CULTURA DE TECIDO DE FOLHAS DE FEIJOEIRO
(*Phaseolus vulgaris* L.): INFLUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS

GENI SUNTA TONIN

Orientador: PROF. DR. OTTO JESU CROCROMO

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Solos e Nutrição de Plantas

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho, 1978

As coisas que criamos são partes de nós mesmos.
Ao dedicá-las, doamo-nos um pouco.

Muitos me ajudaram. Todos, porém, o fizeram
por acreditar no meu trabalho ou em minha pessoa.

Pouca é a retribuição que posso lhes dar.

Faço-o, porém, doando-lhes um pouco de mim própria,
dedicando-lhes este trabalho.

Aos meus amigos

OFEREÇO

AGRADECIMENTO

Existem pessoas cujo apoio decidido e encorajamento incondicional são fatores determinantes do nosso sucesso.

Ao PROF. OTTO JESU CROCOMO, orientador e principal artífice de todo o meu sucesso, o meu público reconhecimento e a minha eloquente gratidão.

Três pessoas e um sō nome: MARIA

Três formações e um sō predicado: BONDADE

À MARIA TEREZA V. DE CARVALHO,

MARIA APARECIDA VALÉRIO e

MARIA APARECIDA GOBETTI

uma sō palavra: OBRIGADA!

Sôzinha não teria conseguido vencer tantas e tão grandes dificuldades. Os benefícios de três instituições, porém, amenizaram o meu trabalho.

A elas:

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA (CENA)

FUNDAÇÃO FACULDADE DE AGRONOMIA LUIZ MENEGHEL (FFALM)

COORDENADORIA DE APOIO A PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)

Os meus sinceros agradecimentos.

I N D I C E

	<u>Página</u>
1. RESUMO	01
2. INTRODUÇÃO	04
3. REVISÃO DA LITERATURA.	08
3.1. INDUÇÃO DE MORFOGÊNESE.	08
3.2. FONTES DE NITROGÊNIO	14
3.2.1. AMINOÁCIDOS ESTIMULADORES DE CRESCIMENTO	16
3.2.2. INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO POR AMINOÁCIDOS.	19
3.2.3. EFEITO DOS IONS ACOMPANHANTES.	24
3.2.4. MORFOGÊNESE	24
4. MATERIAL E MÉTODO	28
4.1. CULTIVO DAS PLANTAS	28
4.2. ESTERILIZAÇÃO DAS FOLHAS E OBTENÇÃO DOS EXPLANTES	29
4.3. TRANSFERÊNCIA DOS EXPLANTES	29
4.4. MEIO BÁSICO	29
4.5. ALTERAÇÕES NO MEIO BÁSICO	30
4.6. ALTERAÇÕES NOS MEIOS A E F	30
4.7. ALTERAÇÕES NOS MEIOS B E F	30
4.8. VARIAÇÃO NAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO GLUTÂMICO (MEIO B).	30
4.9. MODIFICAÇÕES NOS FITOHORMÔNIOS.	35
4.10. AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS	35
4.11. CÁLCULO DO IC E IM	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. COMPORTAMENTO DOS AMINOÁCIDOS EM GRUPOS	37
5.2. ALTERAÇÕES NOS MEIOS A E F.	43

Página

5.3. ALTERAÇÕES NOS MEIOS B E F	52
5.4. ADIÇÃO DE ÁCIDO GLUTÂMICO AO MEIO DE CULTURA, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	59
5.5. MODIFICAÇÕES NOS FITOHORMÔNIOS.	69
6. CONCLUSÕES	78
7. SUMMARY	80
8. LITERATURA CITADA.	83
9. APÊNDICE	98

ABREVIATÖES USADAS

No presente trabalho foram usadas abreviaturas, principalmente as relacionadas a seguir:

Arg	=	Arginina
Asp	=	Ácido aspártico
Cys	=	Cisteína
Gly	=	Glicina
Glu	=	Ácido glutâmico
His	=	Histidina
Ile	=	Isoleucina
Met	=	Metionina
Phe	=	Fenilalanina
Pro	=	Prolina
Ser	=	Serina
Thr	=	Treonina
Tyr	=	Tirosina
DNA	=	Ácido desoxiribonucleico
2,4-D	=	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
IAA	=	Ácido indolacético
IC	=	Índice de crescimento
IM	=	Índice de morfogênese
NAA	=	Ácido naftaleno acético
RNA	=	Ácido ribonucleico

1. RESUMO

O presente trabalho consta de uma série de experimentos desenvolvidos no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/ESALQ/USP). A sua principal finalidade foi a de obter um meio quimicamente definido, para cultura de tecido de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).

Sementes de feijão, (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. carioca, foram germinadas em areia lavada e mantidas, posteriormente, em solução nutritiva nº 2 de Hoagland e Arnon.

Do primeiro par de folhas das plantas de feijoeiro foram retirados, assépticamente, explantes de aproximadamente 4 x 4 mm e inocu-

lados em meio de cultura.

O meio de cultura básico utilizado, foi meio sólido contendo sais minerais, vitaminas e sacarose como fonte energética.

Como fatores de crescimento foram fornecidos ao meio cinetina e IAA ou cinetina, IAA, NAA e 2,4-D. O pH dos meios foi acertado para 5,6 após a adição de todos os nutrientes.

Aminoácidos isolados ou em grupos foram adicionados ao meio básico para observar a eficiência destas substâncias em promover crescimento de calos e morfogênese de raízes em feijão.

Dois meios de cultura considerados como referência foram mantidos. Um deles contendo caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio reduzido (meio E); e o outro meio (meio G) contendo apenas o meio básico sem aminoácidos e sem caseína hidrolizada.

Durante o desenvolvimento das culturas foram feitas avaliações periódicas do crescimento de calos e desenvolvimento de morfogênese. No final de cada ensaio o peso fresco e o peso seco foram medidos.

Com base nos dados obtidos foi calculado o IM (Índice de Morfogênese), o IC (Índice de Crescimento) e os resultados foram submetidos a tratamento estatístico.

Pela análise dos resultados observou-se que o meio de cultura que determinou melhor morfogênese foi o meio A contendo o meio básico acrescido de cinetina (1 mg/l), IAA (5 mg/l) e um grupo de três aminoá

cidos, arginina (60 mg/l), ácido aspártico (50 mg/l) e cisteína (10 mg/l).

O meio B constituído de meio básico, acrescido de cinetina (1 mg/l), IAA (5 mg/l) e um grupo de três aminoácidos, ácido glutâmico, (65 mg/l), glicina (25 mg/l) e histidina (10 mg/l) ocasionou uma drástica inibição tanto no crescimento como na morfogênese. Dentre os aminoácidos deste último, o ácido glutâmico revelou-se como sendo a substância que ocasionou a repressão do crescimento.

Quando foram testadas dezesseis concentrações de ácido glutâmico, mantendo glicina e histidina constantes, os resultados permitiram concluir que não foi a presença de ácido glutâmico, no meio B, a causa da repressão, mas a concentração usada (65 mg/l). Assim, pode-se observar que concentrações baixas de ácido glutâmico proporcionam um bom crescimento em culturas de tecido de folhas de feijoeiro e que em concentrações elevadas o crescimento decai.

O melhor crescimento de calos foi obtido no meio B₄ em que o meio básico foi acrescido de quatro hormônios, cinetina (0,2 mg/l), IAA (2 mg/l), NAA (1 mg/l), e 2,4-D (1 mg/l) e um grupo de três aminoácidos, ácido glutâmico (0,5 mg/l), glicina (25 mg/l) e histidina (10 mg/l).

2. INTRODUÇÃO

A cultura de tecido de plantas como um ramo da Biologia, iniciou-se como uma mera especulação científica por Haberlandt no começo deste século. Philip R. White na década de 1930 fez suas primeiras contribuições significativas com culturas contínuas de pontas de raiz de tomate. Ele publicou vários trabalhos onde questionou o "como" e o "porque" do comportamento das células cultivadas *in vitro*.

Depois da Segunda Guerra Mundial, houve um florescimento de trabalhos usando a técnica da cultura de tecido em plantas, visto que esta técnica preconizava a resolução dos problemas biológicos. Melchers na Alemanha, Street na Inglaterra, Gautheret, J. Nitsch, C. Nitsch e Mo-

rel na França, e Steward nos Estados Unidos são os nomes dos primeiros pesquisadores cujas contribuições resultaram não somente no avanço desta técnica mas também num melhor conhecimento dos fenômenos biológicos básicos.

Uma das aplicações da cultura do tecido é o estudo do mecanismo da diferenciação celular. Assim, a cultura de determinado tipo morfológico de tecido com capacidade ilimitada de crescimento oferece imensas possibilidades na compreensão da diferenciação. A diferenciação envolve a formação de diferentes órgãos a partir de um tecido potencialmente capaz de originar vários tecidos durante o seu crescimento e desenvolvimento.

Na realidade os organismos vivos variam grandemente quanto à complexidade, ciclo de vida, modos de propagação e reprodução. Tais organismos, entretanto, adquiriram durante o longo período evolucionário, a característica comum de serem representados em algum estágio do desenvolvimento por uma única célula, de modo que a complexidade alcançada e os eventos ocorridos durante seus ciclos de vida devem ter se originado dessa única unidade. Consequentemente, a célula deve conter toda a informação necessária para que o organismo cresça e se reproduza em seu ambiente. Nesse sentido, então, essa única unidade é totipotente.

Os primeiros sucessos no crescimento de tecidos de calos, foram obtidos com explantes contendo grande número de células, principalmente aqueles que continham células maristemáticas de câmbio, através dos quais se pode obter o crescimento de células diferenciadas.

O crescimento das células vegetais é controlado por hormônios que devem estar presentes nos extratos complexos ou nas soluções que normalmente nutrem o tecido em desenvolvimento.

A primeira evidência da presença de fatores de crescimento em tais soluções veio dos estudos com embriões de *Datura stramonium* (VAN OVERBEEK *et alii*, 1942), cujo crescimento foi estimulado por leite de coco. Por sua vez CAPLIN e STEWARD (1948) demonstraram um efeito pronunciado do leite de coco no crescimento de células diferenciadas não cambiais isoladas de raízes de cenoura. Em outros estudos foi adicionado ao meio o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ocorrendo então a divisão de células em espécies que anteriormente apresentavam mau crescimento.

O emprego de sistemas não definidos tais como leite de coco (CAPLIN e STEWARD, 1948; GAUTHERET, 1952), caseína hidrolizada (CAPLIN, 1956), extrato de levedura ou DNA envelhecido (SKOOG, 1954) eram necessários para promover um crescimento ativo do tecido cultivado. Estes resultados levaram os autores a buscas com o intuito de identificar os constituuintes ativos, destes sistemas complexos, que induziam crescimento. Daí a identificação da 6-furfurilaminopurina, em 1955, chamada por Skoog de cinetina para descrever sua capacidade de iniciar a divisão celular.

A inclusão de citocininas em meio de cultura, tornou possível a obtenção de culturas de calos de um grande número de espécies de plantas e induzir a formação de estruturas organizadas a partir destes tecidos, como as obtidas por SKOOG e MILLER (1957). Usando várias combinações de auxina e cinetina, esses pesquisadores foram capazes de controlar a formação de raízes e parte aérea a partir de calos de fumo.

Considerando então a grande importância que parecem ter as formas reduzidas de nitrogênio no desenvolvimento das células de plantas, nos propusemos a realizar o presente trabalho. Os seus objetivos primários foram os de estabelecer um meio quimicamente definido para cultura de tecido de feijão o qual evitasse não só o uso de caseína hidrolisada como também o de extrato de sementes de feijão ou de sementes de feijão em germinação (CROCOMO *et alii*, 1976). Esse meio proporcionaria a elucidação do metabolismo de pelo menos alguns aminoácidos em estudos posteriores da Seção de Bioquímica de Plantas do CENA, onde o mesmo foi realizado. Em sentido mais amplo, e projetados para o futuro, os seus objetivos são o de uma contribuição para pesquisas envolvendo o isolamento de linhas celulares auxotróficas e autotróficas em termos de aminoácidos a partir de calos de *Phaseolus vulgaris*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. INDUÇÃO DE MORFOGÊNESE - STEWARD e MAPES (1963), verificaram que células isoladas de floema de cenoura, quando colocadas em cultura onde o meio é suplementado com leite de coco, se reproduzem, originando novos embriões que, quando plantados, reconstituem o pé de cenoura. O processo pode ser repetido, usando-se células isoladas de floema desta última planta. Tais plantas são férteis e perfeitamente normais. Experimentos semelhantes com regeneração completa de plantas, a partir de células isoladas de folhas de fumo, foram obtidas em 1971 por Jullien, o qual observou que a regeneração de plantas a partir de células isoladas ocorre tanto a partir de indivíduos haplóides como diplóides.

As enormes possibilidades oferecidas pela cultura de células isoladas podem ser rapidamente resumidas: como meio de "multiplicar" plantas, fazendo-se milhares de cópias idênticas à original, e como meio de "modificar" plantas (HANDRO, 1974).

As células em cultura podem ser facilmente colocadas sob a ação de agentes mutagênicos; as células mutantes que conseguem se dividir vão produzir plantas inteiras constituídas somente de células mutadas, ao contrário dos resultados de mutações obtidas, por exemplo, por irradiação de pontos vegetativos com raios gama, onde há mistura de células normais e células mutadas.

Bons resultados, aliados à facilidade de obtenção de indivíduos haplóides, deixam abertas enormes possibilidades quanto ao melhoramento de plantas utilizando-se técnicas de cultura *in vitro*. Além disso, os protoplastos constituem excelente material para estudos sobre regeneração da parede celulósica e fisiologia celular.

Dentre a diversidade de morfogênese que certos organismos podem exibir, regenerando diferentes estruturas quando fragmentos de determinados órgãos são cultivados *in vitro*, um dos casos interessantes é a produção de embriões (embrióides). São estruturas que podem se desenvolver a partir de cultura de células isoladas ou de tecidos que contêm ou não células meristemáticas, mas sempre tecidos vegetativos. Essas estruturas, que repetem morfológicamente os estados da embriogênese zigótica, constituem uma verdadeira, "embriogênese somática". Inúmeros são os casos conhecidos dessa formação de embriões em cultura de tecidos somáticos

(HALPERIN, 1969), mas na maioria dos casos não se conhece as condições fisiológicas precisas que determinam essa orientação na morfogênese, nem os aspectos histológicos do início dessa diferenciação nem o fenômeno pode ser perfeitamente controlado através da manipulação do meio de cultura. Por exemplo, a cultura de células provenientes de calos formados em cultura de *Atropa belladonna* apresenta, ao mesmo tempo, a formação de embriões, raízes e caules (STREET *et alii*, 1972). Já *Petunia inflata* e *Petunia híbrida* apresentam a mesma diversidade de morfogênese em cultura de fragmentos de caule ou folha, mas neste caso é facilmente controlada segundo a aplicação de diferentes auxinas e citocininas (HANDRO *et alii*, 1972).

Os fenômenos de morfogênese, ocorrem a partir da primeira divisão do zigoto, conduzindo a diferentes níveis de organização, ou seja, órgãos ou organismos como um todo.

Assim, os fenômenos morfogênicos concernem à formação, crescimento e regeneração de órgão, incluindo no caso dos vegetais, por exemplo, o desenvolvimento do embrião, iniciação e crescimento de raízes, folhas, gemas vegetais e florais, desenvolvimento de frutos, fenômenos de abscisão, etc. X

A obtenção orientada de flores, caules e raízes *in vitro* tem sido conseguida com sucesso por NITSCH e NITSCH (1967) e HANDRO (1975).

Muitos autores trabalhando com células de mamíferos verificaram a necessidade de suplementar o meio básico com soro, plasma ou extratos de tecido. FISHER (1948) trabalhando com células animais suplementou o meio básico com plasma, soro e extrato de embrião de galinha,

dializados, na esperança de identificar os componentes essenciais de menor peso molecular. Esta tentativa não obteve bons resultados.

STEWART e MAPES (1963) trabalhando com células vegetais suplementaram o meio básico com leite de coco. Foram obtidos resultados, mas o meio permanecia quimicamente indefinido.

MENTA (1966) definiu o método para obter crescimento rápido de células em suspensão de maceração de raízes de *Phaseolus* e usou este sistema para estudar o crescimento usando a atividade mitótica como ponto de referência (MENTA *et alii*, 1967). Os autores observaram que atividade mitótica alcançava um pico durante a 1a. semana ou depois de 10 dias de inoculação em meio fresco e caía drasticamente depois.

A adição de extrato de sementes de feijão em meio nutriente contendo sais, vitaminas, auxinas e citocininas, promoveu a proliferação de calos e morfogênese de raízes e parte aérea em explantes de folha de *Phaseolus vulgaris*, (CROCOMO *et alii*, 1976). No preparo desse extrato o período de pré-tratamento das sementes em água arejada e a concentração do extrato foram pontos críticos na obtenção dos resultados.

Culturas em suspensão foram reconhecidas como um sistema no qual experimentos em larga escala podem ser conduzidos. VELIKI e MARTIN (1970) desenvolveram o meio 67-V para experimentos do tipo fermentação com *Phaseolus vulgaris*. GAMBORG *et alii* (1968) usaram um meio definido, B-5, para estudar o efeito de diferentes agentes químicos no crescimento de células de soja (*Glycine max*).

HILDEBRAND *et alii* (1963) incluíram em seus experimentos

duas variedades de *Phaseolus vulgaris*. Excelente crescimento foi obtido em meio contendo leite de coco, ácido alfa-naftalenoacético (NAA) e ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) mas não houve formação de clorofila. Este foi um grande contraste porque no mesmo meio utilizando ervilha, houve formação de clorofila. Em trabalho posterior (KANT e HILDEBRAND, 1969) as duas variedades de *Phaseolus* continuaram sem clorofila. O exame citológico revelou que a cultura do feijão continha um número relativamente alto de grânulos de amido em volta do núcleo. Em algumas espécies era possível induzir a formação de clorofila, baixando o nível de açúcar exógeno fornecido como nutriente à parte, além do contido no leite de coco. Isto não produziu efeito na formação de clorofila em calos de feijão.

DOUGALL (1964) e LAMPORT (1964) em trabalhos independentes examinaram suspensões de cultura de tecido incluindo variedades de *Phaseolus* enfatizando o crescimento energético. Parece que *Phaseolus vulgaris* podia ser facilmente cultivado em cultura em suspensão com alto grau de crescimento.

Extrato de levedura é amplamente usado em culturas de microrganismos e também ocasionalmente usado em culturas de tecidos de plantas como fonte de aminoácidos e vitaminas (SHARP e CROCOMO, 1975). A caseína é também usada como fonte de nitrogênio. Em arroz seus resultados foram menos satisfatórios como fonte de nitrogênio que os do extrato de levedura, (YATAZAWA e FURUHASHI, 1968).

Dos extratos de plantas o mais amplamente usado e o mais eficiente é o leite de coco. Os primeiros trabalhos com o leite de coco foram os de VAN OVERBEEK *et alii* (1942) em cultura de pequenos embriões

de *Datura*. Desde que o leite de coco é um endosperma natural, parece lógica a preferência como um nutriente para embriões pequenos e de difícil cultura. A partir de então foi grande a aplicação na indução de calos e na morfogênese de várias espécies. LINGAPPA (1957) trabalhando com culturas de batata doce, testou várias concentrações de leite de coco, desde 0,5% até 30%, verificou que o crescimento ótimo de calos foi obtido na concentração de 5%.

O meio mais apropriado para obter o desenvolvimento de massa de calos (MEHTA, 1966) é o que contém um suprimento de 10% (v/v) de leite de coco no meio. Em cenoura (STEWART *et alii*, 1964) o leite de coco estimulou a formação de embriões. O tratamento com leite de coco foi o único tratamento que obteve sucesso induzindo divisão celular em grãos de pólen de *Brassica* de todos os tratamentos de hormônios testados, (KAMEYA e HINATA, 1970 citados por SHARP e CROCOMO, 1975).

Efeitos de alcalóides foram testados em culturas de feijão. Nicotina e cafeína foram adicionados em "meio de feijão" juntamente com IAA e cinetina (CROCOMO *et alii*, 1976). Os explantes de folha assim cultivados forneceram resultados sobre o crescimento celular e formação de raízes. Segundo os autores efeitos de concentrações de nicotina exógena, em diferentes concentrações de IAA e cinetina, no controle de crescimento e morfogênese de cultura de tecido de *Phaseolus vulgaris* estabelece inegavelmente que o alcalóide nicotina possui atividade regulatória no crescimento em espécies onde ela é sintetizada ou em outras espécies.

A manipulação dos nutrientes em cultura de tecido torna

possível a averiguação da necessidade e possíveis funções dos diversos compostos dos meios. Leite de coco foi substituído por caseína hidrolizada em "meio de feijão" por CROCOMO *et alii* (1976) com a finalidade de induzir morfogênese a partir de calos de folhas de *Phaseolus*, sob um controle mais rigoroso da situação com vistas aos nutrientes e pH. A partir destes estudos um conhecimento mais apurado dos nutrientes usados foi obtido. Os autores propõem trabalhos futuros para testes onde caseína possa ser substituída por nutrientes mais específicos tendo em vista uma melhor definição química do meio.

Quando se quer manter um meio quimicamente definido, o uso de extratos de plantas não é aconselhável, pode ser usado, porém para culturas cuja composição do meio não é essencial (tal como a propagação de espécies). O uso de extratos de plantas para melhorar o crescimento e facilitar a indução de culturas pode ser muito proveitoso, mas para estudos de nutrição e bioquímica, os extratos adicionam variáveis desconhecidas no sistema.

3.2. FONTES DE NITROGÊNIO - Paralelamente à evolução das técnicas de isolamento e cultura de células, trabalhos exaustivos vêm sendo desenvolvidos por muitos pesquisadores com a finalidade de obter meios quimicamente definidos para os tipos de cultura especialmente no que concerne às fontes de nitrogênio.

O nitrogênio é necessariamente o componente mais importante de cada meio, e a qualidade e quantidade da fonte de nitrogênio in-

fluencia enormemente o crescimento da cultura, e pode influenciar as células bioquimicamente (VELIKY e BARBER, 1975).

O estudo do metabolismo das culturas de tecidos fornece inumeráveis resultados concernentes particularmente ao metabolismo nitrogenado, aos fatores de crescimento e de certas substâncias específicas.

O nitrogênio tem sido suprido numa variedade de formas diferentes segundo as diferentes espécies de células de plantas cultivadas *in vitro*. Estas incluem o estado de oxidação do nitrogênio de +5 e -3, no nitrato e amônio bem como em compostos orgânicos. Ocorre rapidamente crescimento no meio que contém o nitrato como única fonte de nitrogênio em várias espécies. "Paul's Scarlet Rose" (NASH e DAVIES, 1972) e cenoura (REINERT *et alii*, 1967) são algumas dessas espécies. O nitrato foi também a melhor fonte de nitrogênio selecionada para fumo e *Populus* (MATSUMOTO *et alii*, 1971). Por outro lado há espécies que crescem muito pouco só em nitrato como o arroz (YATAZAWA e FURUHASHI, 1968), e a orquídea (RAGHAVAN e TORREY, 1964).

Medidas de nitrato em culturas em suspensão de Paul's Scarlet Rose mostraram que somente 5% do nitrato é encontrado depois de 6 dias de crescimento, decrescendo para zero no final de 10 dias (a concentração inicial era de 10 mM/l; NASH e DAVIES, 1972).

O arroz é incapaz de crescer em nitrito nas concentrações de 1-500 ppm, mas o crescimento de cenoura aumenta com o aumento na concentração de nitrito acima de 100 ppm, com inibição somente em 500 ppm de nitrito (YATAZAWA e FURUHASHI, 1968).

3.2.1. AMINOÁCIDOS ESTIMULADORES DE CRESCIMENTO - Nitrogênio reduzido sob a forma de amônio é usado para suplementar o nitrato do meio e normalmente estimula o crescimento (SARGENT e KING, 1974) e a morfogênese (MUNROE e SUSSEX, 1969).

Algumas das complexidades da nutrição de nitrogênio em culturas de células de plantas são abordadas por SALONEN e SIMOLA (1977), por BAYLEY *et alii* (1972), por GAMBORG e SHLUK (1970), por FERGUSON e BOLLARD (1969) e por GAMBORG *et alii* (1968). Eles mostraram, por exemplo, que cultura isolada de soja utiliza nitrogênio nítrico somente em presença do íon amônio ou de glutamina; por outro lado, culturas de células de trigo crescem tendo nitrato como única fonte de nitrogênio. Estes resultados mostram que o metabolismo do nitrogênio de culturas de trigo é diverso daquele observado em culturas de soja. As células de soja crescendo em amônio e nitrato retiram do meio primeiramente o amônio e posteriormente o nitrato. Este comportamento sugere que as células de soja produzem compostos na primeira fase do ciclo de crescimento que diminuem a necessidade de nitrogênio reduzido (BAYLEY *et alii*, 1972).

HENSHAW *et alii* (1966) citado por VELIKY e ROSE (1973) postulam que nitrogênio em determinadas condições é provavelmente um nutriente limitante; nitrogênio em nível elevado promove um aumento no número de células demonstrando que culturas de plantas passam sequencialmente através de uma fase de alto metabolismo nitrogenado (síntese de proteínas e divisão celular) e posteriormente na maturação das células, por intenso metabolismo de açúcares (ROSE e MARTIN, 1972).

Como única fonte de nitrogênio a amônia proporcionaria

crescimento de calos de arroz no mesmo nível como a combinação de nitrato e amônio, na concentração total de nitrogênio; no entanto, a forma como o amônio é suprido é importante visto que citrato de amônio é estimulante para o crescimento enquanto que sulfato de amônio na mesma concentração é inibidor.

GAMBORG (1970) trabalhando com soja, trigo e *Haplopappus* constatou que a adição de citrato resultou na produção maior de células em soja e trigo e causou repressão no crescimento de *Haplopappus*.

Nitrogênio reduzido na forma de composto orgânico é comumente estimulante de crescimento e morfogênese quando adicionado como mistura de diferentes aminoácidos, tais como caseína hidrolizada ou extrato de levedura (SHARP e CROCOMO, 1975). Para o arroz, o extrato de levedura e caseína hidrolizada foram as duas melhores fontes de nitrogênio para o crescimento de calos (YATAZAWA e FURUHASHI, 1968), sendo que caseína hidrolizada aumentou a formação da gametófitos em culturas de plantas inferiores (MUNROE e SUSSEX, 1969).

Caseína hidrolizada e leite de coco podem ser substituídos por aminoácidos (GAMBORG *et alii*, 1968) e o agrupamento de aminoácidos que melhor substituiu a proteína hidrolizada foi lisina, arginina, histidina, ácido aspártico e ácido glutâmico. Um sal de amônio adicionado ao nitrato em quantidades adequadas substitue a fonte de nitrogênio reduzido necessária para o crescimento. Nitrogênio reduzido, em ausência de nitrato não proporciona crescimento adequado. Células de fumo (FILNER, 1966) não crescem quando o amônio é a única fonte do nitrogênio.

Num trabalho inicial, GAMBORG (1970) mostrou que cultura de soja em meio definido requeria amônio ou glutamina para crescer em nitrato. O crescimento cessava quando o nitrato era utilizado sem uma fonte de nitrogênio reduzido. Segundo o mesmo autor, a ausência do crescimento em nitrato como única fonte de nitrogênio, não é influenciada pela concentração de nitrato. O amônio é somente uma fonte de nitrogênio reduzido. Em uma série de experimentos usou vários aminoácidos isolados, em várias concentrações. A adição de glutamina resultou um crescimento igual ao obtido com sulfato de amônio. A L-alanina e putrecina não substituíram o amônio, mas a produção de células foi maior do que as que cresciam somente em nitrato.

Amônio é uma fonte adequada de nitrogênio e possivelmente seja absorvido na forma de amina (CROFTS, 1967). Pode ser usado como uma alternativa de glutamina na formação de nucleotídeos (LONO e PARDEE, 1967) e indol (GIBSON *et alii*, 1967), porém glutamina geralmente é preferida nas reações enzimáticas. O aumento de crescimento por baixas concentrações de amônio parece ser característica de células de soja e indica que a redução do nitrato ao nível de amônio nessas células é estimulada por amônio (GAMBORG, 1970).

Em trabalhos realizados com coníferas HARVEY e GRASHAM (1969) citam que arginina e tirosina estimulam o crescimento de calos.

Outra forma em que nitrato reduzido tem sido adicionado ao meio como nutriente é a uréia e alantoina (YATAZAWA e FURUHASHI, 1968), que são menos efetivos para desenvolver crescimento em cultura de arroz do que amônio, mas melhores do que meios que contêm somente nitrato como

Única fonte de nitrogênio.

BEHRENO e MATELES (1975) fizeram crescer cultura de fumo, tomate e cenoura em meio contendo uréia e o crescimento não foi tão bom como o do meio contendo amônio em termos de produção de células.

A assimilação de uréia em cultura de células de soja foi estudada com detalhes por POLACCO (1976). Aumento em calos (peso fresco) durante 6 a 8 semanas de crescimento em uréia como única fonte de nitrogênio foi observado, em várias concentrações de uréia. Parece que uréia pode servir como fonte de nitrogênio para culturas de células de soja. A concentração ótima para crescimento sugerida pelo autor é de 25 mM.

Espermina, espermidina e cadaverina foram testadas em culturas de soja por BAYLEY *et alii* (1972). Os resultados mostraram que elas não podem substituir amônio e o crescimento proporcionado não foi melhor que o do nitrato sozinho.

O nitrogênio é considerado elemento nutricional limitante para culturas de *A. pseudoplatanus* (YOUNG, 1973). O meio suplementado com amônio ou uréia em várias diluições tinha o nitrogênio completamente esgotado no 17º dia de incubação e o aumento na biomassa das culturas (proteínas e número de células) dava-se no 21º dia. Estes dados analíticos indicam ser o nitrogênio elemento limitante em culturas.

3.2.2. INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO POR AMINOÁCIDOS - Um efeito inibitório da mistura de aminoácidos foi observado na indução de brotos em *Plumago* em culturas por NITSH e NITSH (1967).

Dependendo do aminoácido em particular, ambas, estimulação ou inibição de crescimento podem ocorrer se a suplementação for de um único aminoácido. Em calos de *Pinus*, glicina é inibidora para o crescimento enquanto que asparagina e ácido aspártico são estimulantes (BROWN e LAWRENCE, 1968; ct. por SHARP e CROCOMO, 1975).

FILNER (1966) fez crescer células de fumo num meio em que nitrato era a única fonte de nitrogênio, observando que alguns aminoácidos inibiam o crescimento e também reprimiam a redutase de nitrato. A repressão do crescimento em culturas utilizando aminoácidos pode ser exercida por uma concentração muito alta dos aminoácidos presentes (EAGLE, 1959), como é o caso de metionina e triptofano.

A ausência de crescimento na presença de aminoácidos individuais, (GAMBORG, 1970) pode ser devida à incapacidade desses componentes em substituir o amônio ou por inibir reações metabólicas nas células. A redução no crescimento das culturas de soja, trigo, amora, linho e *Haplopappus*, em culturas de células, causadas por altas concentrações de amônio pode refletir a inibição causada pelo amônio no sistema de enzimas. Amônio inibe sintetase de glutamina em *E. coli* (HOLZER *et alii*, 1967) e causa diminuição nos níveis de nucleotídeos reduzidos de piridina em mitocôndria de fígado (KATUNUMA *et alii*, ct. por GAMBORG, 1970).

Aminoácidos individuais inibem crescimento (BEHREND e MATELES, 1975). Lisina inibiu fortemente cultura de cenoura, enquanto que ácido glutâmico inibiu da mesma forma fumo e prolina inibiu soja. Isoleucina inibiu soja e cenoura. Ácido aspártico inibiu fumo e soja. Alanina, arginina e glutamina não inibiram ou inibiram muito fracamente as culturas.

De um certo modo, o efeito dos aminoácidos está interrelacionado; com a remoção da metionina de uma mistura completa de aminoácidos há uma inibição drástica no crescimento de calos de arroz (FURUHASHI e YATAZAWA, 1970). O efeito da deficiência de metionina é observado somente quando treonina e lisina estão presentes no meio, levando à uma inibição tipo "feed back" da síntese de metionina. Desta forma, o efeito de um único aminoácido pode ser modulado pela adição ou retirada de outros aminoácidos, balanceando o efeito de vários componentes na regulação do metabolismo celular dos aminoácidos.

Estudos de competição isotópica, realizados por DOUGALL (1967) com misturas de aminoácidos proteicos e de Glicose- $U-^{14}C$, utilizando células de "Paul's scarlet rose" em culturas, mostraram que a incorporação de tirosina, valina, histidina, treonina, isoleucina, glicina e serina exógenos em misturas de aminoácidos depende fortemente da contribuição de cada aminoácido ao nitrogênio alfa-amino fornecido ao meio. A alanina, ácido glutâmico e glutamina não são incorporados em proteínas, mas influenciam a incorporação de outros aminoácidos fornecidos ao sistema.

A prolina, arginina, ácido aspártico + asparagina, lisina e leucina exógenos são também incorporados em proteínas, na mistura seu teor de incorporação depende ao mesmo tempo de sua contribuição na formação do alfa-amino total e sua concentração individual ao meio.

Quando glutamato- $1-^{14}C$ foi fornecido às células de rosa, de quatro dias (FLETCHER, 1974), 87,6% do ^{14}C no glutamato recuperado de proteína está no C_1 de glutamato. Concluir-se-ia que glutamato recentemente absorvida é diretamente incorporado à proteína sem um metabolismo

prévio.

O fenômeno de inibição de crescimento por aminoácidos isolados, em culturas de tecido, foi demonstrado por FILNER *et alii* (1969) em culturas de fumo e por GAMBORG (1970) em culturas de soja. Em ambos os casos a inibição ocorre em células crescendo em nitrato como única fonte de nitrogênio. HEIMER e FILNER (1970 e 1971) observaram que aminoácidos isolados inibiam não somente o crescimento de culturas de células de fumo, mas também a absorção de nitrogênio e a atividade da redutase de nitrato. Suas conclusões são de que aminoácidos inibem especificamente a assimilação do nitrato e como resultado o crescimento é inibido. BEHREND e MATELES (1975) confirmam que a inibição de crescimento por aminoácidos isolados ocorre também em cultura de células de cenoura, tomate, fumo e soja. A inibição é causada pela maioria dos aminoácidos e em todas as culturas testadas. No entanto essa inibição pode ser abolida por arginina e isoleucina. A conclusão dos autores é de que o fenômeno de inibição de crescimento de culturas por aminoácidos isolados é um fenômeno geral.

Normalmente culturas de células de plantas não crescem em amônio como única fonte de nitrogênio (FILNER, 1966 e BUTENKO, 1968 ct. por BEHREND, 1975); no entanto GAMBORG e SHYLUK (1970) tiveram bom êxito no crescimento de células de soja em meio com amônio onde eram adicionados ácidos orgânicos, e BUTENKO (1968 ct. por BEHREND, 1975) observou crescimento de tabaco e tumor de girassol em culturas onde succinato de amônio era a única fonte de nitrogênio.

BEHREND e MATELES (1975) desenvolveram um meio onde nitra-

to de potássio foi substituído por succinato de amônio e verificaram que aminoácidos não inibiam o crescimento de células de plantas crescendo em amônio, mas inibiam o crescimento de células de plantas crescendo em uréia.

HEIMER e FILNER (1970 e 1971) ao contrário verificaram que aminoácidos não inibem fumo crescendo em uréia. HEIMER (1970) verificou que treonina inibe a adaptação de cultura de fumo em nitrato e uréia, mas estas células se adaptavam bem em uréia quando inibidas por treonina ou outros aminoácidos.

O efeito de inibição por aminoácidos em culturas de plantas pode ser explicado por duas possibilidades:

- a) Os aminoácidos inibiram o crescimento por um mecanismo e a assimilação de nitrato por outro mecanismo;
- b) Crescimento e assimilação de nitrato seriam ambos inibidos como um efeito secundário da ação dos aminoácidos sobre um terceiro sistema (BEHREND e MATELES, 1975).

Considera-se normalmente que desidrogenase glutâmica é a enzima mais importante na incorporação de amônio no grupo alfa-amino de aminoácidos (GIVAN e LEECH, 1971), mas sintetase de glutamato (DOUGALL, 1974) desidrogenase de alanina (GAMBORG *et alii*, 1968) e outros caminhos para a assimilação de amônio tem também sido demonstrados. É possível que a via de assimilação de amônio intracelular em células crescendo em nitrato ou uréia seja diversa de células crescendo em amônio (BEHREND e MATELES, 1975).

3.2.3. EFEITO DOS IONS ACOMPANHANTES - A importância do ânion acompanhante pode ser devida ao efeito do pH do meio e pode ser a causa da inibição do crescimento da raiz de rosa crescida em amônia (JACOBS *et alii*, 1969 cit. por SHARP e CROCOMO, 1975). Há indicações de que cátions acompanhantes podem ser importantes em experimentos com amônio (REINERT *et alii*, 1967) e teriam um efeito estimulatório na embriogênese influenciando talvez a permeabilidade de células de cenoura e ou estimulando a atividade de enzimas que agem na conversão do nitrogênio *in vitro*.

A produção de biomassa em culturas (VELIKY e ROSE, 1973) é controlada não somente pela utilização de amônio e nitrato e seus níveis de concentração, mas também pelas mudanças de pH resultantes do balanceamento entre cátions e ânions residuais deixados no meio pela utilização do nitrogênio.

3.2.4. MORFOGÊNESE - A expressão morfogênica de culturas de calos e de culturas em suspensão é influenciada pela composição do meio usado (THOMAS e STREET, 1972). Assim, a presença de níveis elevados de amônio favorece o desenvolvimento de plantas incipientes mais do que de raízes. Sais de amônio podem, pois, ter influência na indução de embriogênese (HALPERIN e WETHEREL, 1965) e a adição de cinetina ao meio elimina a necessidade de amônio. A ausência de auxina (NAA) no meio que contém concentrações elevadas de sulfato de amônio (THOMAS e STREET, 1972) mostra um resultado com altos níveis de morfogênese e o tipo de morfogênese obtida é relacionada com a concentração de sulfato de amônio presente no meio.

TAZAWA e REINERT (1969) postularam que o glutamato pode

semelhantemente promover embriogênese em cultura de cenoura, e que a obtenção de estruturas tipo embrião, a partir de cultura de raízes, pode ser devida ao teor de nitrogênio orgânico reduzido no meio. Glicina e glutamina estão também implicadas na formação de embriões e fenotipos respectivamente em duas diferentes culturas. WARIS (1969) e MEINS (1971, ct. por SHARP e CROCOMO, 1975) demonstrando o controle de morfogênese por aminoácidos isolados.

A necessidade de amônio para a formação de embriogênese em cenoura, é estudada por HALPERIN e WETHERELL (1965). Calos crescidos na ausência de amônio não formavam embriões quando transferidos posteriormente para um meio que normalmente propiciaria o desenvolvimento dos mesmos. Exames microscópicos de calos crescidos em nitrato mostram somente células isoladas e uma virtual ausência de estrutura multicelular. Exames de calos crescidos em meio com amônio revelam numerosos filamentos multicelulares que seriam reconhecidos como pré-embriões.

REINERT *et alii* (1967) relataram que nitrato e amônio podiam determinar a formação de embriões em duas variedades de cenoura. O problema levantado pelos autores é como duas fontes de nitrogênio inorgânico tem efeito positivo em embriogênese *in vitro*. Ficou claro que o aumento na concentração de nitrogênio no meio é importante na indução de embriogênese. Quando o conteúdo de nitrogênio do meio foi acrescido ao um alto nível de nitrato de potássio ou nitrato de amônio, embriões desenvolviam-se em 50% das culturas (44,4 mM de nitrogênio) e 10% com baixa concentração de nitrogênio (23 a 17 mM). A redução do nitrogênio de 60mM para 1,5 mM ocasionou a perda da capacidade de formar embriões pelas cé-

lulas de cenoura. Também houve formação de embriões se ácido glutâmico ou uma mistura de aminoácidos fosse adicionada ao meio substituindo nitrato e amônio. O fato de haver diferença qualificativa entre a capacidade do nitrogênio oxidado ou reduzido de induzir embriões demonstra claramente que é a concentração e não a forma de nitrogênio do meio que é importante (REINERT *et alii*, 1967).

Estes resultados são contrários aos de HALPERIN e WETHERELL (1965) que afirmam ser necessário amônio para embriogênese *in vitro* e que este não pode ser substituído por nitrato ou aminoácidos.

Estudos posteriores de Watherell e Dougall trouxeram maior clareza e solidez à posição de seus primeiros resultados.

Em cultura de tecido de cenoura nitrato na concentração de 5 a 90 mM, na forma de KNO_3 , proporcionou somente fraco crescimento e muito baixa embriogênese, WETHERELL e DOUGALL (1976). Acrescendo ao meio uma pequena quantidade de nitrogênio reduzido, na forma de NH_4Cl , permite melhoras na embriogênese. Já a concentração de 10 mM de NH_4Cl , segundo os mesmos autores, proporciona um aumento próximo ao ótimo na embriogênese quando nitrato está na concentração entre 12 a 40 mM. Outras fontes de nitrogênio reduzido podem parcialmente substituir o NH_4Cl . Ácido glutâmico, glutamina, uréia e alanina podem, segundo os mesmos autores, individualmente substituir o NH_4Cl como suplemento para o KNO_3 . Ainda mais, glutamina, alanina e possivelmente ácido glutâmico podem servir como única fonte de nitrogênio proporcionando tanto crescimento como morfogênese. Destas averiguações concluem os autores que uma fonte de nitrogênio reduzido é necessário, ao menos como um suplemento para o nitrato, para um

rápido crescimento e para a embriogênese *in vitro* em cultura de tecido de cenoura.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. CULTIVO DAS PLANTAS - Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. variedade Carioca) foram germinadas em areia lavada na câmara de germinação à temperatura média de 25^o com 13 horas de iluminação diária. As sementes germinadas foram regadas periodicamente com solução nutritiva completa nº 2 de HOAGLAND e ARNON (1950). O período de germinação foi de 7 dias após o qual as plântulas foram transplantadas para vasos individuais com solução nutritiva completa nº 2 de HOAGLAND e ARNON (1950). As plântulas permaneceram nesta solução, em câmara de crescimento, por período de 7 dias em temperatura média de 25^o e com iluminação diárias de 15 horas.

4.2. ESTERILIZAÇÃO DAS FOLHAS E OBTENÇÃO DOS EXPLANTES - Todos os experimentos foram conduzidos usando explantes de aproximadamente 4 x 4 mm de folhas de feijoeiro de duas semanas de idade retirados das folhas do primeiro par de folhas de cada plantinha. Estas foram previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio a 20% v/v por 15 minutos, e em seguida lavadas duas vezes com água destilada esterilizada.

4.3. TRANSFERÊNCIA DOS EXPLANTES - A transferência dos explantes foi efetuada no dia imediato ao da preparação dos meios.

Os meios de cultura foram distribuídos em frascos de cultura tipo "French Square", num volume de aproximadamente 10 ml. Os frascos, contendo os meios, foram autoclavados a 120°C sob pressão de 1 atmosfera durante 20 minutos.

Após a autoclavagem, os frascos contendo o meio bem como as folhas e todo o material a ser utilizado, foram submetidos a luz ultravioleta em câmara asséptica durante 20 minutos.

4.4. MEIO BÁSICO - O meio básico utilizado em todos os experimentos foi o de MURASHIGUE e SKOOG (1962) modificado, contendo sais minerais, vitaminas, inositol e sacarose. Os fatores de crescimento utilizados foram 5 mg/l de IAA (ácido indol acético) e 1 mg/l de cinetina. O pH foi ajustado para 5,6 após a adição de todos os nutrientes.

Como controle foram utilizados: a) meio básico + 2 g/l de caseína hidrolizada (meio E); b) meio básico (meio G).

4.5. ALTERAÇÕES NO MEIO BÁSICO - Foram feitas modificações no meio básico, acrescentando-o de 13 aminoácidos em conjunto ou em grupos. Os aminoácidos usados e suas concentrações foram baseados nos trabalhos de NICKELL e MARETZKI (1969). A tabela 1 mostra a composição dos diferentes meios.

4.6. ALTERAÇÕES NOS MEIOS A E F - Foram feitas alterações no meio A com a finalidade de visualizar as implicações dos aminoácidos deste tratamento isolados ou dois a dois e no meio F para estudar as interações dos treze aminoácidos (Tabela 2). O ensaio foi instalado com 25 repetições para cada meio.

4.7. ALTERAÇÕES NOS MEIOS B E F - Neste ensaio foram estudados a ação dos aminoácidos isoladamente, dois a dois e em interações com os treze aminoácidos do meio F (Tabela 3). O ensaio foi instalado com 25 repetições para cada tratamento.

4.8. VARIAÇÃO NAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO GLUTÂMICO (MEIO B) - Foi montado um ensaio variando as concentrações de ácido glutâmico com a finalidade de visualizar qual o efeito deste aminoácido no crescimento e morfogênese da cultura. As modificações estão na Tabela 4. O ensaio foi instalado com 20 repetições para cada tratamento.

Tabela 1 - Modificações no meio básico (meio G).

Aminoácidos adicionados ao meio básico*	M e i o s					
	A	B	C	D	E	F
	mg/l					
Arginina	60	-	-	-	-	60
Ácido aspártico	50	-	-	-	-	50
Cisteína	10	-	-	-	-	10
Ácido glutâmico	-	65	-	-	-	65
Glicina	-	25	-	-	-	25
Histidina	-	10	-	-	-	10
Isoleucina	-	-	30	-	-	30
Metionina	-	-	20	-	-	20
Fenilalanina	-	-	10	-	-	10
Prolina	-	-	-	40	-	40
Treonina	-	-	-	35	-	35
Tirosina	-	-	-	5	-	5
Serina	-	-	-	50	-	50
Caseína hidrolizada	-	-	-	-	2000	-

*Meio básico G: Na_2HPO_4 (7 H₂O) (37,7 mg/l); KI (0,05 mg/l); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (173,0 mg/l); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,25 mg/l); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,25 mg/l); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (250 mg/l); KNO_3 (800 mg/l); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (100 mg/l); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4,5 mg/l); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,4 mg/l); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,25 mg/l); KCl (200 mg/l); CaCl_2 (135 mg/l); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (27,8 mg/l); Na EDTA (37,3 mg/l); Tiamina (8 mg/l); Piridoxina (0,5 mg/l); Niacinamida (1,25 mg/l); Pantotenato de cálcio (1,0 mg/l); Sacarose (20 g/l); Inositol (100 mg/l); Ácido Indol Acético (IAA) (5 mg/l); Cinetina (1 mg/l); Agar (10 g/l).

Tabela 2 - Modificações nos meios A e F.

Aminoácidos adicionados ao meio básico*	Meios										
	A	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	F	F ₁	F ₂	E
									mg/l		
Arginina	60	60	-	-	60	60	-	60	-	60	-
Ácido aspártico	50	-	50	-	50	-	50	50	-	50	-
Cisteína	10	-	-	10	-	10	10	10	10	-	-
Ácido glutâmico	-	-	-	-	-	-	-	65	65	65	-
Glicina	-	-	-	-	-	-	-	25	25	25	-
Histidina	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10	-
Isoleucina	-	-	-	-	-	-	-	30	30	30	-
Metionina	-	-	-	-	-	-	-	20	20	20	-
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10	-
Prolina	-	-	-	-	-	-	-	40	40	40	-
Treonina	-	-	-	-	-	-	-	35	35	35	-
Tirosina	-	-	-	-	-	-	-	5	5	5	-
Serina	-	-	-	-	-	-	-	50	50	50	-
Caseína hidrolizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2000

*Para composição do meio básico ver rodapé da Tabela 1.

Tabela 3 - Modificações dos meios B e F.

Aminoácidos adicionados ao meio básico*	Meios														
	B	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	F	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	E
								mg/l							
Arginina	-	-	-	-	-	-	-	60	60	60	60	60	60	60	-
Ácido aspártico	-	-	-	-	-	-	-	50	50	50	50	50	50	50	-
Cisteína	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10	10	10	-
Ácido glutâmico	65	65	-	-	65	65	-	65	-	65	65	-	-	65	-
Glicina	25	-	25	-	25	-	25	25	25	-	25	-	25	-	-
Histidina	10	-	-	10	-	10	10	10	10	10	-	10	-	-	-
Isoleucina	-	-	-	-	-	-	-	30	30	30	30	30	30	30	-
Metionina	-	-	-	-	-	-	-	20	20	20	20	20	20	20	-
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10	10	10	-
Prolina	-	-	-	-	-	-	-	40	40	40	40	40	40	40	-
Treonina	-	-	-	-	-	-	-	35	35	35	35	35	35	35	-
Tirosina	-	-	-	-	-	-	-	5	5	5	5	5	5	5	-
Serina	-	-	-	-	-	-	-	50	50	50	50	50	50	50	-
Caseína hidrolizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2000

*Para composição do meio básico ver rodapé da Tabela 1.

Tabela 4 - Modificações nas concentrações de ácido glutâmico.

Aminoácidos adicionados ao meio básico*	Meios																E
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇	B ₈	B ₉	B ₁₀	B ₁₁	B ₁₂	B ₁₃	B ₁₄	B ₁₅	B ₁₆	
	mg/l																
Ácido glutâmico	0,0	0,1	0,3	0,5	1,0	5,0	10	20	30	40	50	60	65	500	1000	2000	-
Glicina	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	-
Histidina	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
Caseína hidrolizada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2000

*Para composição do meio básico ver rodapé da Tabela 1.

4.9. MODIFICAÇÕES NOS FITOHORMÔNIOS - Usando as mesmas condições como indicadas na Tabela 4, foi realizado um ensaio no qual as concentrações de fitohormônios foram as seguintes:

Assim: 2 mg/l - IAA (Ácido indol acético)

0,2 mg/l - Cinetina

1 mg/l - NAA (Ácido naftaleno acético)

1 mg/l - 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

O ensaio foi instalado com 10 repetições para cada tratamento.

4.10. AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS - Após a 3a. semana de incubação de cada experimento foi feita triagem avaliando-se o crescimento de calos e a morfogênese de raízes.

Uma escala de 0 - 5 foi estabelecida para a avaliação de calos. Zero significando não crescimento. Escala semelhante foi utilizada para avaliar morfogênese de raízes (0 a 4). Zero foi atribuído ao frasco onde não se observou a formação de raízes. Para o frasco cujo número de raízes era de 1 a 3 foi atribuído valor 1. Para o frasco cujo número de raízes era de 4 a 7 foi atribuído valor 2. Para um número de raízes de 8 a 12 foi atribuído valor 3. Para número de raízes acima de 12 foi atribuído valor 4. Antes da triagem foram escolhidos padrões para referência, e os experimentos foram avaliados ao acaso levando em consideração os nutrientes do meio.

Após a 5a. semana de incubação, foi realizado uma segunda triagem, nos moldes da anterior. Os pesos fresco e seco foram medidos na 7a. semana.

Todos os ensaios foram mantidos em temperatura ambiente em iluminação com lâmpadas fluorescentes mantendo aproximadamente 10 horas de iluminação diária.

As triagens para o crescimento de calos e indução de raízes foram avaliadas e dos resultados calculou-se o desvio padrão.

Para interpretar o crescimento de calos usou-se o índice de crescimento (IC) e, para a morfogênese de raízes, o índice de morfogênese (IM).

4.11. CÁLCULO DO IC E IM - O IC foi calculado a partir da medida do valor do peso fresco. Assim:

$$IC = \frac{\text{Peso fresco total do tratamento}}{\text{número de frascos}}$$

O IM foi calculado tendo por base o valor atribuído a cada frasco na triagem feita na 5a. semana de incubação dos explantes. Assim:

$$IM = \frac{\text{Valor total do tratamento}}{\text{número de frascos}}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COMPORTAMENTO DOS AMINOÁCIDOS EM GRUPOS - Este ensaio envolveu 13 aminoácidos em grupos, adicionados ao meio básico (vide 4.5.). Neste 1º ensaio o início da dediferenciação dos explantes foi mais ou menos homogêneos nos diversos tratamentos, retardado um pouco (2 dias) no tratamento com o meio B que contém os aminoácidos ácidos glutâmico, glicina e histidina.

Em todos os tratamentos houve a formação de calos observando-se morfogênese em certa porcentagem dos mesmos.

Quanto ao aspecto das raízes observou-se que em todos os

tratamentos as raízes aéreas eram menos vigorosas e em maior número do que as geotrópicas. Em ambos os tipos de raízes o desenvolvimento de pelos absorventes foi frequente. No tratamento que reúne os aminoácidos arginina, ácido aspártico e cisteína (meio A), em todos os frascos ocorreu morfogênese de raízes. Nos demais tratamentos pouco mais de 50% dos frascos apresentaram raízes. O meio A apresentou também fenotipos verdes e claros em todos os frascos. Nos demais tratamentos apenas alguns frascos apresentaram fenotipos.

Os resultados do crescimento e morfogênese estão indicados nas Tabelas 5 e 6 e na Figura 1.

Analisando estes resultados pode-se observar que determinados grupos de aminoácidos mostram índices de crescimento e morfogênese muito baixos. É o caso específico do meio B que contém os aminoácidos, ácido glutâmico, glicina e histidina; o seu IC = 0,2193 (Tabela 5) e IM = 1,0028 (Tabela 6). Este resultado implicaria na afirmação de que os aminoácidos do meio B reprimiram o crescimento e morfogêneses, isto é, teriam uma ação inibitória em culturas de tecido de feijão. A inibição e crescimento em culturas de tecido de mamíferos por determinados aminoácidos é mencionada por EAGLE (1959). Dados semelhantes foram relatados por BEHREND e MATELES (1975) onde ácido glutâmico inibiu crescimento em cultura de tecido de fumo e glicina agiu como inibidor em cultura de fumo e soja. O mesmo fenômeno é constatado por BAYLEY *et alii* (1972) em cultura de tecido de soja e por NITSCH e NITSCH (1957) na indução de brotos de *Plumago*.

Tabela 5 - Índice de crescimento do ensaio com os aminoácidos em grupos (Ensaio 4.4.).

Tratamento	I.C.*	$\pm S^{**}$	n***
A	0.8278	0.1994	28
B	0.2193	0.0876	26
C	0.6064	0.9460	28
D	0.5405	0.1386	27
F	0.8795	0.1695	28
E	0.8325	0.1322	24
G	0.5671	0.1130	22

*Índice de crescimento

**Desvio padrão

***Número de frascos

Tabela 6 - Índice de morfogênese do ensaio com os aminoácidos em grupos (Ensaio 4.4.).

Tratamento	I.M.*	$\pm S^{**}$	n***
A	2.0893	0.1694	28
B	1.0028	1.2784	26
C	1.5337	0.6975	28
D	1.7338	0.5991	27
F	1.4409	0.6650	28
E	1.8328	0.4692	24
G	1.4972	0.6790	22

*Índice de morfogênese

**Desvio padrão

***Número de frascos

Figura 1 - Índice de crescimento e morfogênese com os aminoácidos em grupos (Ensaio 4.5.)

- A - Arg 60 mg/l; Asp 50 mg/l; Cys 10 mg/l.
- B - Glu 65/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
- C - Ile 30 mg/l; Met 20 mg/l; Phe 10 mg/l.
- D - Pro 40 mg/l; Thr 30 mg/l; Tyr 5 mg/l; Ser 50 mg/l.
- F - Todos os aminoácidos de A, B, C e D.
- E - Caseína hidrolizada 2.000 mg/l.
- G - Meio básico.

HEIMER e FILNER (1970-1971) mostraram que determinados aminoácidos inibem não somente crescimento, mas também a absorção de nitrato e a atividade da nitrato redutase. Eles concluem que aminoácidos isolados inibem especificamente a assimilação do nitrato e como resultado o crescimento é inibido.

BEHREND e MATELES (1975) sugerem que a inibição de crescimento em culturas de tecido causado por aminoácidos se deva à inibição da assimilação do amônio intracelular para a formação de aminoácidos em células que crescem em meio contendo nitrato.

A ausência de crescimento na presença de aminoácidos pode ser devido à incapacidade desses componentes em substituir o amônio ou inibir reações metabólicas (GAMBORG, 1970).

Dependendo do aminoácido estimulação ou inibição de crescimento pode ocorrer. Em calos de *Pinus*, glicina é inibidora para crescimento enquanto que asparagina e ácido aspártico são estimulantes (BROWN e LAWRENCE, 1968, ct. por SHARP e CROCOMO, 1975).

No presente trabalho resultado semelhante foi obtido. Enquanto o meio B, conforme descrito, causou repressão no crescimento, o meio A com os aminoácidos arginina, ácido aspártico e cisteína propiciaram resultados muito bons tanto no crescimento como na morfogênese. Este grupo de aminoácidos teve um IC = 0,8278 (Tabela 5) e IM = 2,0893 (Tabela 6), resultados esses semelhantes aos obtidos pelo padrão contendo caseína hidrolizada (meio E) e ao tratamento com os 13 aminoácidos juntos (meio F) com respeito à morfogênese.

De acordo com SHARP e CROCOMO (1975), nitrogênio reduzido na forma de composto orgânico é comumente estimulante de crescimento e morfogênese quando adicionado como mistura de diferentes aminoácidos.

Grupos de aminoácidos podem substituir proteína hidrolizada (GAMBORG *et alii*, 1968). No grupo que apresentou melhores resultados o autor cita arginina e ácido aspártico.

Morfogênese em cultura de calos é influenciada pela composição do meio (KONAR *et alii*, 1972), assim níveis elevados de nitrogênio reduzido na forma de amônio favorecem o desenvolvimento de morfogênese.

Uma mistura de aminoácidos adicionada ao meio favoreceu o desenvolvimento de embriões em cenoura (REINERT *et alii*, 1967). Resultados semelhantes foram obtidos por HALPERIN e WETHRELL (1965). Exames microscópicos de calos de cenoura crescidos em nitrato mostram somente células isoladas com virtual ausência de estruturas multicelulares. Exames de calos crescidos em meio com nitrogênio reduzido na forma de amônio revelam numerosos filamentos multicelulares que seriam reconhecidos como pró-embriões.

Arginina é citada por HARVEY e GRASHAM (1969) como agente estimulador de crescimento em coníferas.

GAMBORG (1970) mostrou que cultura de tecido de soja crescendo em meio definido necessita de nitrogênio reduzido além de nitrato. O crescimento cessava quando o nitrato era utilizado sem uma parte de nitrogênio reduzido.

EAGLE (1959) demonstrou que uma adição de arginina e cisteína entre outros aminoácidos é absolutamente indispensável para o crescimento de linhagens de células de mamíferos.

No presente trabalho o tratamento estatístico dado a este ensaio demonstrou que o grupo da arginina (meio A) tem um comportamento melhor que o da caseína hidrolizada (meio E). É de se notar que o grupo do ácido glutâmico (meio B) que causou uma forte inibição no crescimento e morfogênese, estatisticamente colocou-se em último lugar na ordem decrescente de morfogênese e crescimento comparado aos demais meios estudados.

Disto conclui-se que arginina, ácido aspártico e cisteína estariam influenciando favoravelmente o crescimento e a morfogênese enquanto que ácido glutâmico, glicina e histidina determinariam inibição de calos e morfogênese de raízes em explantes de feijoeiro.

5.2. ALTERAÇÕES NOS MEIOS A E F - As alterações no meio A tiveram a finalidade de fornecer dados mais detalhados a respeito do comportamento deste grupo de aminoácidos no tratamento anterior. No meio F, para verificar os resultados das interações de arginina, ácido aspártico e cisteína no conjunto dos 13 aminoácidos (vide 4.6.).

Crescimento de calos e morfogênese de raiz foram observados em todos os tratamentos.

Na morfogênese (Tabela 8) não foram encontradas diferen-

Tabela 7 - Índice de crescimento do ensaio com os aminoácidos arginina, ácido aspártico e cisteína (Ensaio 4.5.).

Tratamentos	I.C.*	± s**	n***
A	0.9178	0.2137	21
A ₁	0.8388	0.1774	20
A ₂	0.8473	0.1128	19
A ₃	0.7287	0.1575	21
A ₄	0.9633	0.2012	25
A ₅	0.8467	0.1910	22
A ₆	0.7539	0.1142	22
F	1.0598	0.1595	22
F ₁	0.7720	0.1228	18
F ₂	1.3035	0.3108	18
F ₃	1.1202	0.2123	16
F ₄	0.5630	0.1830	17
F ₅	0.6536	0.1466	18
F ₆	1.0433	0.1946	20
F ₇	0.2910	0.0980	14
G	0.6010	0.1036	19
E	0.9395	0.2202	17

*Índice de crescimento

**Desvio padrão

***Número de frascos

Tabela 8 - Índice de morfogênese do ensaio com os aminoácidos arginina, ácido aspártico e cisteína (Ensaio 4.5.).

Tratamentos	I.M.*	$\pm s^{**}$	n***
A	1.1375	0.6653	23
A ₁	0.8478	0.3895	22
A ₂	1.1997	0.6730	19
A ₃	1.3171	0.6733	21
A ₄	1.2833	0.7081	27
A ₅	0.9530	0.5481	23
A ₆	0.9676	0.5208	23
F	0.9913	0.5678	24
F ₁	0.7359	0.1220	18
F ₂	0.8357	0.4161	22
F ₃	0.9192	0.5181	20
F ₄	1.0501	0.6015	18
F ₅	1.2728	0.7108	20
F ₆	1.1112	0.6546	21
F ₇	0.9020	0.4739	19
E	1.2774	0.6794	21
G	1.1355	0.6160	20

*Índice de morfogênese

**Desvio padrão

***Número de frascos

Figura 2 - Índice de crescimento e morfogênese do ensaio com aminoácidos: arginina, ácido aspártico e cisteína (Ensaio 4.6.).

A - Arg 60 mg/l; Asp 50 mg/l; Cys 10 mg/l.

A1- Arg 60 mg/l.

A2- Asp 50 mg/l.

A3- Cys 10 mg/l.

A4- Arg 60 mg/l; Asp 50 mg/l.

A5- Arg 60 mg/l; Cys 10 mg/l.

A6- Asp 50 mg/l; Cys 10 mg/l.

F - Todos os 13 aminoácidos.

F1- Todos os 13 aminoácidos - Arg.

F2- Todos os 13 aminoácidos - Asp.

F3- Todos os 13 aminoácidos - Cys.

F4- Todos os 13 aminoácidos - Arg e Asp.

F5- Todos os 13 aminoácidos - Arg e Cys.

F6- Todos os 13 aminoácidos - Aspe Cys.

F7- Todos os 13 aminoácidos - Arg, Aspe Cys.

G - Meio básico.

E - Caseína hidrolizada - 2000 mg/l.

ças marcantes nos resultados. Os três aminoácidos: arginina, ácido aspártico e cisteína aplicados em grupo de dois ou isoladamente, agem e interagem de modo semelhante em explantes de feijão. Aproximadamente 50% dos frascos de cada tratamento desenvolveram raízes.

O número de raízes por frasco foi elevado; salvo algumas exceções, todos os frascos apresentaram mais de doze raízes.

Todos os frascos propiciaram o desenvolvimento de raízes aéreas em todas as direções e mais de 80% dos frascos apresentaram raízes geotrópicas. O aspecto das raízes geotrópicas foi de raízes bastante vigorosas com o desenvolvimento de bifurcações e pelos absorventes frequentes. Estas raízes, porém, eram menos longas e o número de pelos absorventes era menor que as aéreas. As raízes aéreas apresentavam-se como raízes longas e afiladas com muitas bifurcações e um grande número de pelos absorventes.

Consultando a literatura verificamos que a morfogênese em cultura de *A. belladonna* (THOMAS e STREET, 1972) é influenciada não só pelo tempo em que as culturas são mantidas, mas principalmente pela composição do meio. A presença nesses meios de níveis elevados de nitrogênio sob a forma de amônio, favorece o desenvolvimento de morfogênese. Também estudos de HALPERIN e METHERELL (1965) mostraram que sais de amônio no meio tem influência na indução de embriogênese em cultura de tecido de cenoura. O teor de nitrogênio orgânico reduzido em culturas pode ser responsável pela indução de estrutura tipo embrião (TAZAWA e REINERT, 1969). Conclusão semelhante foi fornecida por REINERT *et alii* (1967) em estudos realizados em cenoura em que o aumento de nitrogênio reduzido no meio é

importante na indução de embriogênese.

Outras indicações mostram que calos crescidos na ausência de amônio não formam embriões quando transferidos para um meio que normalmente proporcionaria o desenvolvimento dos mesmos (HALPERIN e WETHERELL, 1965). Uma mistura de aminoácidos adicionado ao meio promoveu desenvolvimento de embriões em duas variedades de cenoura (REINERT *et alii*, 1967).

No presente estudo verificou-se que arginina, ácido aspártico e histidina proporcionaram ótimo crescimento de calos (Tabela 7). O tratamento estatístico dado aos resultados demonstrou que os aminoácidos deste meio comportam-se de modo semelhante no crescimento da cultura. Isto significa que não há diferenças discrepantes nos resultados quando os três aminoácidos são considerados isoladamente ou em grupos de dois (meio A₁ ou meio A₅). Assim, a arginina tem o mesmo efeito que a média de ácido aspártico e cisteína isolados. O ácido aspártico é superior à cisteína. A arginina + ácido aspártico, e arginina + cisteína são superiores em média ao ácido aspártico + cisteína. A arginina + ácido aspártico é superior à arginina + cisteína. Estes resultados evidenciam uma melhor atuação de arginina dentre os três aminoácidos em explantes de feijão.

Referências na literatura mostram que arginina e cisteína (EAGLE, 1959) são absolutamente indispensáveis para o crescimento de linhagens de células. Segundo BEHREND e MATELES (1975) arginina é aminoácido promotor de crescimento em cultura de tecido abolindo a inibição causada por outros aminoácidos adicionados ao meio.

Outras indicações nos dizem que cinetina não promove cres-

cimento ou embriogênese em cultura de tecido de cenoura (WHETERELL e DOUGALL, 1976) quando KNO_3 é a única fonte de nitrogênio; é necessário adicionar ao meio uma combinação de aminoácidos ou caseína hidrolizada. Em cultura de tecido de rosas (AMORIM *et alii*, 1977) é necessário a adição de glutamina para manter bom crescimento. HARVEY e GRASHAM (1969) demonstraram que arginina e tirosina estimulam o crescimento de calos em coníferas. Em culturas de cenoura, tomate e fumo, arginina ácido aspártico e cisteína adicionados ao meio isoladamente, proporcionaram crescimento muito bom entre 18 aminoácidos testados, (BEHEREN e MATELES, 1975) em meio contendo nitrato.

Outras referências mostram que o aminoácido arginina provou ser uma boa fonte de nitrogênio para estudos em cultura de tecido (NITSCH e NITSCH, 1957; STEINHART *et alii*, 1961; FURUHASHI e YATAZAWA, 1978) e demonstrou ter efeito favorável no crescimento de muitas espécies (SPOERL, 1948; NAKASHIMA, 1964; JOY, 1969 e SIMOLA, 1975).

O modo como estes aminoácidos são absorvidos e utilizados durante o crescimento não está ainda muito bem esclarecido. DOUGALL e FULTON (1967) realizando estudos de competição isotópica com misturas de aminoácidos em meio de rosas observaram que a arginina e ácido aspártico exógenos entre outros aminoácidos, são incorporados em proteína. Sua intensidade de incorporação depende ao mesmo tempo de sua contribuição na formação do nitrogênio alfa-amino total e sua concentração individual no meio. O ácido glutâmico não é incorporado diretamente em proteína, mas influencia a incorporação de outros aminoácidos. Talvez aqui resida uma possível explicação do retardamento de dois dias na iniciação de cresci-

mento do meio B do experimento 4.5. que contém ácido glutâmico, em comparação com o meio A do mesmo experimento que contém arginina e ácido aspártico. Aminoácidos dicarboxílicos diamínicos são transportados mais lentamente que os aminoácidos neutros (MEISTER, 1965).

ADAMSON *et alii*, (1972) sugerem que em cartilagem de embrião de galinha aminoácidos extracelulares podem ser incorporados diretamente em proteínas sem entrarem no "pool" intracelular do processo peculiarmente associado ao sistema de transporte de membrana. A absorção de aminoácidos com células de soja em estágio inicial de crescimento foi explicado por mecanismo semelhante por KING e OLENIUK (1973). Arginina é componente básico de proteínas e polipetídeos e dificilmente encontrado livre em células.

GITS e GRENSON (1967) trabalhando com levedura e BENKO *et alii* (1969) trabalhando com fungos notaram que substratos intracelulares de amônio e aminoácidos tem efeito regulatório não só sob o transporte geral de aminoácidos como também em sistemas específicos particulares de aminoácidos. Em experimentos conduzidos por BAYLEY *et alii* (1972) células de soja em cultura de tecido tiveram rápido crescimento na presença de nitrogênio reduzido na forma de amônio.

KING e OLENIUK (1973) e SARGENT e KING (1974) chamam a atenção para um eficiente e ativo sistema de absorção de aminoácidos do meio, em culturas de tecido de soja. Estas observações foram relatadas também por BAYLEY *et alii* (1972) e GAMBORG *et alii* (1972). Esta absorção rápida foi associada pelos autores citados com a fase de alta atividade metabólica que corresponde à fase de síntese de proteínas pelas células.

las.

Concentrações intracelulares de amônio em células de soja não são conhecidas, mas análises de aminoácidos mostram que compostos aminados, especialmente glutamina aumentam rapidamente na presença de amônio. É possível que um ou mais destes compostos estejam inibindo um sistema geral de transporte de aminoácidos em cultura de soja(KING e OLENIUK, 1973). Segundo os mesmos autores este sistema é rápido e eficazmente afetado por inibidores da respiração.

O transporte de arginina extracelular, em células de cana-de-açúcar foi abordado por MARETZKI e THOM (1970), onde foi evidenciada a existência de dois sítios de transporte de arginina e lisina em culturas de células de parênquima de cana-de-açúcar. Um dos sistemas de transporte atuaria, com grande afinidade para arginina, mesmo em concentrações baixas do aminoácido extracelular. O outro sistema entraria em ação quando a concentração de arginina extracelular é elevada. Conclusão semelhante foi sugerida por BENKO *et alii* (1969) para o transporte de metionina em *Penicillium chrysogenum*.

O sistema de transporte de arginina responde prontamente a inibidores metabólicos, isto evidencia que para a sua atuação necessita de energia.

Um outro aspecto do presente trabalho diz respeito ao comportamento dos aminoácidos arginina, ácido aspártico e cisteína no conjunto dos treze aminoácidos propostos na Tabela 2 (meio F). Os resultados de crescimento e morfogênese das interações destes aminoácidos podem ser

observados na Figura 2.

Analisando o comportamento do conjunto dos aminoácidos (meio F) com IC = 1.0598 (Tabela 7), observa-se que quando retirou-se um aminoácido (meio F₁) o IC = 0.7720 e quando dois aminoácidos foram retirados (meio F₄) o IC = 0.5630. Portanto faltando ao conjunto um aminoácido o índice de crescimento é maior do que na ausência de dois.

A análise estatística confirma os resultados visuais (Figura 2): a ausência de arginina dentro do grupo dos 13 aminoácidos proporciona menor crescimento que, em média, a falta do ácido aspártico ou a falta da cisteína. No conjunto o ácido aspártico é mais eficiente que a cisteína.

O meio F₆ é superior à média de F₄ e F₅ o que seria justificado pela ausência de arginina em F₄ e F₅. Assim, ordenando em termos decrescentes o envolvimento positivo dos três aminoácidos agindo isoladamente, dois a dois ou em interações com os 13 aminoácidos teríamos: arginina > ácido aspártico > cisteína.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem estudos futuros que possam esclarecer a verdadeira função que cada um dos aminoácidos desempenha no metabolismo celular de culturas de tecido de feijão.

5.3. ALTERAÇÕES NOS MEIOS B E F - Houve a necessidade de averiguar qual dos aminoácidos isolados ou sua interação com outros aminoácidos foi causa de inibição observada tanto no crescimento como na morfogênese do

meio B (4.7.). Assim, ácido glutâmico, glicina e histidina foram adicionados ao meio isolados, dois a dois ou em interações no grupo dos 13 aminoácidos (Tabela 3).

Os resultados de morfogênese podem ser analisados consultando-se a Tabela 10 e Figura 3. Ocorreu o desenvolvimento de grande quantidade de raízes em quase todos os frascos; embora numerosas sua constituição é muito débil. São raízes curtas e raramente apresentam bifurcações e pelos absorventes. As raízes geotrópicas, quando aparecem, são mais vigorosas que as aéreas.

Pelo tratamento estatístico a que foram submetidos os dados deste ensaio conclui-se que não houve praticamente diferença entre os tratamentos. Isto porque o critério de notas por faixa de desenvolvimento faz com que haja uma perda de sensibilidade nas observações, por representar por um mesmo valor um intervalo de número de raízes.

As análises dos valores do IC do meio B (Tabela 9, Figura 3), observa-se que ácido glutâmico, glicina e histidina apresentam diferentes comportamentos quando isolados ou em grupo. Assim, o tratamento com os três aminoácidos interagindo (meio B) apresentou menor crescimento que a média dos demais tratamentos (meio B₁ a B₆) que envolvem os aminoácidos isolados ou em grupos de dois.

O tratamento que contém ácido glutâmico isolado (meio B₁) proporcionou menor crescimento que os tratamentos que contém glicina (meio B₂) ou histidina (meio B₃).

Ainda o crescimento para o tratamento com glicina e his-

Tabela 9 - Índice de crescimento do ensaio com os aminoácidos ácido glutâmico, glicina e histidina (Ensaio 4.6.).

Tratamento	I.C.*	$\pm s^{**}$	n***
B	0.1638	0.0817	15
B ₁	0.1337	0.1121	15
B ₂	0.3743	0.1404	23
B ₃	0.3534	0.1188	18
B ₄	0.2703	0.2669	14
B ₅	0.1120	0.0359	17
B ₆	0.3688	0.1076	21
F	0.4739	0.1288	16
F ₁	0.6097	0.1709	20
F ₂	0.5189	0.1073	19
F ₃	0.4567	0.1175	11
F ₄	0.6078	0.1154	12
F ₅	0.5444	0.1231	12
F ₆	0.4505	0.1065	13
G	0.3841	0.0843	18

*Índice de crescimento

**Desvio padrão

***Número de frascos

Tabela 10 - Índice de morfogênese do ensaio contendo os aminoácidos ácido glutâmico, glicina e histidina (Ensaio 4.6.).

Tratamentos	I.M.*	$\pm s^{**}$	n***
B	1.2429	0.6726	17
B ₁	1.5331	0.6599	19
B ₂	1.5536	0.6937	24
B ₃	1.3120	0.6717	20
B ₄	1.3792	0.6755	18
B ₅	1.6626	0.6499	21
B ₆	1.6185	0.6825	23
F	1.6787	0.6542	18
F ₁	1.6070	0.6963	22
F ₂	1.4785	0.7207	22
F ₃	1.2698	0.6929	16
F ₄	1.8561	0.5701	16
F ₅	1.7019	0.6439	19
F ₆	1.5910	0.7071	16
G	1.4906	0.6940	22

*Índice de morfogênese

**Desvio padrão

***Número de frascos

Figura 3 - Índice de crescimento e morfogênese com os aminoácidos: ácido glutâmico, glicina e histidina (Ensaio 4.7.).

- B - Glu 65 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l. F₁- Todos os 13 aminoácidos - Glu.
- B₁- Glu 65 mg/l. F₂- Todos os 13 aminoácidos - Gly.
- B₂- Gly 25 mg/l. F₃- Todos os 13 aminoácidos - His.
- B₃- His 10 mg/l. F₄- Todos os 13 aminoácidos - Glu e Gly.
- B₄- Glu 65 mg/l; Gly 25 mg/l. F₅- Todos os 13 aminoácidos - Glu e His.
- B₅- Glu 65 mg/l; His 10 mg/l. F₆- Todos os 13 aminoácidos - Gly e His.
- B₆- Gly 25 mg/l; His 10 mg/l. G - Meio básico.
- F - Todos os 13 aminoácidos.

tidina (meio B₆) foi maior que a média de crescimento observado para os tratamentos que envolvem ácido glutâmico e glicina (meio B₄) e ácido glutâmico e histidina (meio B₅).

Pelo IC pode-se observar que a associação dos aminoácidos ácido glutâmico e histidina (meio B₅) exercem um maior efeito de inibição sobre o crescimento que a associação de ácido glutâmico e glicina (meio B₄).

Os resultados apresentados são semelhantes aos descritos por HEIMER e FILNER (1970 e 1971) em que os aminoácidos isolados inibem o crescimento de fumo em cultura de tecido. GAMBORG (1970) observa que ácido glutâmico proporciona crescimento muito inferior em cultura de tecido de soja que outros aminoácidos por ele testados. BAYLEY *et alii* (1972) afirmam que ácido glutâmico não proporciona crescimento em cultura de tecido de soja. Em 1975, BEHREND e MATELES confirmaram que ácido glutâmico inibe fortemente culturas de fumo enquanto que glicina inibe fumo e soja.

No presente trabalho obtivemos também os resultados do IC no grupo dos 13 aminoácidos. Torna-se claro (Figura 3) que um crescimento maior ocorre quando do grupo é retirado o ácido glutâmico (meio F₁) do que quando se retira glicina (meio F₂) ou histidina (meio F₃).

Observando-se o IC do tratamento em que dos 13 aminoácidos se retira glicina e histidina (meio F₆) visualiza-se que este é menor do que aqueles tratamentos de onde se retiram ácido glutâmico e glicina (meio F₄) ou ácido glutâmico e histidina (meio F₅).

Pelas observações visuais deste ensaio e pelo tratamento estatístico dado aos resultados propostos pode-se afirmar que o ácido glutâmico na concentração empregada comporta-se como agente inibidor de crescimento e morfogênese em explantes de feijão.

O fenômeno de inibição de crescimento por aminoácidos em culturas de tecido tem sido observado por vários autores como FILNER (1966), GAMBORG *et alii* (1958), GAMBORG (1970), HEIMER e FILNER (1970/71), BAYLEY *et alii* (1972) e BEHREND e MATELES (1975). Deve-se ressaltar que todas as culturas testadas cresciam em nitrato como fonte de nitrogênio oxidado. Todos os autores citados são unânimes em afirmar que quando ocorre inibição de crescimento por um determinado aminoácido (ou grupo de aminoácidos), a absorção do nitrato e a atividade da redutase de nitrato são afetadas. A conclusão geral proposta é de que determinados aminoácidos em determinadas culturas, inibem a assimilação do nitrato e como resultado inibem o crescimento da cultura.

Se compararmos, no presente trabalho, os resultados observados no crescimento de calos dos meios A e B podemos fazer algumas observações.

Na Tabela 9 temos IC do meio B (ácido glutâmico, glicina e histidina), notando-se que o maior IC foi 0,6097. Na Tabela 7 temos os resultados em IC do meio A (arginina, ácido aspártico e glicina) onde o maior IC = 1.3035 e que apenas três tratamentos deste meio têm IC igual ou inferior ao maior IC do meio B.

Estes dados deixam claro uma maior atuação positiva dos

aminoácidos do meio A em explantes de feijão.

Há evidências na literatura de uma utilização seletiva de aminoácidos para o estabelecimento de culturas de células. Diferenças na absorção de aminoácidos por diferentes culturas de tecidos tem sido observadas, isto entretanto parece ser um reflexo do tipo de célula cultivada, o fenômeno porém ainda não é conhecido nos seus detalhes.

5.4. ADIÇÃO DE ÁCIDO GLUTÂMICO AO MEIO DE CULTURA, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES -

Visando esclarecer a atuação do ácido glutâmico em explantes de feijão foi realizado este ensaio como consta na Tabela 4. Em ensaio anterior (4.7.), o ácido glutâmico, na concentração de 65 mg/l, comportou-se como inibidor do crescimento e morfogênese.

No presente ensaio observou-se que houve um ótimo crescimento de calos nas concentrações mais baixa de ácido glutâmico como se pode ver na Figura 4 e na Tabela 11. Em concentração de 0,1 mg/l obteve-se $IC = 0,9040$; em 0,3 mg/l, $IC = 0,7848$ e em 0,5 mg/l, $IC = 1,0577$.

A partir de 1 mg/l já se pode notar certa inibição que se acentuou drasticamente em concentrações superiores a 5 mg/l. Em concentrações mais elevadas, acima de 50 mg/l, o crescimento foi praticamente nulo chegando a zero nos três últimos tratamentos (B_{14} , B_{15} , B_{16}).

Os dados acima nos sugerem que ácido glutâmico é inibidor de crescimento apenas em determinadas concentrações. Um teor baixo de ácido glutâmico pelo contrário, estimula crescimento em explantes de feijão.

Tabela 11 - Índice de crescimento do ensaio com ácido glutâmico em diferentes concentrações (Ensaio 4.8.).

Tratamentos	I.C.*	$\pm s^{**}$	n***
B ₁	0.9006	0.1941	17
B ₂	0.9040	0.2124	13
B ₃	0.7848	0.1835	13
B ₄	1.0577	0.1439	10
B ₅	0.8299	0.1721	18
B ₆	0.6120	0.1834	11
B ₇	0.5940	0.2991	10
B ₈	0.3567	0.0908	10
B ₉	0.1913	0.1381	18
B ₁₀	0.1479	0.0952	18
B ₁₁	0.0676	-	13
B ₁₂	0.0214	-	18
B ₁₃	0.0077	-	16
B ₁₄	0.0128	-	17
B ₁₅	0.0037	-	16
B ₁₆	0.0059	-	16
G	0.7392	0.1907	16
E	0.7725	0.2148	21

*Índice de crescimento

**Desvio padrão

***Número de frascos

Tabela 12 - Índice de morfogênese do ensaio com ácido glutâmico em diferentes concentrações (Ensaio 4.8.).

Tratamentos	I.M.*	$\pm s^{**}$	n***
B ₁	0.9899	0.5803	20
B ₂	0.8839	0.4830	16
B ₃	0.8081	0.3780	14
B ₄	0.9716	0.5428	18
B ₅	0.7803	0.2273	19
B ₆	0.7071	0.0000	13
B ₇	1.1187	0.6395	15
B ₈	1.7827	0.5952	11
B ₉	1.4786	0.7054	19
B ₁₀	1.5127	0.7081	19
B ₁₁	1.1334	0.6556	16
B ₁₂	0.8560	0.4459	19
B ₁₃	0.7071	0.0000	17
B ₁₄	0.8543	0.2716	20
B ₁₅	0.7071	0.0000	16
B ₁₆	0.7071	0.0000	15
G	0.7646	0.1674	18
E	0.9774	0.5569	20

*Índice de morfogênese

**Desvio padrão

***Número de frascos

Figura 4 - Índice de crescimento e morfogenese do ensaio com ácido glutâmico em diferentes concentrações (Ensaio 4.8).

B ₁ - Glu 0,0 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₀ - Glu 40 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₂ - Glu 0,1 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₁ - Glu 50 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₃ - Glu 0,3 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₂ - Glu 60 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₄ - Glu 0,5 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₃ - Glu 65 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₅ - Glu 1,0 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₄ - Glu 500 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₆ - Glu 5,0 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₅ - Glu 1.000 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₇ - Glu 10 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₆ - Glu 2.000 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₈ - Glu 20 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	G - Meio básico.
B ₉ - Glu 30 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	E - Caseína hidrolizada 2.000 mg/l.

EAGLE (1959) observou que concentrações muito altas dos mesmos aminoácidos que promoviam ótimos crescimento em células podiam retardar o crescimento ou mesmo inibi-lo totalmente.

Observações de BIDWELL (1974) são de que determinados aminoácidos quando aplicados em altas concentrações podem intoxicar as plantas. Complementa ainda o autor que, muitas vezes, culturas de tecido de plantas exigem fontes específicas de nitrogênio orgânico, tais como asparagina, glutamina, glicina ou outros aminoácidos.

O estímulo do crescimento *in vitro* pode ser favorecido se baixas concentrações de aminoácidos forem acrescidas ao meio (MEISTER, 1965), e se os aminoácidos são usados em combinações a possibilidade de estímulo é maior (GAUTHERET, 1959).

A repressão do crescimento em culturas utilizando aminoácidos pode ser exercida por uma concentração muito alta dos aminoácidos presentes (FILNER, 1966) como é o caso da metionina e triptofano.

No presente trabalho houve desenvolvimento de morfogênese. O IM é mostrado na Tabela 12. É interessante notar que concentrações baixas de ácido glutâmico estimulam pouco a morfogênese de raízes. A medida que concentrações maiores são utilizadas, há maior estímulo para a morfogênese.

Observando-se a Figura 4, percebe-se que há um estímulo crescente chegando a um pico máximo nas concentrações de 20 mg/l, 30 mg/l e 40 mg/l, concentrações essas bastante repressivas para o desenvolvimento de calos. A partir destas concentrações a inibição torna-se presen

te também para a morfogênese. É de se notar que nas concentrações de 500 mg/l o explante tornou-se escuro, como nas demais concentrações altas e não desenvolveu calos. Este tratamento, no entanto, apresentou pequenas raízes diretamente sobre o explante.

Notamos assim que nos meios em que as concentrações de ácido glutâmico foram inibitórias para o crescimento de calos, houve estímulo para o desenvolvimento de raízes, mostrando então diferentes implicações desta substância no controle da morfogênese.

Observações visuais mostram que ácido glutâmico induz ou aumenta a formação de raízes secundárias (FRENCH e GIBSON, 1957).

A concentração de 20 ppm de ácido glutâmico proporcionou um aumento muito maior no crescimento de *Datura tatula* em cultura de raízes (FRENCH e GIBSON, 1957) do que a concentração de 60 ppm.

Isto demonstra, como no presente trabalho, que o estímulo de crescimento por este aminoácido possui um ótimo de concentração.

Ácido glutâmico é precursor de alcalóides em *Datura tatula* (FRENCH e GIBSON, 1957), na concentração de 60 ppm. Com um excesso do aminoácido na cultura era de se esperar um aumento na intensidade de síntese de alcalóides. No entanto, o autor observou que o teor de alcalóides nestas culturas, é menor do que aquelas supridas com 20 ppm da substância. O autor conclui que ácido glutâmico foi utilizado por outras vias não relacionadas com a síntese de alcalóide.

Quando glutamato-1-¹⁴C foi fornecido a células de rosa, de

4 dias de idade 87,6% do ^{14}C no glutamato recuperado de proteína está no C_1 de glutamato (FLETCHER, 1974). O autor concluiu que glutamato recentemente absorvido é diretamente incorporado à proteína sem metabolismo prévio.

STEWART *et alii* (1958) mostraram que somente uma pequena parte dos aminoácidos solúveis, em culturas de células de cenoura estão disponíveis para a síntese de proteína. Trabalhando com ácido glutâmico- ^{14}C (STEWART e BIDWELL, 1966), concluíram que uma pequena parte do ácido glutâmico era incorporada diretamente em proteína e a outra parte entra em outras vias metabólicas antes de ser incorporada, como propuseram BIDWELL *et alii* (1964).

FLETCHER e BEEVERS (1970) adicionaram acetato- ^{14}C em experimento de pulso, em células de rosa. Demonstraram que uma grande quantidade do ^{14}C era encontrada em glutamato solúvel imediatamente após o pulso. No entanto, 8 horas após, 97,5% do glutamato- ^{14}C solúvel havia sido metabolizado e deste somente 13% incorporou-se em proteína. A outra porção teria servido como substrato respiratório.

Quanto glutamato-U- ^{14}C (FLETCHER, 1974) foi incubado durante 90 minutos 20,8% do ^{14}C recuperado estava em proteína. Esta contribuição substancial do glutamato exógeno em proteína recentemente sintetizada sugere que o glutamato absorvido é incorporado diretamente sem metabolismo prévio.

Dos resultados do experimento de pulso com acetato- ^{14}C e quando foi usado glutamato- ^{14}C deram a FLETCHER (1974) a certeza de que fontes exógenas e endógenas contribuem para o glutamato proteico, como

tinha sido anteriormente sugerido por BIDWELL *et alii* (1964) para células de cenoura.

A importância da fração do ácido glutâmico que não é incorporado diretamente em proteína (FRENCH e GIBSON, 1957; STEWARD, 1958 e 1966; BIDWELL, 1954; FLETCHER e BEEVERS, 1970) é melhor avaliada se lembrarmos que este aminoácido é um dos raros especificamente permeáveis à membrana mitocondrial interna (CONN e STUMPF, 1975). Na matriz mitocondrial o ácido glutâmico pode sofrer a ação de aspartato-transaminase ou alternativamente ser desaminado oxidativamente pela desidrogenase glutâmica.

O ácido glutâmico exerce um papel chave no metabolismo dos aminoácidos devido à ampla distribuição da enzima desidrogenase glutâmica. Essa enzima cataliza a desaminação oxidativa reversível do L-glutamato pelo NAD para formar o ácido α -cetoglutarico, NH_3 e NADH (LEHNINGER, 1975).

O significado da desidrogenase glutâmica é facilmente visualizado quando está acoplado com transaminase.

As duas enzimas, agindo em sequência, realizaram a liberação, sob a forma de NH_3 , do átomo de nitrogênio do grupo amino de qual-

quer aminoácido que possa sofrer à ação da transaminase. Desde que tanto a transaminação como a desaminação são facilmente reversíveis, as duas enzimas podem realizar a síntese daqueles aminoácidos cujo α -ceto-ácido análogo possa ser sintetizado pelo organismo em consideração. No caso das plantas superiores e de muitos microrganismos, são os α -ceto-ácidos de todos os aminoácidos proteicos.

Outro processo a ser considerado no metabolismo do ácido glutâmico é a formação do ácido aminobutírico formado pela descarboxilação enzimática a partir do grupo α -COOH do ácido glutâmico.

O ácido aminobutírico é abundante nos tubérculos de batatas e também é encontrado em outras plantas (CONN e STUMPF, 1975).

Em 1974, FLETCHER realizou um trabalho com cultura de ca-
los de rosa usando glutamato-1- ^{14}C com a finalidade de visualizar as possíveis implicações metabólicas do glutamato suprido exogenamente. Após 6 horas de incubação o autor encontrou que 85,9% do ^{14}C era devolvido como CO_2 , o que era de se esperar devido à ação da descarboxilase. Outros compostos marcados eram aminoácidos solúveis (6,0%) e aminoácidos proteicos (5,0%). A menor fração de ^{14}C estava presente em ácidos orgânicos e lípídeos. Fracionamento posterior dos aminoácidos mostrou que glutamato era o mais encontrado entre os aminoácidos marcados tanto na fração solúvel como na fração proteica. A maior concentração de ^{14}C na molécula de ácido glutâmico estava no C_1 . O autor concluiu então que a fração que foi incorporada em proteína não sofreu nenhum metabolismo prévio. Dos ami

noácidos sintetizados pelas células 14 eram derivados do glutamato-1- ^{14}C . O mais encontrado foi prolina que seria um produto direto do metabolismo do glutamato. Outros aminoácidos (aspartato, treonina, leucina, isoleucina) estariam marcados presumivelmente pela fixação do CO_2 provindo do esqueleto carbônico do glutamato-1- ^{14}C .

Analizando os aminoácidos de bandas proteicas aquele autor percebeu que 88% da prolina e 82% de treonina marcadas estavam incorporadas em proteínas. Porém, nada foi encontrado para tirosina (0%). Estas diferenças devem ser encaradas devido à compartimentalização dos aminoácidos que são estocados nos diferentes "pools" de aminoácidos.

Para testar a importância do glutamato exógeno na incorporação direta em proteína e do glutamato endógeno, FLETCHER (1974) fez a incubação de acetato-U- ^{14}C (excelente fonte de glutamato sintetizado endogenamente) e glutamato- ^3H como fonte exógena.

A distribuição do glutamato- ^{14}C endogenamente sintetizado era de 83% em aminoácido livre e 17% em proteína.

O glutamato-U- ^3H distribuiu-se em 86% como aminoácido livre e 14% em proteína. A similaridade na distribuição dos isótopos originados de ambas as fontes indica que a disponibilidade do glutamato absorvido para síntese de proteína é aproximadamente igual a do glutamato sintetizado endogenamente, (FLETCHER, 1974).

No presente trabalho fizemos observações visuais de como se comportaram culturas de tecido de feijão em presença de aminoácidos. Não sabemos, porém, exatamente como estes foram utilizados no metaboli-

mo das células. É possível, por exemplo, que o ácido glutâmico tenha seguido uma das vias metabólicas propostas pelos autores citados.

5.5. MODIFICAÇÕES NOS FITOHORMÔNIOS - Analisando os resultados dos ensaios 4.8. e 4.9. notamos que a presença dos fitohormônios ácido naftaleno acético (NAA) e ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (ensaio 4.9.) provocaram uma diferença bastante acentuada no índice de crescimento. Os resultados podem ser observados nas Figuras 4 e 5B. Comparando os resultados de IC dos ensaios nas Tabelas 11 e 13 respectivamente notamos diferenças bem acentuadas entre os dois ensaios. As maiores diferenças são para os tratamentos B₂, B₃ e B₄. Estes tratamentos são os que possuem ácido glutâmico nas concentrações mais baixas 0,1 mg/l, 0,3 mg/l e 5,0 mg/l, respectivamente. Conclui-se então que o ácido glutâmico em baixas concentrações associado ao NAA, 2,4-D e IAA, proporciona um meio excelente para desenvolvimento de calos de explantes de feijão.

Estes dados são condizentes com a literatura. HARVEY e GRASHAM (1969) mostram que a adição suplementar de aminoácidos é benéfica ao crescimento induzido por auxinas em 12 espécies de coníferas.

Auxina associada a citocinina é um constituinte necessário do meio para se obter ótimo crescimento (MILLER, 1963). Sabe-se, por outro lado que as auxinas mais usadas em cultura de tecido são IAA, NAA e 2,4-D, havendo diferenças na eficiência destas auxinas na indução de calos de diferentes espécies. Assim, a especificidade de espécies por IAA,

Tabela 13 - Índice de crescimento do ensaio com ácido glutâmico em diferentes concentrações (Ensaio 4.9.).

Tratamentos	I.C.*	$\pm s^{**}$	n***
B ₁	2.8069	0.3439	7
B ₂	3.1691	0.5312	6
B ₃	3.0782	0.5645	9
B ₄	3.1763	0.5929	9
B ₅	2.4852	0.9743	7
B ₆	2.0269	0.7656	7
B ₇	1.1153	0.3291	6
B ₈	1.4921	0.4607	9
B ₉	0.8734	0.8180	7
B ₁₀	1.1736	0.3568	7
B ₁₁	0.7004	0.7714	5
B ₁₂	0.1169	0.0721	8
B ₁₃	0.5408	0.4360	5
B ₁₄	0.0199	-	7
B ₁₅	0.0040	-	9
B ₁₆	0.0010	-	9
E	3.5045	0.4157	8
G	2.2492	0.6127	8

*Índice de crescimento

**Desvio padrão

***Número de frascos

Tabela 14 - Índice de morfogênese do ensaio com ácido glutâmico em diferentes concentrações (Ensaio 4.9.).

Tratamentos	I.M.*	$\pm s^{**}$	n***
B ₁	0.8839	0.5000	8
B ₂	0.7071	0.0000	9
B ₃	0.8106	0.2182	10
B ₄	1.0789	0.6148	9
B ₅	0.7071	0.0000	8
B ₆	0.8642	0.4714	9
B ₇	0.7071	0.0000	8
B ₈	1.4264	0.6370	10
B ₉	1.2061	0.6930	8
B ₁₀	1.1435	0.6023	8
B ₁₁	1.0906	0.5910	9
B ₁₂	0.8939	0.4044	9
B ₁₃	1.1493	0.6128	7
B ₁₄	0.7810	0.1956	7
B ₁₅	0.7071	0.0000	9
B ₁₆	0.7071	0.0000	8
E	0.8810	0.1830	8
G	0.7718	0.3359	8

*Índice de morfogênese

**Desvio padrão

***Número de frascos

Figura 5-A - Índice de morfogênese do ensaio contendo ácido glutâmico em diferentes concentrações (Ensaio 4.9.).

B ₁ - Glu 0,0 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₀ - Glu 40 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₂ - Glu 0,1 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₁ - Glu 50 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₃ - Glu 0,3 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₂ - Glu 60 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₄ - Glu 0,5 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₃ - Glu 65 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₅ - Glu 1,0 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₄ - Glu 500 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₆ - Glu 5,0 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₅ - Glu 1.000 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₇ - Glu 10 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₆ - Glu 2.000 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₈ - Glu 20 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	G - Meio básico.
B ₉ - Glu 30 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	E - Caseína hidrolizada 2.000 mg/l.

Figura 5-B - Índice de crescimento do ensaio com ácido glutâmico em diferentes concentrações (Ensaio 4.9.).

B ₁ - Glu 0,0 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₀ - Glu 40 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₂ - Glu 0,1 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₁ - Glu 50 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₃ - Glu 0,3 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₂ - Glu 60 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₄ - Glu 0,5 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₃ - Glu 65 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₅ - Glu 1,0 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₄ - Glu 500 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₆ - Glu 5,0 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₅ - Glu 1.000 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₇ - Glu 10 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	B ₁₆ - Glu 2.000 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.
B ₈ - Glu 20 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	G - Meio básico.
B ₉ - Glu 30 mg/l; Gly 25 mg/l; His 10 mg/l.	E - Caseína hidrolizada 2.000 mg/l.

NAA ou 2,4-D foram observadas em 12 espécies de coníferas (HARVEY e GRASHAM, 1969). O efeito do 2,4-D foi bastante superior aos outros fatores de crescimento na produção de calos em batata e *Xanthi* (MATSUMOTO *et alii*, 1971). Em *Pinus* 2,4-D é melhor que IAA para crescimento de calos (BROWN e LAWRENCE, 1968), e em *A. pseudoplatanus* (ELEGUAY e GUERN, 1977) o crescimento de populações de células está em função linear com a concentração de 2,4-D. Outras espécies em que 2,4-D é melhor que outras auxinas, na produção de calos, incluem o arroz (WU e LI, 1971); 30 espécies de *Nicotiana* e 6 espécies de *Populus* (MATSUMOTO *et alii*, 1971).

No presente trabalho, os calos que cresceram com IAA e cinetina (Ensaio 4.8.), possuem cor marrom claro e têm aspecto de massa compacta. Os calos oriundos de 2,4-D, NAA, IAA e cinetina são claros quase brancos e tem o aspecto menos compacto.

Na literatura encontram-se citações de cores e aspectos diferentes para calos produzidos por diferentes auxinas. WITHAM (1968) relata que cultura de tecido de soja cresce em cinetina e IAA produzindo normalmente calos brancos com massa compacta de células que resultam da divisão e aumento celular. Calos crescidos em 2,4-D são amarelos, o tamanho das células é relativamente maior e estas são mais aquosas.

O mesmo autor notou que tecido de fumo responde à cinetina com formação de parte aérea e plântulas. No entanto, o 2,4-D estimula a formação de células de calos que se tornam muito grandes. Vistas ao microscópio as células crescidas em 2,4-D são maiores que as crescidas em cinetina, IAA ou NAA.

Na morfogênese de raízes, não se notam diferenças acentuadas no IM (Tabelas 12 e 14). Isto acontece porque o critério de avaliação foi feito pelo número de raízes. No entanto a observação visual mostrou aspectos muito interessantes. As raízes produzidas no ensaio com cinetina e IAA possuíam comprimentos de 1 a 3 cm, eram afiladas com muitas bifurcações, pelos absorvente, raízes aéreas e geotrópicas.

Os tratamentos com 2,4-D, NAA, IAA e cinetina apresentaram raízes muito curtas e finas com pontos escuros. Notou-se muitos pontilhados escuros, talvez primórdios de raízes que não chegaram a se desenvolver. O número de frascos com raízes foi pequeno nunca ultrapassando a três.

Em cultura de tecido, cinetina é necessária para a divisão celular (PATAU *et alii*, 1957) e para a regulação da biossíntese celular (SKOOG, 1970). Ainda, em tecido de medula de fumo PATAU (1957) observou que cinetina é necessária para a mitose e citocinese.

Em explantes de feijão cinetina é capaz de estimular a divisão celular e na presença de IAA tanto a divisão como a diferenciação celular são aumentadas (CROCOMO *et alii*, 1976). Os autores observaram também que não há indução de raízes na ausência de cinetina. Por outro lado, há um ponto ótimo de correlação entre cinetina e IAA que coincide com ótimo crescimento e desenvolvimento de raízes.

O maior crescimento observado no experimento 4.8. em relação ao 4.9. é atribuído ao acréscimo de 2,4-D e NAA ao meio. Esta hipótese é aventada na literatura, por PATAU (1957) que diz ser a auxina ne-

cessária para a duplicação de DNA e para a mitose. Ainda, o 2,4-D é um hormônio de crescimento (WEDDING e BLACK, 1962) e como tal age no sentido de aumentar o peso fresco.

Indicações mais específicas nos são dadas por BOYLE *et alii* (1975) citado por KENDE e GARDNER (1976) afirmando que o 2,4-D aumenta a atividade da RNA-polimerase. Também, que o 2,4-D estimula a síntese de RNA (O'BRIEN *et alii*, 1968 citado por KENDE e GARDNER, 1976). Ainda, níveis crescentes de 2,4-D acarretam aumento de proteína em trigo (ERICKSON, 1948; KLINGMAN, 1947-1948). Em células de "Paul's scarlet rose", altos níveis de 2,4-D, proporcionaram elevado teor de proteína (GABARDO, 1977).

Observando-se em conjunto as tabelas de IC e IM dos dois ensaios (Tabelas 11, 12, 13 e 14), nota-se que a influência do ácido glutâmico não é exatamente a mesma para o crescimento e morfogênese. É de se notar (Figuras 4, 5A e 5B) que para o crescimento, os melhores índices estão nas concentrações mais baixas de ácido glutâmico caindo drasticamente a partir do tratamento B₆ em ambos os ensaios. Para morfogênese os melhores resultados estão em concentrações intermediárias alcançando um pico máximo em B₈ para ambos os ensaios.

Observa-se ainda que o ácido glutâmico em concentrações mais elevadas que 0,5 mg/l inibe crescimento não só em auxina isolada, como é o caso do ensaio 4.8. que contém IAA, mas também sobre auxinas em conjunto como no ensaio 4.9. que foi acrescido de 3 auxinas.

É conhecido na literatura o fato de que aminoácidos em al-

tas concentrações causam repressão no crescimento (FILNER, 1966; BIDWELL, 1974) e em baixas concentrações o crescimento é estimulado (EAGLE, 1959; MEISTER, 1965).

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos, analisados estatisticamente e interpretados à luz dos subsídios coletados na literatura especializada, permitem-nos tirar, dentro das condições experimentais em que foi realizado o presente trabalho, as seguintes conclusões:

- É possível obter-se bom crescimento em culturas de tecido de feijão usando aminoácidos como fonte de nitrogênio reduzido.
- Pode-se substituir a caseína hidrolizada, necessária a um bom desenvolvimento de culturas de feijão, por aminoácidos específicos.
- Pode-se afirmar que os aminoácidos que proporcionaram um

efeito benéfico na cultura podem ser usados isoladamente ou em grupos.

- Dentre os grupos de aminoácidos testados, nos vários meios, destacou-se com maior eficiência o meio A contendo três aminoácidos: arginina, ácido aspártico e cisteína.

- Arginina, ácido aspártico e cisteína mostraram efeitos semelhantes, quando testados em grupo, isoladamente ou dois a dois. Há evidências de uma atuação um pouco superior por parte da arginina.

- Aminoácidos isolados ou em grupos causam inibição no crescimento e morfogênese de culturas de tecido de feijão. Destacou-se com maior efeito de repressão, dentre os vários grupos de aminoácidos testados, o meio B onde foram incluídos três aminoácidos: ácido glutâmico, glicina e histidina.

- Da observação do comportamento do ácido glutâmico, glicina e histidina em grupo, dois a dois ou isoladamente, destacou-se o ácido glutâmico como forte repressor de crescimento e morfogênese em cultura de tecido de feijoeiro.

- O ácido glutâmico pode, por outro lado ser considerado como repressor ou estimulador de crescimento e morfogênese em feijão, dependendo da concentração utilizada. Baixas concentrações proporcionaram efeito estimulante enquanto que altas concentrações têm efeito contrário.

- O 2,4-D é um fitohormônio que beneficia grandemente a produção de massa celular. Sua presença é sumamente favorável ao desenvolvimento de calos, porém não é propícia à morfogênese.

7. SUMMARY

INFLUENCE OF AMINO ACIDS ON GROWTH AND MORPHOGENESIS OF BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) LEAF TISSUE IN CULTURE

This present work consists of a series of experiments developed at C.E.N.A. The main objective of the project being to obtain a chemically defined medium for the tissue culture of bean (*Phaseolus vulgaris* L.).

Beans seeds (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. carioca, were germinated in river sand and maintained, afterwards in Hoagland and Arnon's nutrient solution number 2.

Explants from the first pair of bean plants were aseptically removed and inoculated on to a modified MURASHIGE and SKOOG (1962) agar culture medium.

The medium contained mineral salts, vitamins, and sucrose. The latter was used as the energy source in the basal medium.

The growth factors used in the medium consisted of the following: kinetin and IAA together or kinetin, IAA, NAA and 2,4-D. The pH of all media used in these experiments was adjusted to 5.6 after the addition of all the nutrients.

Isolated amino acids or those in groups were added to the basal medium in order to observe the efficiency of these substances in the promotion of callus growth and root morphogenesis.

Two kinds of cultures were maintained as standards. One containing hydrolyzed casein as a reduced nitrogen source (medium E) and the other containing basal medium in the absence of amino acids and casein hydrolysate.

A periodic scoring of callus growth (fresh and dry weight measurements) and morphogenetic development of the cultures was made at the end of each trial.

The IM (Morphogenesis Index) and IG (Growth Index) were calculated from the compiled data and tabulated in a statistical table.

According to the results of the analysis, the culture medium that provided optimal morphogenesis was medium A containing basal

medium with kinetin (1 mg/l), IAA (5 mg/l) and a group of three amino acids: arginine (60 mg/l), aspartic acid (50 mg/l) and cysteine (10 mg/l).

Whereas, the medium B which contained basal medium with kinetin (1 mg/l), IAA (5 mg/l) and a group of three amino acids: glutamic acid (65 mg/l), glycine (25 mg/l) and histidine (10 mg/l), provided a drastic inhibition in both growth and morphogenesis.

When 16 glutamic acid concentrates were tested, keeping the glycine and histidine constant, it was observed that the presence of glutamic acid, per se, in medium B that was responsible for growth inhibition but rather the concentration used (65 mg/l). One can conclude, therefore, that at low concentrations of glutamic acid (0.5 mg/l) produced substantial growth however at high concentrations the growth was inhibited.

Optimal callus growth was obtained in medium B₄, in which four hormones kinetin (0.2 mg/l), IAA (2 mg/l), NAA (1 mg/l) and 2,4-D (1 mg/l) were added to the basal medium together with a group of three amino acids: glutamic acid (0.5 mg/l), glycine (25 mg/l) and histidine (10 mg/l).

8. LITERATURA CITADA

ADAMSON, L.F., A.C. HERINGTON and J. BORNSTEIN, 1972. Evidence for the selection by the membrane transport system of intracellular or extracellular amino acids for protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 282:352-365.

AMORIM, H.V., D.K. DOUGALL and W.R. SHARP, 1977. The effect of carbohydrate and nitrogen concentration on phenol synthesis in Paul's Scarlet Rose cells grown in tissue cultures. *Physiol. Plant.* 39:91-95.

- BAYLEY, J.M., J. KING and O.L. GAMBORG, 1972. The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. *Planta* (Berl.) 105:15-24.
- BAYLEY, J.M., J. KING and O.L. GAMBORG, 1972. The ability of amino compounds and conditioned medium to alleviate the reduced nitrogen requirement of soybean cells grown in suspension cultures. *Planta* (Berl.) 105:25-32.
- BEHREND, J. and R.I. MATELES, 1975. Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 56:584-589.
- BENKO, P.V., T.C. WOOD and I.H. SEGEL, 1969. Multiplicity and regulation of amino acid transport in *Penicillium chrysogenum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 129:498-508.
- BIDWELL, R.G.S., 1974. Nitrogen metabolism. In: Plant Physiology, Macmillan Publishing Co., Inc. New York. 643p.
- BIDWELL, R.G.S., R.A. BARR and F.C. STEWARD, 1964. Protein synthesis and turnover in cultured plant tissue: sources of carbon for synthesis and the fate of the protein breakdown products. *Nature Lond.* 203: 367-373.
- BROW, C.L. and R.H. LAWRENCE, 1968. Culture of pine callus on a defined medium. *Forest. Sci.* 14:62-64.

- CAPLIN, S.M. and F.S. STEWARD, 1948. Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. *Science* 108:655-657.
- CAPLIN, S.M., 1956. Variability of carrots to auxin, casein hydrolysate and coconut milk. *Amer. Jour. Bot.* 43:749-754.
- CONN, E.E. e P.K. STUMPF, 1975. Introdução à Bioquímica. Tradução da 3a. edição Americana. Ed. Edgard Blucher Ltda. 447p.
- CROCOMO, O.J., J.E. PETERS and W.R. SHARP, 1976. Interactions of phytohormones on the control of growth and root morphogenesis in cultured *Phaseolus vulgaris* leaf explants. *Turrialba* 26(3):232-236.
- CROCOMO, O.J., J.E. PETERS and W.R. SHARP, 1976. Effect of caffeine and nicotine on the callus growth and root morphogenesis of *Phaseolus vulgaris* tissue cultures. *Turrialba* 26(4):337-341.
- CROCOMO, O.J., W.R. SHARP and J.E. PETERS, 1976. Plantlet morphogenesis and the control of callus growth and root induction of *Phaseolus vulgaris* with the addition of a bean seed extract. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 78:456-460.
- CROFTS, A.R., 1967. Amino uncoupling of energy transfer in chloroplasts. I. Relation to ammonium ion uptake. *J. Biol. Chem.* 242:3352-3359.

- DOUGALL, D.K., 1974. Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. C.* 58:639-649.
- DOUGALL, D.K., 1964. A method of plant tissue culture giving high growth rates. *Exp. Cell. Res.* 33:438-444.
- DOUGALL, D.K. and M.M. FULTON, 1967. Biosynthesis of protein amino acids in plant tissue culture. IV. Isotope competition using glucose-U-¹⁴C and potencial intermediates. *Plant Physiol.* 42:941-945.
- EAGLE, H., 1959. The specific amino acid requirements of a Mammalian cell (strain L.) in tissue culture. *J. Biol. Chem.* 214:839-852.
- ERICKSON, L.C., 1948. Effect of 2,4-D upon the protein content of wheats. *J. Am. Soc. Agron.* 40:659-670.
- FERGUSON, A.R. and E.G. BOLLARD, 1969. Nitrogen metabolism of *Spirodela oligorrhiza*. I. Utilization of ammonium nitrite and nitrate. *Planta* (Berl.) 88:344-352.
- FILNER, P., 1966. Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochim. Biophys. Acta* 118:299-310.
- FILNER, P., J.L. WRAI and J.E. VARNER, 1969. Enzyme induction in higher plants. *Science* 165:358-367.

FISHER, A., 1948. Amino-acids metabolism of tissue cells *in vitro*.

Biochem. J. 43:491-497.

FLETCHER, J.S., 1974. Metabolism of glutamate in suspension cultures of Paul's Scarlet Rose cells. *Plant Physiol.* 54:503-505.

FLETCHER, J.S. and H. BEEVERS, 1970. Acetate metabolism in cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 45:765-772.

FRENCH, D.L. and M.R. GIBSON, 1957. The effect of glutamic acid on *Datura tatula*, L. root cultures. *Jour. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 46(3):151-155.

FURUHASHI, K. and M. YATAZAWA, 1970. Amino acids as nitrogen sources for the growth of rice callus tissue. *Plant & Cell Physiol.* 11:559-567.

FURUHASHI, K. and M. YATAZAWA, 1970. Methionine - lysine - threonine - isoleucine interrelationships in the amino acids nutrition of rice callus tissue. *Plant & Cell Physiol.* 11:569-578.

GABARDO, M.L.L., 1977. Efeito de níveis de amonio e ácido 2,4-diclorofenoxiacético na atividade da desidrogenase glutâmica de tecido vegetal em cultura. Brasília, Univ. de Brasília, 125p. Tese de Mestrado.

GAMBORG, O.L., 1970. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiol.* 45:372-375.

- GAMBORG, O.L. and A.J. FINLAYSON, 1969. The amino acid composition of TCA-precipitated proteins and total residues of plant cells grown in suspension culture. *Can. J. Bot.* 47:1857-1863.
- GAMBORG, O.L., R.A. MILLER and K. OJIMA, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exptl. Cell Res.* 50:151-158.
- GAMBORG, O.L. and Y.D. SHYLUK, 1970. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. *Plant Physiol.* 45:598-600.
- GAUTHERET, R.J., 1952. Remarques sur l'emploi du lait de coco pour la réalisation des cultures de tissus végétaux. *C.R. Ac. Sc.* 235:1321-1322.
- GAUTHERET, R.J., 1959. La culture des tissus végétaux: techniques et réalisations. Paris: Masson et Cie, 863p.
- GIBSON, F., Y. PITTARD and E. REICH, 1967. Ammonium ions as the source of nitrogen for tryptophan biosynthesis in whole cells of *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 136:573-576.
- GITS, J.J. and M. GRENSON, 1967. Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. III. Evidence for a specific methionine-transporting system. *Biochim. Biophys. Acta* 135:507-516.
- GIVAN, C.V. and R.M. LEECH, 1971. Biochemical anatomy of higher plant chloroplasts and their synthesis of small molecules. *Biol. Rev.* 46:409-428.

- HALPERIN, W., 1969. Morphogenesis in cell cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20:395-418.
- HALPERIN, W. and D. WETHERELL, 1965. Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. *Nature*, 205:519-520.
- HANDRO, W., 1974. Progressos recentes no controle da morfogênese vegetal. *Cienc. e Cult.* 26:340-346.
- HANDRO, W., 1975. A floração de *Streptocarpus nobilis*. C.B. Clarke: Aspectos estruturais e fisiológicos *in vivo* e *in vitro*. Tese de livre-docência. USP. São Paulo.
- HANDRO, W., P.S. RAO e H. HARADA, 1972. Controle hormonal de la formation de cals, bourgeons, racinnes et embryons sur des explants de feuilles et de tiges de *Petunia* cultivées *in vitro*. *C.R. Acad. Sci. Paris* 275:2861-2863.
- HARVEY, A.E. and J.L. GRASHAM, 1969. Procedures and media for obtaining tissue cultures of 12 conifer species. *Can. Jour. Bot.* 47:547-549.
- HEIMER, Y.M. and P. FILNER, 1970. Regulation of the nitrate assimilation pathway of cultured tobacco cells. *Biochim. Biophys. Acta* 215:152-165.
- HEIMER, Y.M. and P. FILNER, 1971. Regulation of nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells. III. The nitrate uptake system. *Biochim. Biophys. Acta* 230:262-372.

HENSHAW, G.G., K.K. JHA, A.R. MEHTA, D.J. SHAKESHAFT and H.E. STREET, 1966.

Studies on the growth in culture of plant cells. I. Growth patterns in batch propagated suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 17:363-367.

HILDEBRANDT, A.C., J.C. WILMAN, H. JOHNS and A.J. RIKER, 1963. Growth of edible chlorophyllous plant tissue *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 50:248-254.

HOAGLAND, D.R. and D.I. ARNON, 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Sta. Circ.* 347.

HOLZER, H., D. MECKE, K. WULFF, K. LIESS and L. HEILMEYER, Jr., 1967. Metabolite-induced enzymatic inactivation of glutamine synthetase in *E. coli*. *Advan. Enzyme Regul.* 5:211-225.

JOY, K.W., 1959. Nitrogen metabolism of *Lemna minor*. I. Growth, nitrogen sources and amino acid inhibition. *Plant Physiol.* 44:845-848.

JULLIEN, M., 1971. Régénération de plante entières à partir de cellules séparées des feuilles de *Nicotiana tabacum* diploïdes et haploïdes. *C.R. Acad. Sci. Paris* 273:1287-1290.

KANT, V. and A.C. HILDEBRAND, 1969. Morphology of edible plant cells and tissues *in vitro*. *Can. J. Bot.* 47:849-852.

KENDE, H. and W. GARDNER, 1976. Hormone binding in plants. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 276-321.

- KING, Y. and F.H. OLENIUK, 1973. The uptake of alanine- ^{14}C by soybean root cells grown in steril suspension culture. *Can J. Bot.* 51:1109-1114.
- KONAR, R.N., E. THOMAS and H.E. STREET, 1972. The diversity of morphogenesis in suspension cultures of *Atropa belladonna* L. *Ann. Bot.* 36:249-258.
- KLINGMAN, O.L., 1947-1948. Effects of spraying cereals with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Amer. Soc. Agron.* 39:445-447.
- LAMPORT, O.T.A., 1964. Cell suspension cultures of higher plants: isolation and growth energetics. *Exp. Cell Res.* 33:195-206.
- LEGUAI, J.Y. and J. GUERN, 1977. Quantitative effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on growth of suspension-cultured *Acer pseudoplatanus* cells. *Plant Physiol.* 60:265-270.
- LEHNINGER, A.L., 1975. Biochemistry, 2nd. Ed., Worth Publishers, Inc. New York. 887p.
- LINGAPPA, Y., 1957. Tissue cultures of *Solanum tuberosum* and *Ipomea pandurata*. *Amer. Jour. Bot.* 44:419-423.
- LOND, G.W. and A.B. PARDEE, 1967. Cytidine triphosphate synthetase of *E. coli* B.I. Purification and kinetics. *J. Biol. Chem.* 242:4715-4721.

MARETZKI, A., and M. THOM, 1970. Arginine and lysine transport in sugarcane suspension cultures. *Biochemistry* 9:2731-2736.

MATSUMOTO, T., K. OKUNISHI, K. NISHIDA, M. NOGUCHI, E. TAMAKI, 1971. Studies on the culture conditions of higher plant cells in suspension culture. II. Effect of nutritional factors on growth. *Agr. Biol. Chem.* 35:543-551.

MEHTA, A.R., 1966. *In vitro* initiation and growth of root callus of *Phaseolus vulgaris* L. *Indian J. of Exp. Bio.* 4:187-188.

MEHTA, A.R., G.C. HENSHAW and H.E. STREET, 1967. Aspects of growth in suspension cultures of *Phaseolus vulgaris* L. and *Linum usitatissimum* L. *Indian J. of Plant Physiol.* 10:44-53.

MEISTER, A., 1965. Biochemistry of the amino acids. 2nd ed., volumes I and II. Academic Press Inc. New York.

MILLER, C.O., 1963. Kinetin and Kinetin-like compounds. *Modern Methods of Plant Analyses* 6:194-204.

MUNROE, M.H. and I.M. SUSSEX, 1969. Gametophyte formation in bracken fern root cultures. *Can. J. Bot.* 47:617-621.

MURASHIGUE, T. and F. SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

- NAKASHIMA, H., 1964. Effects of exogenous amino acids on the flower and frond production in duckweed, *Lemna gibba* G₃. *Plant Cell Physiol.* 5: 217-225.
- NASH, D.T. and M.E. DAVIES, 1972. Some aspects of growth and metabolism of Paul's Scarlet Rose cell suspension. *Jour. Exptl. Bot.* 23:75-91.
- NICKELL, L.G. and A. MARETZKI, 1969. Growth of suspension cultures of sugarcane cells in chemically defined media. *Physiol. Plant* 22:117-125.
- NITSCH, C. and J.P. NITSCH, 1967. The induction of flowering *in vitro* in stem segments of *Plumbago indica* L.I. The production of vegetative buds. *Planta* 72:355-370.
- NITSCH, J.P. and C. NITSCH, 1957. Auxin-dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues. II. Organic nitrogenous compounds. *Am. J. Bot.* 37:538-547.
- PATAU, K., N.K. DAS and F. SKOOG, 1957. Induction of DNA synthesis by kinetin and indolacetic acid in excised tobacco pith tissue. *Physiol. Plant.* 10:949-966.
- POLACCO, J.C., 1976. Nitrogen metabolism in soybean tissue culture. *Plant Physiol.* 58:350-357.
- RAGHAVAN, V. and J.G. TORREY, 1964. Inorganic nitrogen nutrition of the seedling of the orchid *Cattleya*. *Amer. J. Bot.* 51:264-274.

- REINERT, J., M. TAZAWA and S. SEMENOFF, 1967. Nitrogen compounds as factors of embryogenesis *in vitro*. *Nature* 216:1215-1216.
- ROSE, D., S.M. MARTIN, 1972. Metabolic rates for major nutrients in suspension cultures of plant cells. *Can. J. Bot.* 50(6):1301-1308.
- SALONEN, M. and K. SIMOLA, 1977. Oeptides and amino acids as nitrogen sources for the callus of *Atropa belladonna*. *Physiol. Plant.* 41:55-58.
- SARGENT, P.A. and J. KING, 1974. Investigations of growth-promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine, and amino acids. *Can. J. Bot.* 52: 1747-1755.
- SHARP, W.R. and O.J. CROCOMO, 1975. Application of nuclear energy to the study of cellular and developmental biology. A Series, vol. I e II. Handbook of plant tissue culture (Part I e Part II). CENA, Piracicaba.
- SIMOLA, L.K., 1975. The effect of several proteins amino acids and some inorganic nitrogen sources on the growth of *Sphagnum nemoreum*. *Physiol. Plant.* 35:194-199.
- SKOOG, F. and C.D. MILLER, 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues *in vitro*. *Symp. Soc. Exper. Biol.* 11:118-131.

- SKOOG, F., 1954. Substances involved in normal growth and differentiation of plants. *Brookhaven Symp. Biol.* 6:1-21.
- SKOOG, F., 1955. Growth factors, polarity and morphogenesis. *Ann. Biol.* 31:1-13.
- SKOOG, F., 1970. Aspects of growth factors interactions in morphogenesis of tobacco tissue cultures. *Colloques internationaux C.N.R.S.* 193:115-135.
- SPOERL, E., 1948. Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. *Am. J. Bot.* 35:88-95.
- STEINHAET, C.E., L.C. STANDIFER and F. SKOOG, 1961. Nutrient requirements for *in vitro* growth of spruce tissue. *Am. J. Bot.* 48:465-472.
- STEWART, F.C. and M.O. MAPES, 1963. The totipotency of cultured carrot cells: evidence and interpretations from successive cycles of growth from phloem cells. *J. Indian Botan. Soc.* 42:237-247.
- STEWART, F.C., M.O. MAPES, A.E. KENT and R.D. HOLSTEN, 1964. Growth and development of cultured plant cells. *Science* 143:20-27.
- STEWART, F.C. and R.G.S. BIDWELL, 1966. Storage pools and turnover systems in growing and non-growing cells: experiments with sucrose- ^{14}C , glutamine- ^{14}C and asparagine- ^{14}C . *J. Exp. Bot.* 17:726-741.

- STEWART, F.C., R.G.S. BIDWELL and E.W. YEMM, 1958. Nitrogen metabolism, respiration and growth of cultured plant tissue. *J. Exp. Bot.* 9:11-49.
- STREET, H.E., R.N. KONAR and E. THOMAS, 1972. The diversity of morphogenesis in suspension cultures of *Atropa belladonna*, L. *Ann. Bot.* 36: 249-258.
- TAZAWA, M. and J. REINERT, 1969. Extracellular and intracellular chemical environments in relation to embryogenesis *in vitro*. *Protoplasma* 68:157-173.
- THOMAS, E. and H.E. STREET, 1972. Factors influencing morphogenesis in excised roots and suspension cultures of *Atropa belladonna*. *Ann. Bot.* 36:239-247.
- VAN OVERBEEK, J., M.E. CONKLIN, A.F. BLAKESLEE, 1942. Cultivation *in vitro* of small *Datura* embryos. *Amer. Jour. Bot.* 29:472-477.
- VELIKY, I.A. and D. ROSE, 1973. Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 51:1837-1844.
- VELIKY, A. and K.M. BARBER, 1975. Biotransformation of tryptophan by *Phaseolus vulgaris* suspension culture. *Lloydia* 38:125-130.
- VELIKY, I.A. and S.M. MARTIN, 1970. A fermenter for plant cell suspension cultures. *Can. J. Microbiol.* 16:223-226.

WARRIS, H., 1969. Neomorphosis in seed plants induced by amino acids.

I. *Oenanthë aquatica*. *Physiol. Plant.* 12:753-766.

WEDDING, R.T. and M.K. BLACK, 1962. Response of oxidation e coupled phosphorylation in plant mitochondria to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Physiol.* 32:361-370.

WETHERELL, D.F. and D.K. DOUGALL, 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant.* 37:97-103.

WITHAM, F.H., 1968. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the cytokinin requirement of soybean cotyledon and tobacco stem pith callus tissues. *Plant Physiol.* 43:1455-1457.

WU, L. and H.W. LI, 1971. Induction of callus tissues. Initiation from different somatic organs of rice plant by various concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Cytologie* 36:411-416.

YATAZAWA, M. and K. FURUHASHI, 1968. Nitrogen sources for the growth of the callus tissue. *Soil Sci. and Plant Nutr.* 14:73-79.

YOUNG, M. 1973. Studies on the growth in cultures of plant cells. *J. Exp. Bot.* 24:1172-1185.

9. APENDICE

Figura 6 - Formação de calo a partir de explantes de folha de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, cv. Carioca), apresentando diferenciação em raízes e ótimo crescimento.

Meio A (ensaio 4.5.): meio básico + Arg (60 mg/l), Asp(50mg/l) e Cys (10 mg/l).

Figura 7 - Formação de calo a partir de explantes de folha de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, cv. Carioca), mostrando inibição tanto no crescimento de calos como na morfogênese de raízes.

Meio B (ensaio 4.5.): meio básico + Glu (65 mg/l), Gly (25mg/l) e His (10 mg/l).

Figura 8 - Formação de calo a partir de explantes de folha de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, cv. Carioca). O crescimento foi inferior aos meios A, C, F e E, mas superior ao meio B.

Meio G (ensaio 4.5.): meio básico sem aminoácidos.

Figura 9 - Formação de calo a partir de explantes de folha de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, cv. Carioca), observando-se que na ausência de Arg, Asp e Cys houve inibição de crescimento.

Meio F (ensaio 4.6.): F₁ - meio básico + conjunto dos aminoácidos, estando ausente Arg.

F₂ - meio básico + conjunto dos aminoácidos, estando ausente Asp.

F₃ - meio básico + conjunto dos aminoácidos, estando ausente Cys.

F₇ - meio básico + conjunto dos aminoácidos, estando ausente Arg, Asp e Cys.

A A₁ A₂ A₃ F₇

Figura 10 - Formação de calo a partir de explantes de folha de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, cv. Carioca), mostrando a necessidade da presença simultânea de Arg, Asp e Cys (meio A) para ótimo crescimento de calos.

Meio A e F (ensaio 4.6.): A - meio básico + Arg (60 mg/l),
Asp (50 mg/l) e Cys (10 mg/l).

A₁ - meio básico + Arg (60 mg/l).

A₂ - meio básico + Asp (50 mg/l).

A₃ - meio básico + Cys (10 mg/l).

F₇ - meio básico + 10 aminoácidos
(ausência de Arg, Asp e Cys).

Figura 11 - Formação de calo a partir de explantes de folha de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, cv. Carioca). Glu inibiu o crescimento de calo e morfogênese de raiz. Nos casos onde ocorreu diferenciação em raízes estas são débeis, curtas e sem bifurcações.

Meio B₁ (ensaio 4.7.): meio básico + Glu (65 mg/l).

B₁₄B₁₁B₆B₂

Figura 12 - Influência de Glu, em várias concentrações sobre a formação de calo a partir de explantes de folha de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, cv. Carioca). Observe-se que altas concentrações (B₁₁ e B₁₄) inibem crescimento enquanto que baixas concentrações (B₂ e B₆) estimulam o crescimento.

Meio B modificado (ensaio 4.8.):

B₂ - meio básico + Glu(0,1mg/l), Gly(25mg/l) e His(10mg/l).

B₆ - meio básico + Glu (5mg/l), Gly(25mg/l) e His(10mg/l).

B₁₁ - meio básico + Glu (50mg/l), Gly(25mg/l) e His(10mg/l).

B₁₄ - meio básico + Glu(500mg/l), Gly(25mg/l) e His(10mg/l).

Figura 13 - Influência de Glu, em várias concentrações sobre a formação de calo a partir de explantes de folha de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, cv. Carioca). Observe-se que a presença de NAA (1 mg/l) e 2,4-D (1 mg/l) além de IAA (2 mg/l) e cinetina (0,2 mg/l), determinou maior volume de calo com coloração mais clara. Note-se que pode ocorrer morfogênese de raízes (B₆-1).

Meio B modificado (ensaio 4.9.): Glu, Gly e His nas mesmas concentrações como na Figura 12.

Figura 14 - Influência de Glu, em várias concentrações sobre a formação de calo a partir de explantes de folha de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, cv. Carioca). Na concentração de 0,5 mg/l Glu determina ótimo crescimento de calo em presença de IAA (5 mg/l) e cinetina (1 mg/l).

Meio B₄ (ensaio 4.8.): meio básico + Glu (0,5 mg/l), Gly (25 mg/l) e His (10 mg/l).

Figura 15 - Influência de Glu, em várias concentrações sobre a formação de calo a partir de explantes de folha de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, cv. Carioca). Na concentração de 0,5 mg/l Glu determina ótimo crescimento de calo em presença de IAA (2 mg/l), cinetina (0,2 mg/l), NAA (1 mg/l) e 2,4-D (1 mg/l).

Meio B₄ (ensaio 4.9.): meio básico + Glu (0,5 mg/l), Gly (25 mg/l) e His (10 mg/l).