction of nitrate to nitrite. Plant Physiology, Rockville, 39: 416-31, 1964.
- SASAKAWA, H. & YAMAMOTO, Y. Influence of some internal and external conditions on the induction of nitrate reductase in rice seedlings. Plant and Cell Physiology, Kyoto, 18: 207-14, 1977b.
- SASAKAWA, H. & YAMAMOTO, Y. Nitrate assimilation in rice seedlings as affected by mineral nutrition. Plant and Cell Physiology, Kyoto, 18: 215-24, 1977a.

- SCHRADER, L.E.; RITNOUR, G.L.; EILRICH, G.L.; HAGEMAN, R.H.
Some characteristics of nitrate reductase from higher plants. Plant Physiology, Rockville, 43: 930-42, 1968.
- SERRA, J.L.; LLAMA, M.J.; CARDENAS, E. Nitrate utilization by the diatomacea *Skeletonema costatum*. Plant Physiology, Rockville, 62: 987-90, 1978.
- SHANER, D.L. & BOYER, J.S. Nitrate reductase activity in maize leaves (*Zea mays* L.). I. Regulation by nitrate flux. Plant Physiology, Rockville, 58: 499-504, 1976a.
- SHANER, D.L. & BOYER, J.S. Nitrate reductase activity in maize leaves (*Zea mays* L.). II. Regulation of nitrate flux at low leaf water potential. Plant Physiology, Rockville, 58: 505-9, 1976b.
- SHIH, D.S. & KAESBERG, P. Translation of brome mosaic viral ribonucleic acid in a cell-free system derived from wheat embryo. Proceedings the National Academic of Science, Washington, 70: 1799-803, 1973.
- SILVA, A.J. Respostas de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) à adubação nitrogenada. Piracicaba, 1988. 85p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- SINNOTT, E.W. Plant morphogenesis. Nova York, McGraw, 1960. 550p.

SLUITERS-SCHOLTEN, C.M. Effect of chloranfenicol and cichloheximide on the induction of nitrate reductase and nitrite reductase in bean leaves. Planta, New York, 113: 229-40, 1973.

SLUITERS-SCHOLTEN, C.M. Photosynthesis and the induction on nitrate reductase and nitrite reductase in bean leaves. Planta, New York, 123: 175-84, 1975.

SOARES, M.I.M.; LIPS, S.H.; CRESSWELL, C.F. Endogenous nitrate loss as an assay for nitrate reduction in vivo. Physiology Plant, Copenhagen, 64: 487-91, 1985.

SOMERS, D.A.; KUO, T.M.; KLEINHOF, A.; WANER, R.L.; OAKS, A. Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. Plant Physiology, Rockville, 72: 949-52, 1983.

SPRAGG, S.P. & YEMM, E.W. Respiratory, mechanism and the changes of glutathione and ascorbic acid in germinating peas. Journal of Experimental Botany, Oxford, 10: 409-25, 1959.

SRIVASTAVA, H.S. Distribution of nitrate reductase in aging bean seedlings. Plant and Cell Physiology, Kyoto, 16(6): 995-9, 1975.

SRIVASTAVA, H.S. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. Phytochemistry, New York, 19: 725-33, 1980.

STEWART, R.G. & RHODES, D. Control of enzyme levels in the regulation of nitrogen metabolism. In: SMITH, H., ed. Regulation of enzymes, synthesis and activity in higher plants. London, Academic Press, 1977. p.1-11.

STILES, W. An introduction to the principles of plant physiology. 2. ed. London, Methuen, 1950. 701p.

STILES, W. Respiration in seed germination and seedlings development. In: RHULAND, W. ed. Handb. Pflanzenphysiol. 12(2); Berlin, 1960. 1421p.

STILES, W. & LEACH, W. Researches on plant respiration. I. The course of respiration of *Lathyrus adoratus* during germination of the seed and the early development of the seedling. Proceedings of the Royal Society of London, London, 111B: 338-55, 1932.

STREETER, J.G. & M.E. BOESLER. Comparison of "in vivo" and "in vitro" assays for nitrate reductase in soybeans leaves. Plant Physiology, Rockville, 49: 448-50, 1972.

STULEN, I.; KOCH.BOSMA, T.; KOSTER, A. Acta Botanica Neerlandica. Aarlanderueen, 20: 389-93, 1971.

STUMPF, P.K. Glycolytic enzymes in higher plants. Annual Review of Plant Physiology, Rockville, 2: 17-34, 1952.

SWADER, J.A. & STOCKING, C.R. Nitrate and nitrite reduction by *Wolffia arrhiza*. Plant Physiology. Rockville, 47: 189-91, 1971.

- TANG, P.S. An experimental study if the germination of wheat seed under water, as related to temperature and aeration. Plant Physiology, Rockville, 6: 203-48, 1931.
- TAYLOR, D.L. Influence of oxygen tension on respiration, fermentation and growth in wheat an rice. American Journal of Botany, Columbus, 29: 721-38, 1942.
- TIMPO, E.E. & NEYRA, C.A. Expression of nitrate and nitrite reductase activities under various forms of nitrogen nutrition in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiology, Rockville, 72: 71-83, 1983.
- VARNER, J.E.; BALCE, L.U.; HUAND, R.C. Senescence of cotyledons of germinating peas. Influence of axis tissue. Plant Physiology, Rockville, 43(1): 90-5. 1968.
- VERMA, D.P.S.; NASH, D.T.; SCHULMAN, H.M. Isolation and in vitro translation of soybean leghaemoglobin mRNA. Nature, London, 251: 74-7, 1974.
- VIDAL TORRADO, P. (Depto. de Solos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP-Piracicaba). Comunicação pessoal, 1989.
- VIEIRA, C. O feijoeiro comum; cultura, doenças e melhoramento. Viçosa, UFV/Imprensa Universitária, 1967. p.183-8.
- YAMAMOTO, Y. Pyridine nucleotide content in the higher plant effect of age of tissue. Plant Physiology, Rockville, 38: 45-54, 1963.

- YAMAYA, T. & OHIRA, K. Nitrate reductase inactivating factor from rice cells in suspension culture. Plant and Cell Physiology, Kyoto, 17: 633-41, 1976.
- YAMAYA, T. & OHIRA, K. Purification and properties of a nitrate reductase inactivating factor from rice cells in suspension culture. Plant and Cell Physiology, Kyoto, 18: 915-21, 1977.
- YAMAYA, T. & OHIRA, K. Nitrate reductase inactivating factor from rice seedlings. Plant and Cell Physiology, Kyoto, 19 (2): 200-11, 1978.
- YATSU, L.Y. & JACKS, T.J. Association of lysosomal activity with aleurone grains in plant seeds. Archives of Biochemistry and Biophysics. San Diego, 124: 466-71, 1968.
- YEMM, E.W. Respiration of plant and their organs. In: STEWART, F.C., ed. Plant Physiology; a Treatise. New York, Academic Press, 1965. v. 4A, 731p.
- WALBOT, U. RNA metabolism in developing cotyledons of *Phaseolus vulgaris*. New Phytologist, Cambridge, 72: 479-83, 1973.
- WALLACE, W. A nitrate reductase inactivating enzyme from maize root. Plant Physiology, Rockville, 52: 197-201, 1973.
- WALLACE, W. Proteolytic inactivation of enzymes. In: SMITH, H., ed. Regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants. London, Academic Press, 1977. p.177-95.

- WALLACE, W. & PATE, J.S. Nitrate reductase in field pea (*Pisum arvense* L.). Annals of Botany, New York, 29: 655-71, 1965.
- WALTON, D.C. & SOOFI, G.S. Germination of *Phaseolus vulgaris*. III. The role of nucleic acid and protein synthesis in the initiation of axis elongation. Plant Cell Physiology, Kyoto, 10: 307-15, 1979.
- WILSON, A.K. Wheat, soybean and oat germination studies with particular reference to temperature relationships. Journal of the American Society of Agronomy, Washington, 20: 599-619, 1928.
- WRAY, J.L. Structure of higher plant nitrate reductase. In: SYMP. NITRATE ASSIMILATION MOLECULAR AND GENETIC ASPECTS, NQ, Gatersleben, 1982. Proceedings. Gatersleben, s. ed., 1982. p.6-28.