**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE
NITROGÊNIO EM *Canavalia ensiformes* (L.) EM
RESPOSTA A VARIAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE
NITRATO FORNECIDA**

Liliane Santos de Camargos

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 2002

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE
NITROGÊNIO EM *Canavalia ensiformes* (L.) EM RESPOSTA A
VARIAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO FORNECIDA**

LILIANE SANTOS DE CAMARGOS

Licenciada em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. **RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro - 2002

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Camargos, Liliâne Santos de
Análise das alterações no metabolismo de nitrogênio em *Canavalia ensiformes* (L.) em resposta a variações na concentração de nitrato fornecida / Liliâne Santos de Camargos. - - Piracicaba, 2002.
113 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Feijão-de-porco 2. Leguminosa forrageira 3. Metabolismo vegetal 4. Nitrato 5. Nitrogênio I.
Título

CDD 635.652

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

*Ao meu companheiro, Leandro,
e à nossa linda filha, Júlia,*

Ofereço e dedico

AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, especialmente ao Departamento de Ciências Biológicas, pela oportunidade concedida para a realização do curso.

Ao Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas (Departamento de Genética/ESALQ-USP) e, por conseguinte, ao Prof. Dr. Ricardo Antunes Azevedo pela orientação, apoio e amizade dispensados.

Ao Prof. Dr. Leandro Ferreira de Aguiar (UFMS/ Campus de Três Lagoas/ Departamento de Ciências Naturais), como profissional, pelo importante auxílio durante a elaboração e durante todo o desenvolvimento do projeto; e como companheiro, pelo apoio, compreensão e cumplicidade constantemente dispensados.

Ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek (Unicamp/ Instituto de Biologia/ Departamento de Fisiologia Vegetal), pelo profissionalismo demonstrado e pelas valiosas discussões durante a elaboração da versão final do trabalho.

Aos meus pais, Lázaro e Lúcia Camargos, e a meu irmão, Linderley.

Aos grandes amigos, Gilberto C. Justino e Meire Cristina N. Pereira, pelo constante apoio, apesar da distância.

Aos colegas de curso, Amanda Francine Asega, Antônio Francisco C. Amaral, Maria Carolina D. Vitti e Rosana Fátima Z. Saciloto, pelo estímulo.

Aos AMIGOS de laboratório, Alejandro Alberto Toro, Fabrício S. Delite, José Antônio Carmezini de Paula, Guilherme José G. Pereira, Patrícia Felipe Cardoso e Vanderlei A. Varisi, pela contribuição, direta ou indireta, para a concretização deste.

À Piraí Sementes (Piracicaba – SP), pela disponibilização do material.

À FAPESP pela bolsa concedida (processo 01/03462-8) e pelo apoio financeiro ao projeto (processo 02/02536-0).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMO.....	xix
SUMMARY.....	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 Nitrogênio e meio ambiente.....	5
2.2 Nitrogênio e leguminosas.....	6
2.3 Nitrato: absorção, transporte e redução em plantas superiores.....	9
2.3.1 Absorção e transporte de nitrato.....	10
2.3.2 Transportadores responsáveis pela absorção, transporte e partição de nitrato.....	11
2.3.3 Aspectos fisiológicos da enzima Nitrato Redutase (NR).....	12
2.3.4 Interação entre o metabolismo de carbono e nitrogênio e efeitos ambientais na redução de nitrato.....	15
2.4 Metabolismo e transporte de aminoácidos.....	16
2.4.1 Metabolismo de asparagina	19

	Página
2.4.2 Asparagina como um aminoácido transportador	20
2.4.3 Síntese e degradação de asparagina	21
2.4.4 Metabolismo de canavanina	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Material biológico.....	25
3.2 Cultivo das plantas.....	26
3.3 Coleta do Material.....	26
3.4 Extração de compostos nitrogenados para quantificação e análise qualitativa de aminoácidos	27
3.5 Quantificação de compostos nitrogenados.....	28
3.5.1 Análise quantitativa de aminoácidos.....	28
3.5.2 Análise quantitativa de ureídeos (Alantoína e Ácido Alantóico).....	28
3.5.3 Análise quantitativa de nitrato.....	29
3.5.4 Análise quantitativa de proteínas.....	30
3.6 Hidrólise de proteína para análise de aminoácidos por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Resolução).....	31
3.7 Análise qualitativa de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)	31
3.8 Análise da atividade da enzima Nitrato Redutase (NR)	32
3.9 Avaliação da presença da enzima Asparaginase (ASNase) por WESTERN BLOT	33
3.9.1 Extração da enzima Asparaginase	33
3.9.2 Separação de proteínas em gel de poliacrilamida	34
3.9.3 Coloração do Gel com Prata	35

	Página
3.9.4 WESTERN BLOT	36
4 RESULTADOS E DISCUSSAO	39
4.1 Quantificação de compostos nitrogenados	40
4.2 Análise qualitativa de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)	50
4.3 Avaliação de massa fresca e massa seca	68
4.4 Análise da atividade da enzima Redutase de Nitrato (NR)	71
4.5 Avaliação da presença da enzima Asparaginase (ASNase) por WESTERN BLOT	75
5 CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
APÊNDICE	106

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>1 Eletroforese em gel nativo (coloração com prata) de amostras (proteína total) de tecidos de plantas jovens (7 dias após a germinação). 1 e 5, raiz; 2 e 6, caule; 3 e 7, cotilédone; 4 e 8, folha; J, semente imatura de <i>Crotalaria juncea</i> (padrão).....</p>	75
<p>2 WESTERN BLOT de amostras de tecidos de plantas jovens (7 dias após a germinação). 1 e 5, raiz; 2 e 6, caule; 3 e 7, cotilédone; 4 e 8, folha; J, semente imatura de <i>Crotalaria juncea</i> (padrão). A seta indica o local da reação.....</p>	76
<p>3 Eletroforese em gel nativo (coloração com prata) de amostras (proteína total) de tecidos de plantas (E1= Estádio vegetativo). 1, 2 e 3, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de NO_3^-; 4, 5 e 6, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 7,5 mM de NO_3^-; 7, 8 e 9, raiz, caule e folha de plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; J, semente imatura de <i>Crotalaria juncea</i> (padrão).....</p>	78

- 4 WESTERN BLOT de amostras de tecidos de plantas (E1= início de nodulação). 1, 2 e 3, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 7,5 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9, raiz, caule e folha de plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; J, semente imatura de *Crotalaria juncea* (padrão). A seta indica o local da reação..... 80
- 5 Eletroforese em gel nativo (coloração com prata) de amostras (proteína total) de tecidos de plantas (E2= início de florescimento). 1, 2 e 3, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 7,5 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9, raiz, caule e folha de plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; J, semente imatura de *Crotalaria juncea* (padrão). 81
- 6 WESTERN BLOT de amostras de tecidos de plantas (E2= início de florescimento). 1, 2 e 3, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 7,5 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9, raiz, caule e folha de plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; J, semente imatura de *Crotalaria juncea* (padrão). A seta indica o local da reação..... 83

- 7 Eletroforese em gel nativo (coloração com prata) de amostras (proteína total) de tecidos de plantas (E3= início de formação de frutos). 1, 2 e 3, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 7,5 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9, raiz, caule e folha de plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; J, semente imatura de *Crotalaria juncea* (padrão)..... 84
- 8 WESTERN BLOT de amostras de tecidos de plantas (E3= início de formação de frutos). 1, 2 e 3, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 7,5 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9, raiz, caule e folha de plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; J, semente imatura de *Crotalaria juncea* (padrão). A seta indica o local da reação..... 86

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Quantificação de compostos nitrogenados em sementes maduras e tecidos de plantas jovens (7 dias após germinação). Os valores são referentes à média de três repetições.	40
2 Quantificação de compostos nitrogenados em tecidos de plantas (E1= Estádio vegetativo). Os valores são referentes à média de três repetições. Médias assinaladas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.....	42
3 Quantificação de compostos nitrogenados em tecidos de plantas (E2= Início de florescimento). Os valores são referentes à média de três repetições. Médias assinaladas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.....	44
4 Quantificação de compostos nitrogenados em tecidos de plantas (E3= Início de formação de frutos). Os valores são referentes à média de três repetições. Médias assinaladas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.....	46

5	Quantificação de ureídeos em seiva de xilema (E2 e E3= Estádios reprodutivos). Os valores são referentes à média de três repetições. Médias assinaladas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.....	49
6	Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em sementes maduras.....	50
7	Análise qualitativa de aminoácidos incorporados a proteínas em sementes maduras. A concentração é expressa em micromoles de aminoácidos/g semente; a % representa %mol de aminoácido.....	51
8	Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em tecidos de plantas jovens (7 dias após germinação). A concentração é expressa em nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa %mol de aminoácido.....	53
9	Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em folhas (E1= Estádio vegetativo). A concentração é expressa em nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa %mol de aminoácido.....	55
10	Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em caule (E1= Estádio vegetativo). A concentração é expressa em nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa %mol de aminoácido.....	56
11	Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em raiz (E1= Estádio vegetativo). A concentração é expressa nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa %mol de aminoácido.....	57

- 12 Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em folhas (E2= Início de florescimento). A concentração é expressa em nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa %mol de aminoácido..... 58
- 13 Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em caule (E2= Início de florescimento). A concentração é expressa em nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa %mol de aminoácido..... 59
- 14 Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em raiz (E2= Início de florescimento). A concentração é expressa nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa %mol de aminoácido..... 61
- 15 Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em seiva de xilema (E2= Início de florescimento). A concentração é expressa nanomoles de aminoácidos/ml seiva; a % representa %mol de aminoácido..... 62
- 16 Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em folhas (E3= Início de formação de frutos). A concentração é expressa nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa %mol de aminoácido..... 63
- 17 Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em caule (E3= Início de formação de frutos). A concentração é expressa nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa %mol de aminoácido..... 64
- 18 Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em raiz (E3= Início de formação de frutos). A concentração é expressa nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa %mol de aminoácido..... 65

19	Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em seiva de xilema (E3= Início de formação de frutos). A concentração é expressa nanomoles de aminoácidos/ml seiva; a % representa %mol de aminoácido.....	67
20	Massa fresca e massa seca de tecidos de plantas jovens (7 dias após germinação). Os valores referem-se à média de três repetições.....	68
21	Massa fresca e Massa Seca de tecidos de plantas (E1= Estádio vegetativo). Os valores são referentes à média de três repetições. Médias assinaladas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.....	69
22	Massa fresca e Massa Seca de tecidos de plantas (E2= Início de florescimento). Os valores são referentes à média de três repetições. Médias assinaladas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.....	70
23	Massa fresca e Massa Seca de tecidos de plantas (E3= Início de formação de frutos). Os valores são referentes à média de três repetições. Médias assinaladas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.....	71
24	Atividade de NR em tecidos de plântulas (7 dias após germinação). Os valores são referentes à média de três repetições.....	71

25 Atividade de NR em tecidos de plantas em três diferentes estádios de desenvolvimento. Médias assinaladas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.....	72
---	----

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAPs – transportadores gerais de aminoácidos

AgNO₃ – nitrato de prata

AMP – adenosina monofosfato

ASNase – asparaginase

ATP – adenosina trifosfato

BCIP – 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate

BSA – albumina de soro bovino

CAT – transportadores de aminoácidos catiônicos

cHATS – sistema de transporte de alta afinidade constitutivo

CO₂ – dióxido de carbono

DTT – ditioneitol

GABA - γ -aminobutiric acid (ácido γ -aminobutírico)

GOGAT – Glutamato Sintase ou Glutamina oxoglutarato aminotransferase

GS – Glutamina Sintetase

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

HAc – ácido acético

HATS – High Affinity Transport Systems (sistemas de transporte de alta afinidade)

HCl – ácido clorídrico

HNO₃ – ácido nítrico

HPLC – cromatografia líquida de alta resolução

iHATS – sistema de transporte de alta afinidade de síntese induzida

KCN – cianeto de potássio

KNO_3 – nitrato de potássio

LATS – Low Affinity Transport Systems (sistema de transporte de baixa afinidade)

MeOH – metanol

N_2 – dinitrogênio

Na_2CO_3 – carbonato de sódio

NaCl – cloreto de sódio

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida)

NADPH - Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida)

NaOH – hidróxido de sódio

NBT – Nitro Blue Tetrazolium

NH_3 – amônia

NH_4^+ - íon amônio

NiR – Nitrito Redutase

NO_2^- - nitrito

NO_3^- - nitrato

NR – Nitrato Redutase

OPA - o-phtaldialdeído

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

PEPcase – Fosfoenolpiruvato Carboxilase

PPi – pirofosfato inorgânico

TEMED – N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM
Canavalia ensiformes (L.) EM RESPOSTA A VARIAÇÕES NA
CONCENTRAÇÃO DE NITRATO FORNECIDA**

Autora: LILIANE SANTOS DE CAMARGOS

Orientador: Prof. Dr. RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO

RESUMO

O nitrogênio é o nutriente mineral essencial mais limitante ao crescimento das plantas. Apenas alguns microorganismos procariotos desenvolveram um mecanismo bioquímico que permite reduzir N_2 , abundante na atmosfera, a amônia, que pode ser assimilada pelas plantas. Muitos destes microorganismos conseguem associar-se simbioticamente com outros organismos, sendo a associação de bactérias do grupo *Rhizobium* com plantas do grupo das leguminosas a mais importante a nível econômico. Por outro lado, quando existe disponibilidade de nitrato no meio ambiente, a leguminosa abandona a fixação biológica absorvendo nitrato, que é reduzido a amônia pelas enzimas nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR) e, ao final, assimilada pelo sistema GS/GOGAT. Apesar de as duas vias terem amônia como produto final, em leguminosas tropicais, principalmente as pertencentes à tribo Phaseolae, quando a amônia provém de associação simbiótica a planta exporta, via xilema, preferencialmente ureídeos, enquanto quando a amônia provém da redução de nitrato, a planta exporta amidas, principalmente

asparagina e glutamina. O objetivo do presente trabalho foi identificar, em *Canavalia ensiformes* (L.), as alterações metabólicas que ocorriam em função da concentração de nitrato fornecida à planta, através da quantificação localizada dos principais compostos nitrogenados do metabolismo de nitrogênio e dos principais sítios de redução de nitrato; bem como estudar o metabolismo de asparagina na leguminosa em questão desde o estágio de germinação até a fase reprodutiva, identificando os sítios preferenciais de metabolismo desta amida. Observou-se que o metabolismo de aminoácidos foi profundamente alterado em função da concentração de nitrato fornecida. Os níveis de aminoácidos solúveis totais não se alteraram drasticamente, o mesmo ocorrendo com os níveis de proteína e ureídeos, considerando-se os diferentes tratamentos em um mesmo estágio de desenvolvimento. Com a alteração do estágio de desenvolvimento, especialmente com o início da fase reprodutiva, o metabolismo de nitrogênio foi profundamente alterado, observando-se inversão no sítio de redução de nitrato, alterações nas concentrações totais de ureídeos e aminoácidos e alterações profundas no metabolismo de aminoácidos, quando se relaciona com o estágio vegetativo. A atividade de nitrato redutase, em *Canavalia ensiformes* (L.) mostrou-se regulada pela concentração de glutamina presente nos tecidos, tendo se mostrado mais elevada nos tecidos onde os níveis de glutamina eram menores. A alteração no sítio de redução de nitrato em função da mudança no estágio de desenvolvimento foi acompanhada pelo aumento simultâneo na concentração de glutamina solúvel nos tecidos onde a atividade da enzima foi menor. Em função das mudanças no estágio de desenvolvimento, percebeu-se também uma redução no número de sítios de possível atividade da enzima asparaginase, o que foi inferido pela redução no número de tecidos onde a enzima esteve presente, sugerindo então um possível aumento no catabolismo desta amida por ação da enzima asparagina-aminotransferase. Para maior entendimento dos processos que levam às alterações no metabolismo de nitrato, asparagina e aminoácidos de uma forma geral, os mecanismos de síntese e utilização de aminoácidos devem ser analisados para melhor compreensão dos processos envolvidos, através da análise da atividade das principais enzimas envolvidas nestes processos, bem como de estudos da transcrição dos respectivos genes.

ANALYSES OF ALTERATIONS IN NITROGEN METABOLISM IN *Canavalia ensiformes* (L.) IN RESPONSE TO DIFFERENT CONCENTRATIONS OF NITRATE

Author: LILIANE SANTOS DE CAMARGOS

Adviser: Prof. Dr. RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO

SUMMARY

Nitrogen is the most limiting essential nutrient for plant growth. Some prokaryotic microorganisms have developed a biochemical mechanism, which allows the reduction of N_2 , which is abundantly present in the atmosphere, to ammonium that can be assimilated by the plants. Many of these microorganisms form symbiotic associations with other organisms. This is especially true for leguminous plants that form symbiotic associations with bacteria belonging to the *Bradyrhizbium*, *Rhizobium*, and *Sinorhizobium* groups. Bacterial nitrogen fixation from these interactions are extremely important for the global nitrogen balance and plays a major economically role in agriculture. On the other hand, when nitrate is available in the environment, leguminous plants interrupt the symbiotic fixation process to directly use of the nitrate, which is reduced to ammonium by the enzymes nitrate reductase (NR) and nitrite reductase (NiR), and is finally assimilated by the GS/GOGAST system. Although both will result in ammonium as the end-product, in tropical leguminous plants species, mainly those of the Phaseoleae tribe, when ammonium is produced by the symbiotic

association the plant translocates mainly ureides via xylem, whereas the plant translocate mainly amides such as asparagine and glutamine, when the ammonium is produced by nitrate reduction. The objective of this study was to identify in *Canavalia ensiformes* (L.), metabolic alterations dependent upon the concentration of nitrate supplied to the plant. Specific attention was given to the quantity of nitrogen compounds from nitrogen metabolism and asparagine metabolism from the early stage of germination to the reproductive stage, with the identification of the main locations of metabolism for this amide. Amino acids metabolism was significantly altered when nitrate was supplied at different concentrations. Total soluble amino acids, total protein and ureide contents were not dramatically altered when considering the different treatments at the same developmental stage. However, nitrogen metabolism was shown to be drastically altered when different development stages were compared, particularly at the beginning of the reproductive stage, at which time a switch in the location of nitrate reduction, alterations in the total concentration of ureides and amino acids were observed, when compared to the vegetative stage. Nitrate reductase activity of *Canavalia ensiformes* was shown to be regulated by the concentration of glutamine present in the tissues, exhibiting higher activity in tissues containing lower concentrations of glutamine, which coincided with the shift of the site of nitrate reduction with the changing developmental stage. The understanding of the processes leading to the alterations in the metabolism of nitrate, asparagine, amino acids, and the mechanism related to the synthesis and utilization of amino acids requires further studies.

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é o nutriente mineral essencial mais limitante para o crescimento das plantas (Date, 1973; Hardy & Havelka, 1975). As plantas adquirem nitrogênio do solo na forma inorgânica de nitrato ou amônia. No processo de decomposição da matéria orgânica o nitrogênio é liberado na forma amoniacal que é rapidamente oxidada a nitrato por bactérias quimiossintetizantes. Somente em condições especiais de solo, pH muito ácido, alta concentração de fenóis ou anoxia, a amônia não é oxidada e algumas plantas a absorvem nesta forma. Como os colóides do solo apresentam carga líquida de superfície negativa, o nitrato não é retido e é rapidamente lixiviado pela percolação da água. Esta particularidade faz com que o nitrogênio fixado seja sempre escasso no meio ambiente.

Somente alguns microorganismos procariotos desenvolveram mecanismos bioquímicos que permitem reduzir N_2 a amônia e estes ocupam um nicho ecológico indispensável, fornecendo nitrogênio fixado para o ciclo global nos mais diferentes ecossistemas, desde solos aeróbicos, superfície dos oceanos a nódulos especializados de leguminosas (Halbleib & Ludden, 2000). A amônia é, então, incorporada em compostos orgânicos (assimilação) pois não pode ser acumulada por ser tóxica (Givan, 1979). Muitos destes microorganismos conseguiram associar-se simbioticamente com outros organismos sendo que a associação mais importante, em termos econômicos, é a associação de bactérias do grupo *Rhizobium* com plantas da família das leguminosas. Esta é a única família de plantas superiores que desenvolveu uma ampla associação simbiótica. Por esta característica, facilidade de obtenção de

nitrogênio, acumulam grande quantidade de proteína em seus órgãos que são utilizados como alimento protéico em toda a base da cadeia alimentar, além de ser fonte de nitrogênio inorgânico para outros vegetais, pela decomposição de sua matéria orgânica. Desta maneira as leguminosas constituem uma das mais importantes famílias de plantas agrícolas sendo uma importante fonte de proteína para as populações mais carentes do planeta; são consumidas diretamente, utilizadas na alimentação de animais domésticos, como adubo para outras culturas no processo de adubação verde ou em consórcio com outras espécies (Udvardi et al., 1992).

Em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio fixado no ambiente, bactérias do grupo do *Rhizobium*, vivendo saprofiticamente, infectam o sistema radicular de leguminosas e estabelecem uma relação simbiótica. Nesta associação o N_2 atmosférico de baixa reatividade é reduzido a amônia em condições bioquímicas especiais; presença do complexo enzimático nitrogenase, produzido pela bactéria, baixa concentração de oxigênio, obtida pela presença de leghemoglobina e disponibilidade de forte redutor bioquímico, fornecido pelo hospedeiro. Estas condições são todas encontradas nos nódulos funcionais do sistema radicular de leguminosas, resultado da interação simbiótica. A amônia, produto final do processo simbiótico, é liberada no citoplasma e assimilada pelo ciclo GS/GOGAT (glutamina sintetase/glutamina oxoglutarato aminotransferase ou glutamato sintase). Glutamina sintetase é localizada nos cloroplastos e citoplasma de folhas e no citoplasma de células de raízes (Oaks & Hirel, 1985) e a glutamato sintase é localizada nos cloroplastos de folhas (Mifflin & Lea, 1980) e em plastídeos nas raízes (Emes & Fowler, 1979). A partir destes primeiros compostos nitrogenados, glutamina e glutamato, todos os demais compostos orgânicos nitrogenados são produzidos pela ação de transaminases. Desta maneira o sistema radicular é a principal fonte de nitrogênio para os drenos, sítios de alta demanda.

Por outro lado, quando existe disponibilidade de nitrato no meio ambiente a leguminosa não estabelece a relação simbiótica, absorvendo nitrato que deve ser reduzido a amônia pelas enzimas nitrato redutase e nitrito redutase e, ao final, assimilada pelo sistema GS/GOGAT.

Apesar das duas vias, absorção de nitrato e fixação biológica, terem como produto final a amônia, em leguminosas tropicais mudanças profundas ocorrem no metabolismo de nitrogênio dependendo da fonte primária. Quando a amônia provém da associação simbiótica, os produtos nitrogenados exportados pelo sistema radicular, via xilema, são os ureídeos, por outro lado quando provém da redução assimilatória do nitrato os produtos exportados são amidas, principalmente asparagina e glutamina (Schubert, 1986). Estas alterações têm sido utilizadas para avaliar a participação da associação simbiótica no balanço total de nitrogênio no vegetal através da abundância relativa de ureídeos (RUA) na seiva do xilema (Maclure et al., 1980; Sanzalferez & Delcampo, 1994; Alves et al., 2000).

Esta mudança preferencial pelo metabolismo de nitrato em detrimento à associação simbiótica é desfavorável à utilização econômica das leguminosas. O ideal seria que fossem insensíveis, ou com pouca sensibilidade. Desta maneira teríamos uma entrada mais constante de nitrogênio no sistema agrícola, uma maior eficiência nas associações culturais entre leguminosas e plantas de outras famílias botânicas e uma redução substancial na necessidade de adubos nitrogenados industriais, na agricultura.

Em vários trabalhos recentes identificou-se a existência de plantas com maior tolerância à presença de nitrato (Michaelsen-Yeates et al., 1998; Chalk, 1998), isto é, que não "abandonam" a fixação simbiótica de nitrogênio ou o fazem mais lentamente, e que esta característica é genética podendo ser melhorada por vários métodos, assim como sugerido e revisado por Rodriguez-Navarro et al. (2000).

O mecanismo metabólico que leva à preferência do nitrato em relação à fixação simbiótica e os mecanismos que proporcionam tolerância do sistema simbiótico à presença de nitrato no meio, não são conhecidos e é ponto chave para a obtenção de leguminosas capazes de manterem-se em associação simbiótica efetiva mesmo em ambiente com disponibilidade de nitrato.

Os objetivos principais do presente trabalho foram estudar o metabolismo de asparagina em *Canavalia ensiformes* (L.), desde o estágio de germinação até a fase reprodutiva, identificando os sítios, tecidos, preferenciais de metabolismo desta amida transportadora de nitrogênio, em diferentes condições de suprimento de

nitrogênio e avaliar as alterações no metabolismo de síntese de compostos nitrogenados (aminoácidos, ureídeos, proteínas e nitrato) sob diferentes condições de fornecimento deste nutriente mineral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nitrogênio e meio ambiente

O nitrogênio é o nutriente mineral essencial mais limitante para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Date, 1973; Hardy & Havelka, 1975). As plantas adquirem nitrogênio do solo na forma de nitrato, amônia, uréia e aminoácidos (Willians & Miller, 2001), prevalecendo o nitrato na maioria dos solos por ser o produto final da utilização microbiológica do nitrogênio amoniacal; bactérias quimiossintetizantes dos gêneros *Nitrossomonas* e *Nitrobacter* oxidam a amônia e utilizam os elétrons removidos no seu metabolismo. Como o solo possui carga elétrica líquida negativa, o nitrato não se liga eletrostaticamente a esta matriz, sendo facilmente lixiviado quando não absorvido pelos vegetais. Em condições especiais de solo que inibem a atividade metabólica destas bactérias quimiossintetizantes, tais como anoxia, alta concentração de compostos fenólicos e alta acidez, o nitrogênio fixado disponível preponderante é a amônia que, em ambientes básicos, volatiliza-se, sendo perdida do sistema explorado pelos vegetais, o solo. Inversamente, em ambientes ácidos mantém-se na forma protonada, podendo interagir com os colóides do solo.

Na atmosfera o N_2 , dinitrogênio, é o gás mais abundante, entretanto somente alguns microorganismos procariotos desenvolveram mecanismos bioquímicos que permitem reduzir N_2 a amônia e incorporá-la a esqueletos carbônicos (assimilação

de nitrogênio), o que faz com que estes ocupem um nicho ecológico indispensável, fornecendo nitrogênio fixado para o ciclo global nos mais diferentes ecossistemas, desde solos aeróbicos, superfície dos oceanos, a nódulos especializados de leguminosas (Halbleib & Ludden, 2000). A amônia é, então, incorporada em compostos orgânicos (assimilação) pois não pode ser fisiologicamente acumulada por ser tóxica, atuando como desacoplador de membrana (Givan, 1979). Muitos destes microorganismos conseguiram associar-se simbioticamente com outros organismos sendo que a associação mais importante, em termos econômicos, é a associação de bactérias do grupo do *Rhizobium* com plantas da família das leguminosas.

No solo, o nitrogênio presente e portanto disponível para as plantas, pode estar na forma de nitrato, amônia, aminoácidos, peptídeos e purinas, sendo encontrados transportadores de membranas para todas estas formas (Willians & Miller, 2001). Uréia também é absorvida e translocada nesta forma, apresentando em tomate baixa eficiência na fase de plântula e eficiência próxima à do nitrato em outros estádios de desenvolvimento (Tan et al., 2000).

2.2 Nitrogênio e leguminosas

Um exemplo da importância da associação *Rhizobium*/leguminosas é a produção brasileira de soja que dispensa totalmente a adubação nitrogenada; o nitrogênio de todos os compostos desta planta provém da associação simbiótica, tornando o produto brasileiro altamente competitivo. Este é o único grupo de plantas superiores que desenvolveu uma ampla associação simbiótica. Por esta característica, facilidade de obtenção de nitrogênio, acumulam grande quantidade de proteína em seus órgãos, que são utilizados como alimento protéico em toda a base da cadeia alimentar, além de ser fonte de nitrogênio inorgânico para outros vegetais, pela decomposição de

sua matéria orgânica. Desta maneira, as leguminosas constituem uma das mais importantes famílias de plantas agrícolas, sendo uma importante fonte de proteína para as populações mais carentes do planeta podendo ser consumidas diretamente, utilizadas na alimentação de animais domésticos, como adubo para outras culturas no processo de adubação verde ou em consórcio com outras espécies (Udvardi et al., 1992).

Em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio fixado no ambiente, bactérias do grupo do *Rhizobium*, vivendo saprofiticamente, infectam o sistema radicular de leguminosas, estabelecendo uma relação simbiótica. Nesta associação o N_2 atmosférico, de baixa reatividade, é reduzido a amônia em condições bioquímicas especiais. É necessário a presença do complexo enzimático nitrogenase, produzido pela bactéria, ambiente sub-celular com baixa concentração de oxigênio, obtida pela presença de leghemoglobina e disponibilidade de forte redutor bioquímico. Estas condições são todas encontradas nos nódulos funcionais do sistema radicular de leguminosas, resultado da interação simbiótica. A amônia, produto final do processo simbiótico, é liberada no citoplasma e assimilada pelo ciclo GS/GOGAT (glutamina sintetase/glutamina oxoglutarato amidatransferase ou glutamato sintase). Glutamina sintetase é localizada nos cloroplastos e citoplasma de folhas e no citoplasma de células de raízes (Oaks & Hirel, 1985) e a Glutamato sintase é localizada nos cloroplastos de folhas (Mifflin & Lea, 1980) e em plastídeos nas raízes (Emes & Fowler, 1979). A partir destes primeiros compostos nitrogenados, glutamina e glutamato, todos os demais compostos orgânicos nitrogenados são produzidos pela ação de transaminases. Desta maneira, o sistema radicular é a principal fonte de nitrogênio para os drenos, sítios de alta demanda.

Por outro lado, quando existe disponibilidade de nitrogênio fixado no meio ambiente, a leguminosa não estabelece a associação simbiótica, passando a absorver o nitrogênio disponível no solo. No caso de nitrato, o mesmo deve ser reduzido a amônia pelas enzimas nitrato redutase e nitrito redutase e, ao final, assimilada pelo sistema GS/GOGAT.

Apesar das duas vias, absorção de nitrogênio fixado e fixação biológica, terem como produto final a amônia, em leguminosas tropicais, especialmente as integrantes da tribo Phaseolae, ocorrem mudanças profundas no metabolismo de

nitrogênio dependendo da fonte primária. Quando a amônia provém da associação simbiótica, os produtos nitrogenados exportados pelo sistema radicular, via xilema, são ureídeos; por outro lado, quando provém da redução assimilatória do nitrato, os produtos exportados são as amidas, principalmente asparagina e glutamina (Schubert, 1986). Estas alterações têm sido utilizadas para avaliar a participação da associação simbiótica no balanço total de nitrogênio no vegetal através da abundância relativa de ureídeos (RUA) na seiva do xilema (Alves et al., 2000; McClure et al., 1980; Sanzalferez & Delcampo, 1994).

Esta mudança preferencial pelo metabolismo de nitrato em detrimento à associação simbiótica é desfavorável à utilização econômica das leguminosas; o ideal seria que fossem insensíveis, ou com pouca sensibilidade. Desta maneira teríamos uma entrada mais constante de nitrogênio no sistema agrícola, uma maior eficiência nas associações culturais entre leguminosas e plantas de outras famílias botânicas e uma redução substancial na necessidade de adubos nitrogenados industriais na agricultura.

Em vários trabalhos recentes identificou-se a existência de plantas com maior tolerância à presença de nitrato (Chalk, 1998; Michaelsen-Yeates et al., 1998), isto é, que não "abandonam" a fixação simbiótica ou o fazem mais lentamente, e que esta característica é genética e pode ser melhorada por vários métodos, sendo o assunto revisado por Rodriguez-Navarro et al. (2000).

O mecanismo metabólico que leva à preferência do nitrato em relação a fixação simbiótica e os mecanismos que proporcionam tolerância do sistema simbiótico à presença de nitrato no meio não são conhecidos, sendo o ponto chave para a obtenção de leguminosas capazes de manterem-se em associação simbiótica efetiva mesmo em ambiente com disponibilidade de nitrato.

2.3 Nitrato: absorção, transporte e redução em plantas superiores

Nitrogênio é, ao lado do dióxido de carbono, o nutriente necessário em maior abundância pelas plantas superiores (Tischner, 2000), sendo entre todos os elementos minerais requeridos pelas plantas, o mais limitante ao crescimento (Williams & Miller, 2001), já que, além de sua concentração no solo ser muito baixa, há perda por lixiviação e consumo microbiano.

Apenas poucas espécies de plantas (em sua maioria leguminosas) podem estabelecer uma relação de simbiose com procariotos que possuem a capacidade de fixar N_2 atmosférico. Por esta razão, as plantas tem desenvolvido mecanismos de resistência ao baixo suprimento de nitrogênio, o que inclui sistemas sensíveis e seletivos de absorção e transporte, bem como a possibilidade de crescimento utilizando diferentes fontes de nitrogênio. Isto envolve o desenvolvimento de um sistema de passos regulatórios na via de assimilação de nitrogênio e sua integração com a assimilação de carbono, de forma a manter um balanço carbono/nitrogênio para um crescimento ótimo (Tischner, 2000). Entre as várias fontes de nitrogênio disponível inclui-se a amônia, a qual é utilizada em condições especiais de solo, como baixa aeração; aminoácidos, consumidos por plantas de áreas onde a nitrificação e mineralização são limitadas pelo clima (regiões árticas); e nitrato, o qual é a forma mais comum de nitrogênio disponível.

Nitrato é absorvido pelas raízes e pode então ser reduzido ou armazenado nos vacúolos, ou translocado para a parte aérea, onde será reduzido ou armazenado nos vacúolos foliares. O primeiro passo da redução de nitrato ocorre no citossol e envolve a ação da enzima nitrato redutase (NR), produzindo nitrito, o qual adentra os plastídeos, cloroplastos em folhas sendo reduzido a amônia por ação da enzima nitrito redutase (NiR), a qual é fixada via GS/GOGAT em aminoácidos, glutamina e glutamato, que por sua vez servem de substrato para reações de transaminação, para a produção de todos os outros aminoácidos necessários à síntese de proteínas. No caso de amônia como fonte de nitrogênio, esta é imediatamente incorporada a aminoácidos nas raízes. Entretanto, tem

sido relatada que concentrações de amônia da ordem de milimolar são encontradas em seiva de xilema em *Brassica napus* (Finnemann & Schjoerring, 1999) e cevada (Mattson & Schjoerring, 1996), em plantas crescendo com amônia como fonte de nitrogênio. Glutamina constitui-se no composto nitrogenado preferencialmente transportado para a parte aérea na maioria das plantas supridas por amônia.

2.3.1 Absorção e transporte de nitrato

O nitrato não se constitui apenas em fonte de suprimento de nitrogênio, mas age também como sinalizador para vários processos celulares (Crawford, 1995). A indução de enzimas envolvidas na assimilação de nitrato é apenas um dos mecanismos estimulados pela presença de nitrato. Tem sido demonstrado que o metabolismo de carboidratos é diretamente afetado pela presença de nitrato o qual altera a relação entre síntese de amido e síntese de sacarose, em benefício deste último, tendo como resultado final a produção de ácidos orgânicos, como oxoglutarato, que estão diretamente envolvidos na assimilação de amônia via GS/GOGAT.

A capacidade de absorção e transporte de nitrato não é equitativamente distribuída ao longo do eixo da raiz e não é idêntica em raízes de idades diferentes (Lazof et al., 1994), sendo que raízes mais velhas absorvem e transportam nitrato mais ativamente, mas possuem atividade reduzida de nitrato redutase, o que é considerado um indicador de aumento na translocação de nitrato destas raízes para a parte aérea (Jiao et al., 2000). De forma geral, em concentrações baixas de suprimento de nitrato a redução ocorre preferencialmente nas raízes, enquanto em altas concentrações o armazenamento e transporte para a parte aérea são auxiliares na manutenção do *status* de nitrogênio da planta (Agrell et al., 1997). A absorção e o transporte do meio externo para a raiz depende da concentração externa de nitrato, considerando que o transporte via xilema depende da demanda da parte aérea e do conteúdo de compostos nitrogenados reduzidos

presentes no floema (Saravitz et al., 1998), sendo que o transporte e assimilação de nitrato é diretamente regulado por variações na concentração de glutamina (Gojon et al., 1998) ou, ainda, pelo incremento no pool de aminoácidos solúveis que não o acúmulo de um aminoácido específico (Barneix & Causin, 1996; Padgett & Leonard, 1996). O mecanismo de transporte de nitrato é sugerido como um co-transporte, via membrana, H^+ /nitrato (Ullrich, 1987), sendo que K^+ é necessário para manter o balanço de cargas no ambiente celular. O incremento na concentração de CO_2 atmosférico também afeta o metabolismo de nitrato, assim como, a temperatura radicular afeta a absorção e o transporte. Outro fator ambiental que afeta a absorção e transporte de nitrato é a presença do poluente NO_2 , o qual adentra a planta via cutícula ou estômato, resultando em um incremento na concentração de nitrato e redução da concentração de compostos nitrogenados reduzidos, sendo então transportado para a raiz via floema, inibindo a absorção e o transporte de nitrato (Tischner et al., 1988).

2.3.2 Transportadores responsáveis pela absorção, transporte e partição de nitrato

Estudos fisiológicos acerca da absorção e transporte de nitrato em raízes indicam que há três sistemas distintos para esta finalidade. Um deles é um sistema de transporte de baixa afinidade (LATS - low-affinity transport system) e os outros dois são sistemas de transporte de alta afinidade (HATS - high-affinity transport systems), definidos de acordo com a concentração externa na qual os transportadores operam. Os HATS são distinguidos por transportadores induzidos pelo tempo de exposição ao substrato (iHATS) ou ativos constitutivamente (cHATS). A cinética de absorção foi obtida pelo transporte de NO_3^- marcado com ^{13}N , e a linha de divisão entre sistemas de alta e baixa afinidade é dependente da espécie mas geralmente HATS começam a atuar

em concentrações da ordem de 0,5 mM. Estima-se que o transporte de nitrato seja ativo, presumivelmente por transporte simporte com prótons.

Assim como as enzimas envolvidas na assimilação de nitrato, a indução da síntese de iHATS por nitrato tem sido demonstrada para muitas espécies diferentes de plantas, sendo que a razão máxima de absorção é observada após várias horas de suprimento de nitrato, com uma subsequente redução na afinidade do transporte (Forde, 2000). Baixas concentrações de nitrito (10 μ M) podem induzir síntese de iHATS (Willians & Miller, 2001), mas concentrações elevadas inibem a síntese destes; tratamentos com nitrato e nitrito geram um rápido incremento em abundância de iHATS e um paralelo incremento na absorção e transporte de nitrato, entretanto, após 6-12 horas, foi observado um subsequente decréscimo na síntese deste transportador, o mesmo acontecendo quando se incrementa o suprimento externo de nitrogênio de 50 a 500 μ M de nitrato ou amônia, o que é atribuído a uma repressão por acúmulo de nitrato (King et al., 1993). Mudanças externas interferem no nível de síntese destes transportadores, sugerindo que a regulação pode ser mediada por alguns outros fatores, incluindo fitocromo, compostos nitrogenados metabolizados, e suprimento de nitrogênio inorgânico (Ono et al., 2000).

2.3.3 Aspectos fisiológicos da enzima Nitrato Redutase (NR)

A enzima nitrato redutase (NR) catalisa o primeiro passo na via de redução de nitrato e está localizada no citossol, entretanto há evidências de que NR pode ser encontrada também na superfície externa da membrana plasmática (Tischner, 2000). A reação leva à formação de nitrito e necessita de NADH/NADPH, ou ambos, como doador de elétrons. Em plantas superiores, a enzima é um dímero, possuindo, entre outros domínios, um cofator MoCo (molibdênio-cobalto), que não está exclusivamente

presente em NR, o qual tem sua síntese afetada por variações no suprimento de nitrogênio e salinidade (Sagi et al., 1997).

A atividade de NR é aceita como o passo limitante da via de assimilação de nitrato, sendo induzida pela presença de nitrato e sendo que, esta indução, requer luz, quando em tecidos verdes. Entretanto, há evidências de que há repressão de síntese quando amônia é utilizada como fonte de suprimento de nitrogênio ou quando há aumento na concentração interna de compostos nitrogenados orgânicos. A presença de nitrato não é pré-requisito absoluto para a síntese de NR, tendo sido demonstrado que pequenas exposições a nitrato são suficientes para sua indução e que o fluxo de nitrogênio ou o *status* de nitrogênio da planta controlam sua expressão (Tischner, 2000).

Nitrato redutase é considerada como sendo um dos melhores exemplos de enzima induzida pelo substrato em plantas superiores, sendo que para a maioria das espécies sua atividade é baixa ou indetectável na ausência de nitrato no meio externo. No grupo das leguminosas, atividade de nitrato redutase constitutiva (não induzida) pode ser mensurada em espécies da família Fabaceae, mas não em espécies das famílias Caesalpiniaceae e Mimosaceae (Andrews et al., 1990). Verificou-se que esta atividade foi pronunciada em folhas, caule e raiz de membros da tribo Loteae e em folhas de todas as espécies, até então estudadas, da tribo Phaseoleae (*Cajanus cajan*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, etc), tanto na forma dependente de NADH como de NADPH como doador de elétrons. Em alguns casos, a atividade de nitrato redutase constitutiva foi detectada em caule, raiz e cotilédones de membros da tribo Phaseoleae porém foi sempre mais baixa que nas folhas da respectiva espécie (Andrews et al., 1990).

A síntese de NR é induzida pela exposição à luz vermelha e este efeito é revertido por luz vermelho extremo e vice-versa, indicando o envolvimento de fitocromo na sua regulação. A indução de NR é inibida pela presença de compostos nitrogenados reduzidos, como amônia, e a elevação na concentração aminoácidos solúveis, como glutamina e asparagina, demonstram-se potenciais inibidores (Sivasankar & Oaks, 1995); mudanças no pool destes aminoácidos, pela utilização de inibidores de GS ou GOGAT evidenciam uma interação complexa destes inibidores com outros pontos da

assimilação de nitrato (Sivasankar et al., 1997). A presença de uma forma ativa de GS e conseqüente aumento na concentração de glutamina, causa repressão de NR.

Luz é reconhecida por estimular rapidamente a atividade de NR, enquanto com a transferência da planta para o escuro decresce rapidamente a atividade. Atualmente, evidências demonstram que a fosforilação está envolvida nesta modulação, sendo que duas ou três quinases dependentes de Ca^{2+} , com certa especificidade para NR, estão envolvidas (Tischner, 2000), de forma que a fosforilação por si só não altera a atividade de NR, mas requer a ligação de uma proteína, de tamanho estimado entre 67-100 kDa. Em folhas de milho, a regulação da atividade de NR a partir de sinais ligados à presença e ausência de luz envolve expressão gênica, síntese de NR e fosforilação/desfosforilação desta.

Em eucariotos, nitrato redutase é conhecida como sendo uma enzima citossólica em organismos autotróficos, entretanto, em *Thalassiosira*, Jones & Morel (1988) sugeriram a presença de uma forma de NR localizada na membrana plasmática, atuando tanto como uma bomba de prótons trans-membrana, como com atividade de NR, aceitando elétrons extracelularmente. Uma função de NR ligada a membrana na assimilação de nitrato foi sugerida pelo uso de inibidores de transportadores de nitrato em raízes de cevada (Ward et al., 1989), detectando então redução de nitrato fora da célula. Uma forma de NR ligada a plasmalema tem sido descrita para raízes de milho, demonstrando a existência de duas isoformas, uma dependente de NADH e outra dependente de NADPH. A presença desta forma de NR foi relatada também em cevada, cenoura e tabaco estimando-se também uma função na destoxificação de excesso de nitrato, sendo que as funções propostas até o momento para esta forma de NR seriam de atuar como um sensor para luz azul, para nitrato e uma proteção ao excesso de nitrato externo (Tischner, 2000).

2.3.4 Interação entre o metabolismo de carbono e nitrogênio e efeitos ambientais na redução de nitrato

Tanto o metabolismo de carbono como o de nitrogênio dependem um do outro e ambas as vias são reguladas uma pela outra. A enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCase) é considerada como um ponto importante entre estas vias pela transferência de oxaloacetato para o ciclo do ácido cítrico, o que permite a remoção de oxoglutarato para a síntese de aminoácidos ou para a síntese de aspartato. O fluxo de carbono pode ser direcionado para a síntese de açúcares ou amido ou para a formação de ácidos orgânicos, que estão envolvidos na formação de aminoácidos. A mudança inversa na atividade de PEPCase e sacarose-fosfato sintetase após a fosforilação, incremento e decréscimo, respectivamente, é provavelmente o primeiro evento na adaptação do metabolismo de carbono em função das mudanças no suprimento de nitrogênio (Champigny, 1995).

A conexão entre ambas as vias tem sido investigada utilizando-se cultivos em dias curtos, plantas com expressão reduzida de NR e adição de açúcares, tendo se observado que a assimilação de nitrato decresce em dias curtos, entretanto o suprimento de nitrogênio se mostra suficiente. Plantas com baixa expressão de NR acumulam altas concentrações de nitrato e apresentam aumento no crescimento de parte aérea, indicando uma mudança na alocação de carbono em função do acúmulo de nitrato (Tischner, 2000). Folhas removidas de tabaco demonstram assimilação de nitrato estimulada por sacarose, sendo os níveis inferiores para glicose, demonstrando um incremento no fluxo de carbono da glicólise para a formação de ácidos orgânicos. Altas concentrações de glutamina inibem a assimilação de nitrato, no entanto esta inibição é parcialmente anulada pelo suprimento simultâneo de sacarose (Morcuende et al., 1998).

O incremento na concentração de CO₂ atmosférico também influi no balanço entre metabolismo de carbono e nitrogênio, sugerindo que o incremento de CO₂ tem efeito estimulatório na assimilação de nitrato (Stitt & Krapp, 1999).

Outros fatores do meio ambiente também modulam a atividade de nitrato redutase. Seca prolongada conduz à inativação e degradação de NR, mas o balanço de carbono/nitrogênio é mantido; por outro lado, o estresse hídrico por períodos curtos causam uma inativação irreversível de NR a qual é anulada pela adição de NADH ou ferricianeto (Tischner, 2000). Quando raízes encontram-se sob baixas temperaturas, a atividade de NR é mais afetada que a absorção e transporte de nitrato e este efeito é acentuado sob condições de frio combinado a acidez de solo; neste caso, o efeito negativo sobre a atividade de NR foi reduzido pelo tratamento das plantas com molibdênio (Tang & Zhang 1999).

2.4 Metabolismo e transporte de aminoácidos

A absorção e transporte de nitrogênio inorgânico é essencial para o crescimento vegetal, sendo que, em sequência, a amônia, produto da redução de nitrato ou da absorção direta do solo, ou ainda derivado da fixação simbiótica de dinitrogênio, é assimilada em aminoácidos, processo este que é ativo, portanto às custas de energia (von Wirén et al., 1998). A assimilação de amônia normalmente ocorre nas raízes, enquanto o sítio de assimilação de nitrato depende da espécie e das condições do meio externo, podendo ocorrer tanto nas raízes como nas folhas, sendo, neste último caso, transportada via xilema.

Após a assimilação, nas folhas, o excesso de aminoácidos pode ser exportado via floema, enquanto nas raízes, este excesso é exportado à parte aérea via xilema. Desta forma, aminoácidos estão presentes tanto no xilema quanto no floema, e podem ser retirados do sistema vascular, adentrando as células adjacentes, dependendo da concentração externa, de modo que sirva de suprimento para ápices, tecidos em desenvolvimento e órgãos reprodutivos. Em muitas plantas, o espectro de aminoácidos é

virtualmente idêntico tanto no floema quanto no xilema, sendo as amidas, glutamina e asparagina, e aminoácidos ácidos, tais como aspartato e glutamato, os principais componentes. Entretanto, a concentração relativa destes aminoácidos é muito diferente: o xilema contém baixas concentrações, enquanto o floema contém altas concentrações (Lohaus et al., 1994; Rosnick-Shimmel, 1985).

O floema, por se tratar de um órgão vivo com citoplasma contínuo entre as células, media o transporte intracelularmente, enquanto via xilema pode se considerar como um transporte extracelular. Por esta razão, durante o carregamento de aminoácidos do xilema para o floema, a composição da seiva de floema pode diferir ao longo do fluxo. Dada a complexidade na composição, e a multiplicidade de tipos celulares, sugere-se que há múltiplos sistemas de transporte de aminoácidos (Bush, 1993), sendo estes, por sua vez, altamente regulados.

Para a caracterização destes sistemas, leveduras tem sido utilizadas para a clonagem e expressão de genes de plantas que codificam transportadores de aminoácidos, sendo também utilizadas como um bom modelo para a investigação de aspectos envolvidos na regulação. Aminoácidos conhecidos são transportados em células de leveduras por algumas permeases, demonstrando especificidade, afinidade e regulação diferentes. Em adição a esta função de transporte, permeases com alta afinidade por certos aminoácidos são importantes também para a retenção destes intracelularmente, os quais tendem a extravasar para fora da célula, em função de um diferencial de concentração (Grenson, 1973).

Em leveduras, a regulação destes sistemas de transporte de aminoácidos ocorre principalmente por controle transcricional dos genes que codificam para estas permeases, bem como por degradação.

A expressão de transportadores de aminoácidos em plantas, em diferentes sistemas artificiais, permite a caracterização de propriedades individuais, tal como especificidade por substrato. Entretanto, sob condições fisiológicas, a composição relativa de fluidos intra e extracelulares determinam quais aminoácidos estão sendo preferencialmente transportados. As propriedades bioquímicas intrínsecas de alguns transportadores, tais como AAPs (que reconhecem uma ampla gama de diferentes

aminoácidos) e CAT (transportadores catiônicos) podem alterar-se em função da relação entre a composição de aminoácidos no citossol e no espaço extracelular, de forma que um transportador que é tido como de alta afinidade para aminoácidos catiônicos, mas de baixa afinidade para glutamato, pode apresentar função preferencial como transportador de glutamato *in vivo*, já que as concentrações de glutamato são muito superiores às concentrações de lisina (Siebke & Weis, 1995).

Além do transporte de aminoácidos, plantas também utilizam oligopeptídeos para uma rápida mobilização de produtos derivados da degradação de proteínas, o que torna importante a caracterização deste tipo de transportadores (Rentsch et al., 1995; Steiner et al., 1994).

Classicamente, é assumido que o primeiro passo enzimático de uma via é o ponto limitante desta, tendo um alto coeficiente de controle. Entretanto, esta definição não leva em conta que, em muitos casos, o primeiro, ou último, passo em uma via metabólica é o transporte do substrato, ou do produto, para dentro ou para fora da célula ou do compartimento subcelular (Fischer et al., 1998). Teoricamente, transportadores estão localizados em posições estratégicas de controle; no entanto, o gene que codifica para a síntese do transportador constitui-se em uma das ferramentas importantes para o redirecionamento ou modificação do fluxo de aminoácidos em plantas transgênicas. A variação em fatores ambientais, com longa duração, pode levar a uma maior especificidade, visando adaptar plantas a ambientes especiais ou alterar a alocação, e por sua vez a quantidade ou qualidade do produto.

2.4.1 Metabolismo de Asparagina

Asparagina é um aminoácido utilizado em muitas plantas como transportador de nitrogênio; em sementes, é sintetizado por ação da enzima asparagina sintetase durante a germinação, quando as reservas de proteína são hidrolisadas, ou em raízes, durante a assimilação de nitrato e a fixação de dinitrogênio (Sieciechowicz et al., 1988b).

Raízes em crescimento ativo, folhas e sementes requerem grande quantidade de nitrogênio reduzido para a síntese de aminoácidos, proteínas, etc. Para suprir esta demanda, nitrogênio adquirido pelas raízes é transportado na forma orgânica, via xilema e floema, ou como nitrato, apenas via xilema. Um grupo restrito de compostos orgânicos é usado como transportador de nitrogênio, possuindo, geralmente, baixa razão carbono/nitrogênio, alta solubilidade, estabilidade e mobilidade em fluidos fisiológicos (Pate, 1980); asparagina preenche estes requisitos, desempenhando importante papel como transportador de nitrogênio.

Asparagina é catabolizada por duas vias diferentes, desaminação e transaminação, liberando nitrogênio para a síntese de proteínas e outros aminoácidos. Asparaginase é a enzima responsável pela reação de desaminação, uma das formas de degradação de asparagina, sendo que em muitas plantas sua atividade é dependente de potássio e está ativa em tecidos que requerem nitrogênio para crescimento, tal como sementes em desenvolvimento, raízes e folhas. Atividade de asparagina aminotransferase, responsável pela reação de transaminação envolvendo asparagina, está presente em vagens em desenvolvimento e folhas maduras, possibilitando também o suprimento de nitrogênio para folhas em crescimento, através da via de fotorrespiração, não sendo muito difundida em outros órgãos.

Em folhas senescentes, nitrogênio não é requerido para o crescimento, sendo sugerido por alguns autores que, nestas folhas, a asparagina presente é utilizada

para suportar parte do metabolismo, sendo então re-exportada para regiões apicais ou frutos em desenvolvimento.

2.4.2 Asparagina como um aminoácido transportador

Uma vez sintetizados fotossinteticamente, esqueletos carbônicos precisam ser transportados para as raízes para a síntese de compostos nitrogenados orgânicos. Asparagina apresenta maior solubilidade que ureídeos, é mais estável que glutamina ou ureídeos, em solução, e apresenta maior solubilidade em pH fisiológico (Sieciechowicz, 1988b); a baixa relação C:N de asparagina (2:1) sugere conservação de carbono.

As amidas, asparagina e glutamina, são os constituintes predominantes da seiva de xilema em muitas plantas, incluindo leguminosas de clima temperado, noduladas ou não noduladas (*Pisum*, *Vicia*, *Lupinus*, *Medicago*, etc) e de leguminosas tropicais não noduladas (*Glycine*, *Phaseolus*, *Vigna*, etc); em leguminosas tropicais noduladas, ureídeos são importantes compostos transportadores de nitrogênio.

Amidas são importantes produtos da degradação de proteínas, sintetizadas durante a hidrólise de proteínas de semente durante a germinação (Dilworth & Dure, 1978), ou da remobilização de proteínas durante senescência foliar, sendo então, subsequente transportadas para folhas ou frutos em desenvolvimento via floema. As amidas podem também ser sintetizadas durante a exposição de plantas a períodos de estresse ambiental, como deficiência nutricional, seca, ou condições de aumento de salinidade (Sieciechowicz et al., 1988b).

Em folhas e sementes de *Pisum*, asparagina é ativamente metabolizada (Atkins et al., 1975), mas em folhas maduras que não requerem nitrogênio para crescimento, asparagina não é realmente metabolizada, mas re-exportada, via floema, para regiões de ativo crescimento, como folhas e sementes em desenvolvimento.

Asparagina é o principal composto nitrogenado detectado no floema de algumas leguminosas, em concentração de até 30 mM (Atkins et al., 1975), sendo que o processo de re-exportação de asparagina destas folhas maduras para o floema envolve transferência do xilema para floema, em folhas maduras com baixo metabolismo de asparagina.

2.4.3 Síntese e degradação de asparagina

A síntese de asparagina ocorre no escuro, sendo que sob luz observa-se um rápido decréscimo nos níveis endógenos desta amida; no entanto, em condições de alta concentração de amônia, asparagina aumentou em condições de luz, indicando que o acúmulo de asparagina é um mecanismo de destoxificação de amônia (Stewart, 1979).

A reação de síntese desta amida é catalisada pela enzima asparagina sintetase, envolvendo a transferência de um grupo amida proveniente de glutamina, dependente de ATP, produzindo asparagina e glutamato, com liberação de AMP e PPi (Rognes, 1975). Diversos estudos relataram que glutamina, e não a amônia, é o doador preferencial de nitrogênio para a ação de asparagina sintetase (Siecichowicz, 1988b).

A degradação de asparagina se dá por duas vias, uma por desaminação e outra por transaminação: a hidrólise de asparagina, catalisada pela enzima asparaginase, produz aspartato e amônia, sendo que a outra via, a transaminação de asparagina (em presença de um oxo-ácido), produz ácido oxosuccinâmico e um outro aminoácido, sendo catalisada pela enzima asparagina aminotransferase.

Em plantas a hidrólise de asparagina por ação da asparaginase, produzindo aspartato e amônia, foi inicialmente detectada em raízes de sementes de cevada em germinação, o que foi relatado por Siecichowicz (1988b), entretanto com baixa atividade. Asparagina transaminase (ou aminotransferase) foi inicialmente

detectada em plantas por Wilson et al. (1954), sendo muitas vezes relatado que esta transaminação ocorre em presença de oxoglutarato (Sieciechowicz, 1988b).

Alta atividade de asparaginase foi observada em frações de nódulos e extratos de raízes, enquanto baixos níveis de atividade ocorrem em folhas. Esta variação pode relacionar o fato de raízes conterem baixos níveis desta amida livre, enquanto em folhas esta é bastante difundida, o que sugere que as variações nos níveis de asparagina podem estar relacionados à distribuição de asparaginase (Sieciechowicz, 1988b).

A ocorrência de atividade de asparaginase em plantas foi parcialmente explicada por Sodek et al. (1980) que demonstrou que asparaginase de sementes em desenvolvimento de *Pisum sativum* apresenta atividade dependente de potássio. A observação de dependência à potássio e a utilização de asparagina por sementes em desenvolvimento foi reportada para algumas espécies, entretanto a ocorrência esporádica da enzima não era completamente entendida (Sieciechowicz, 1988b).

Ativa reação de transaminação de asparagina foi detectada em folhas de *Glycine max*, enquanto atividade de asparaginase neste tecido parece baixa, sugerindo que, em folhas, asparagina é preferencialmente catabolizada por ação de asparagina aminotransferase (Sieciechowicz, 1988b). Após a observação de dependência a potássio de asparaginase, alguns estudos acerca do metabolismo de asparagina em plantas sugerem que a atividade de asparaginase e de asparagina aminotransferase são separadas espacial e temporalmente na planta. Relata-se que a atividade de asparaginase é típica de tecidos em desenvolvimento e ausente em órgãos maduros (Lea et al., 1984), sendo que o inverso aplica-se à ação de asparagina aminotransferase.

2.4.4 Metabolismo de Canavanina

L-Canavanina (L-2-amino-4-(guanidíooxi-butírico ácido) é um análogo de L-arginina que ocorre em cerca de 1500 leguminosas, podendo ser o mais abundante aminoácido livre em plantas (Rosenthal, 1992).

Freqüentemente, é o principal aminoácido não-protéico de sementes, constituindo cerca de 3% da matéria fresca (Van Etten et al., 1967). O acúmulo de canavanina em sementes, que é primariamente utilizado durante a germinação, facilita a translocação dos cotilédones para as partes em crescimento da planta. Sua alta quantidade de nitrogênio em relação a carbono e a liberação de nitrogênio sob forma de amônia justifica a hipótese de que se trata de uma forma de armazenamento de nitrogênio metabolizado (Rosenthal et al., 1988).

Em *Canavalia lineata*, canavanina é acumulada em sementes e está presente como constituinte proeminente de amino nitrogênio em órgãos vegetativos, sendo abundante em tecidos foliares e armazenado em vacúolos foliares de *C. lineata* (Hwang et al, 1996a). Já em cultura de tecidos de *Canavalia lineata*, canavanina foi detectada quase que exclusivamente em folhas, mas não em raízes propagadas *in vitro*, sugerindo que raízes de *C. lineata* são incapazes de biossintetizar canavanina *de novo* (Hwang et al., 1996b).

Em culturas de calos de *Canavalia lineata* mantidos no escuro, canavanina não foi detectada, enquanto calos crescendo sob luz foram capazes de biossintetizar canavanina (Hwang et al., 1996b). A presença de canavanina em calos verdes de *Canavalia ensiformes* já havia sido reportada por Ramirez et al. (1992), sugerindo que o desenvolvimento de cloroplastos é um pré-requisito para a biossíntese de canavanina em calos de *C. lineata* (Hwang et al., 1996b).

Leguminosas que possuem canavanina como reserva podem acumular grandes níveis deste aminoácido não-protéico; por exemplo, canavanina pode constituir até 13% do total de matéria fresca de sementes de certas leguminosas. Para utilização

desta reserva, estas plantas utilizam a enzima arginase para degradar canavanina, formando canalina e amônia; canalina, por ser tóxico, é rapidamente degradada pela enzima canalina redutase, formando homoserina e amônia (Rosenthal, 1992).

Em alfafa (*Medicago sativa* L.), canavanina representa mais de 70% do total solúvel de nitrogênio em sementes, sendo que praticamente toda a canavanina está estocada nos cotilédones. Nos primeiros estádios de desenvolvimento da plântula, o nível do aminoácido não-proteico, canavanina, é reduzido, incrementando os níveis de aminoácidos proteicos, arginina e asparagina em 11 e 35%, respectivamente (Miersch, 1992).

A capacidade de canavanina em sustentar o metabolismo de nitrogênio durante o desenvolvimento de *Canavalia ensiformes* foi estudada por Rosenthal et al. (1988), demonstrando que o padrão de aminoácidos sintetizados *de novo* foi virtualmente idêntico tanto em plantas que utilizam canavanina como reserva, quanto em plantas que utilizam arginina, evidenciando que canavanina, tal qual arginina, é um efetivo metabólito de reserva podendo sustentar o metabolismo de nitrogênio em plantas superiores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico:

Canavalia ensiformes (L.) - Feijão de porco; Fabaceae; Papilionoideae; Phaseoleae; Canavalia.

Características relevantes:

O Feijão de Porco é uma leguminosa tropical amplamente utilizada para adubação verde devido a sua alta eficiência na fixação biológica de nitrogênio. Sua asparaginase é reconhecida pelos anticorpos produzidos contra asparaginase de *Crotalaria* (Aguiar, 1995), uma das características que se pretendia avaliar; possui, ainda, como transportador de nitrogênio um aminoácido não protéico, canavanina, análogo da arginina e com ação anticancerígena (Rosenthal, 1997). Estas características justificaram a escolha da espécie para estudo.

3.2 Cultivo das plantas

Sementes comerciais de *Canavalia ensiformes* (L.) foram fornecidas pela Pirai Sementes (Piracicaba, Estado de São Paulo). As sementes foram germinadas em rolos de papel filtro com base imersa em água, em câmara de germinação.

As plantas foram transferidas para hidroponia, aos 7 dias após germinação, em vasos de 4 litros com aeração forçada por compressor (SCHULZ / 1HP). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, sem controle de fotoperíodo, com radiação nos horários de pico chegando a $2050 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante 100 dias a partir de março de 2001 no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (latitude S 22°. 42'30" longitude W 47°38'01").

Foram estabelecidos três tratamentos distintos: plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de NO_3^- (T1), plantas recebendo solução nutritiva com 7,5 mM de NO_3^- (T2) e plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio (T3) as quais foram inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (Nitral Urbana Laboratórios Ltda). Utilizou-se três repetições por tratamento, por estágio de desenvolvimento a ser avaliado.

3.3 Coleta do Material

As amostras foram coletadas em quatro estádios diferentes: plantas jovens, 7 dias após germinação; plantas em estágio vegetativo (E1); início de florescimento (E2) e início de formação de frutos (E3).

A seiva do xilema foi extraída por exudação, após corte transversal, baseado na técnica descrita por McClure & Israel (1979), coletada e armazenada em tubos eppendorf, em freezer, para posteriores análises.

Os tecidos foram separados (folhas, caule, raiz, etc) e armazenados em freezer para posteriores análises.

3.4 Extração de compostos nitrogenados para quantificação e análise qualitativa de aminoácidos

Através do método descrito por Bielinski & Turner (1966) os compostos nitrogenados foram extraídos para as análises posteriores.

Para 1g de material fresco, acrescentou-se 10 ml de solução MCW (60% ml Metanol, 25% ml Clorofórmio, 15% ml H₂O). O material foi triturado e em seguida centrifugado. Após centrifugação, acrescentou-se 1 ml Clorofórmio + 1,5 ml H₂O, para cada 4 ml sobrenadante. Aguardou-se a separação de fases e utilizou-se a fase hidrossolúvel para análise de compostos nitrogenados (aminoácidos, ureídeos e nitrato).

O precipitado foi ressuspendido em solução NaOH 0,1 M, a uma relação de 10 ml de solução para cada grama de amostra (tecido fresco); após homogeneização, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante utilizado para quantificação de proteínas.

3.5 Quantificação de compostos nitrogenados

3.5.1 Análise Quantitativa de Aminoácidos

Método: Yemm & Cocking (1955)

O seguinte método foi utilizado para quantificar-se as variações na concentração de aminoácidos solúveis totais presentes nos diferentes tecidos e em diferentes estádios de desenvolvimento da leguminosa em questão, em plantas recebendo solução nutritiva com diferentes concentrações de nitrato.

Da fração aquosa coletou-se 1 ml + 500 µl tampão citrato + 200 µl solução ninidrina 5% em metil Glicol + 1 ml solução KCN 0,0002 M. O ensaio foi aquecido a 100° C por 20 minutos e, após, resfriado por 10 minutos em água corrente. Acrescentou-se 1 ml de álcool etílico 60%, seguindo-se leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 570$ nm.

A concentração de aminoácidos solúveis totais foi avaliada utilizando-se curva padrão de solução Leucina.

3.5.2 Análise Quantitativa de Ureídeos (Alantoína e Ácido Alantóico)

Método: Vogels & Van Der Drift (1970)

O seguinte método foi utilizado para quantificar-se as variações na concentração de ureídeos (alantoína e ácido alantóico) presentes nos diferentes tecidos e

em diferentes estádios de desenvolvimento da leguminosa em questão, em plantas recebendo solução nutritiva com diferentes concentrações de nitrato.

Fase 1: Em tubos de ensaio, adicionou-se 1 gota de fenilhidrazina, 250 µl da amostra, 500 µl H₂O destilada e 250 µl de NaOH 0,5 M. O ensaio foi aquecido em Banho-maria a 100° C durante 20 minutos e, em seguida, resfriado à temperatura ambiente. Foi adicionado 250 µl de HCl 0,65 N e novamente aquecido a 100 °C durante 4 minutos. Nesta fase a alantoína é hidrolisada a ácido alantóico. Caso haja omissão desta fase no método, a análise indicará apenas a existência ou não de ácido alantóico.

Fase 2: Após aquecido a 100 °C durante 4 minutos, o ensaio foi resfriado à temperatura ambiente e, então, foi adicionado 250 µl de tampão fosfato pH 7,0 0,4 M e 250 µl de solução de fenilhidrazina 0,33%. Após 5 minutos à temperatura ambiente, incubou-se o ensaio em banho de gelo por 5 minutos.

Acrescentou-se 1,25 ml de HCl concentrado previamente gelado e 250 µl de solução de Ferrocianeto de Potássio (K₃Fe(CN)₆) 1,65%.

Retirou-se do banho de gelo e, após 15 minutos à temperatura ambiente, seguiu-se leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 535$ nm. A concentração de ureídeos foi estimada com base em curva padrão de solução Alantoína.

3.5.3 Análise Quantitativa de Nitrato

Método: Cataldo et al. (1975)

O seguinte método foi utilizado para quantificar-se as variações na concentração de nitrato presente nos diferentes tecidos e em diferentes estádios de

desenvolvimento da leguminosa em questão, em plantas recebendo solução nutritiva com diferentes concentrações de nitrato.

Da fração aquosa coletou-se 0,1 ml + 0,4 ml ácido salicílico 5% em H_2SO_4 (p/v). Após 20 minutos em temperatura ambiente, acrescentou-se 9,5 ml de NaOH 2N, lentamente. Após resfriar a temperatura ambiente, seguiu-se a leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 410$ nm. A concentração de nitrato foi avaliada utilizando-se curva padrão de solução Nitrato.

3.5.4 Análise Quantitativa de Proteínas

Método: Bradford (1976)

O seguinte método foi utilizado para quantificar-se as variações na concentração de proteínas presentes nos diferentes tecidos e em diferentes estádios de desenvolvimento da leguminosa em questão, em plantas recebendo solução nutritiva com diferentes concentrações de nitrato.

Da fração aquosa coletou-se 0,1 ml + 5 ml solução Bradford. Seguiu-se leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 595$ nm. A concentração de proteínas foi avaliada utilizando-se curva padrão de solução BSA.

3.6 Hidrólise de Proteína para Análise de Aminoácidos por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Resolução)

Após quantificação de proteína total, realizou-se uma segunda extração de proteína para hidrólise e posterior análise dos aminoácidos por HPLC.

Os compostos nitrogenados solúveis foram extraídos por MCW (método de Bielinski & Turner, 1966), o homogeneizado foi centrifugado e o sobrenadante descartado. Segundo descrito por Albin et al. (2000), ao precipitado foi adicionado HCl 6 N, a uma relação de 4 ml de solução para cada 10 mg de proteína. Os tubos foram vedados e incubados a 110° C por 24 horas. Após, foi realizada centrifugação para remoção do material particulado e o sobrenadante foi diluído em água Milli-Q a uma concentração de 500 nanomoles de aminoácidos/ml, para posterior análise em HPLC.

3.7 Análise Qualitativa de Aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)

Após quantificação de aminoácidos solúveis totais, as amostras foram liofilizadas para remoção do solvente, ressuspendidas em água Milli-Q a uma concentração de 500 nanomoles de aminoácidos/ml e filtradas em filtro Millipore 0,2 µm.

Os aminoácidos solúveis foram separados e analisados por HPLC de fase reversa como seus derivados de OPA (o-phthaldialdeído), baseado no método descrito por Jarret et al. (1986). Foi utilizada uma coluna Spherisorb ODS-2 C18 e eluição em um gradiente linear formado pelas soluções de metanol 65 % e tampão fosfato pH 7,5

(50 mM de acetato de sódio, 50 mM de fosfato disódico, 1,5 ml de ácido acético, 20 ml de tetraidrofurano, 20 ml de metanol) num fluxo de 0,8 ml/min. O gradiente incrementa a proporção de metanol de 20 % a 28 % entre 0 e 5 min, de 28 % a 58 % entre 5 e 35 min, de 58 % a 75 % entre 35 e 40 min, 75 % a 95 % entre 40 e 56 min, 95 % a 96 % entre 56 a 60 min e 96 % a 100 % entre 60 e 61 min. O fluído da coluna foi monitorado por um detector fluorescente Shimadzu (model RF350) operando em comprimento de onda de excitação de 250 nm e um comprimento de onda de emissão de 480 nm. Os aminoácidos foram derivatizados utilizando-se 20 µl da amostra e 40 µl do reagente OPA. Após 2 minutos foram injetados 20 µl no aparelho de HPLC. Os dados foram expressos em nanomoles de aminoácidos/ml, para seiva de xilema, e nanomoles/g tecido fresco, para as demais amostras (excluindo-se prolina e cisteína por não formar um derivado com OPA).

3.8 Análise da atividade da enzima Nitrato Redutase (NR)

Método: Radin (1974)

O seguinte método foi utilizado para avaliar-se a atividade da Enzima Nitrato Redutase em diferentes tecidos e em diferentes estádios de desenvolvimento da leguminosa em questão, em plantas recebendo solução nutritiva com diferentes concentrações de nitrato.

Coletou-se amostras de tecido fresco (1 g), as quais foram colocadas em tubos contendo 10 ml de Solução tampão fosfato + KNO_3 ; as amostras foram infiltradas a vácuo para que a solução penetrasse os tecidos. Incubou-se no escuro a 30° C, em banho-maria, por 1 hora. Retirou-se, então, 2 ml do sobrenadante, ao qual foi

acrescentado 1 ml de sulfanilamida 1% em HCl + 1 ml de solução naftil etileno 0,02%. Seguiu-se leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 540$ nm. A atividade da enzima Nitrato Redutase foi determinada pela quantidade de nitrito produzida, utilizando-se curva padrão de solução Nitrito.

3.9 Avaliação da presença da enzima Asparaginase (ASNase) por WESTERN BLOT

A metodologia envolveu a separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida, transferência das proteínas por corrente transversal para uma membrana de nitrocelulose, e, sobre esta membrana, procedeu-se as reações imunoquímicas, utilizando-se anticorpos policlonais produzidos por Aguiar (1995) contra asparaginase purificados a partir de *Crotalaria juncea* (asparaginase dependente de Potássio como co-fator). Por este método (WESTERN BLOT, de Towbin. et al., 1979), verificou-se a presença da enzima, ou isoenzimas, em diferentes tecidos, sem necessidade de sua ação catalítica.

3.9.1 Extração da Enzima Asparaginase

No gelo, foi macerado 1 g de material fresco (folha, semente, etc) em 4 ml de tampão para extração (Tris/HCl 50 mM pH 8,0, 10% glicerol + 1 mM DTT*). O extrato foi centrifugado por 30 minutos, a 2 °C (aproximadamente 5000 rpm).

*A enzima Asparaginase possui em seu sítio-ativo o radical sulfeto (-SH) e é necessário a presença, no meio de extração, de um agente redutor, no caso DTT (ditiotreitól).

3.9.2 Separação de Proteínas em Gel de Poliacrilamida

PAGE NATIVA OU NÃO DISSOCIANTE:

Tampões e reagentes:

A) TAMPÃO ELETRODO

Tris 0,25 M, Glycina 1,92 M; pH próximo de 8,3

B) TRIS/HCl pH 8,8 (3,0 M)

C) TRIS/HCl pH 6,8 (0,5 M)

D) ACRILAMIDA/Bis Acrilamida 30%

Preparo do Gel:

GEL DE SEPARAÇÃO (10% Acrilamida final)

10 ml D

7,5 ml B

12,5 ml H₂O

Final: 56 µl TEMED

100 µl Persulfato de NH₄ ou amônio, 10%

GEL DE EMPILHAMENTO

2,5 ml C

1,25 ml D

6,0 ml H₂O

+ 2,5 µl Azul de Bromofenol

Final: 100 µl Persulfato de NH₄ ou amônio, 10%

20 µl TEMED

Aplicou-se alíquotas de 50 µl da amostra e a "corrida" foi realizada a uma corrente de 44-46 mA, para duas placas de mini-gel (sistema Mini-Protean II, Bio-Rad).

3.9.3 Coloração do Gel com Prata

Método: Oackley et al. (1980)

Para controle, após a transferência das proteínas separadas em gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose, o gel foi corado com prata.

O objetivo da coloração foi ajustar o tempo de transferência, ou seja, se houvesse muita proteína após a transferência, seria indicativo de que o tempo de transferência deveria ser aumentado. Por outro lado, foi realizada coloração de um gel após a separação das proteínas mas sem que se procedesse a transferência destas para a membrana de nitrocelulose; desta forma, foi possível certificar-se de que os eventuais resultados negativos obtidos após a revelação do WESTERN BLOT não foram resultado da ausência de proteínas na amostra.

1. O gel foi lavado em Solução 40% MeOH/10% HAc, 3 vezes de 20 minutos;
2. Lavou-se o Gel em Solução 10% MeOH/5% HAc, 2 vezes de 10 minutos;
3. O gel foi imerso em Solução 3,4 mM Dicromato de Potássio/ 32 mM HPO_4 (500 mg Dicromato de Potássio, 100 μ l HNO_3 em 500 ml H_2O) por 10 minutos;
4. Lavou-se em H_2O destilada, por 3 vezes de 10 minutos;
5. O gel foi imerso em Solução 0,1% AgNO_3 por 15 minutos;
6. Lavou-se em H_2O destilada por 2 minutos;
7. O gel foi imerso em Solução 25 g Na_2CO_3 /10 ml Formaldeído 30% em 1 litro de H_2O de 2-5 minutos. A solução deve ser desgaseificada antes para facilitar a solubilização
8. Quando apareceram as bandas, a reação foi interrompida com HAc 5% por 15 minutos.
9. O gel foi armazenado em H_2O destilada para posterior documentação.

OBS: Quando a coloração não pode ser realizada no mesmo dia, o Gel foi armazenado na primeira solução, em ambiente refrigerado.

3.9.4 WESTERN BLOT

Método: Towbin et al. (1979)

As proteínas foram transferidas do Gel de Poliacrilamida para uma Membrana de Nitrocelulose utilizando-se sistema de imunotransferência com 0,8 mA/cm² Gel/Membrana de Nitrocelulose, por 1 hora, utilizando-se Tampão Tris-Glycina 20% MeOH. A membrana foi armazenada em tampão Tris/NaCl pH 7,5, em refrigerador, quando a revelação seria realizada no dia seguinte.

Método Imunoquímico

Por este método, as proteínas separadas no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, sobre a qual procedeu-se as reações imunoquímicas.

Um primeiro anticorpo (no caso contra asparaginase), quando identifica uma seqüência de aminoácidos comuns (determinante antigênico), reage com a proteína, e, ao final do processo, temos resultados positivos (precipitação do produto da reação catalisada pela enzima conjugada com o segundo anticorpo). Na ausência de determinante antigênico identificável pelo anticorpo, não ocorre precipitação. O método identifica a existência de proteína com seqüência de aminoácidos comuns.

Tampões:

TBS pH 7,5 (Tris/NaCl)

TBS pH 9,5 (Tris/NaCl/ $MgCl_2$)

6,05 g Tris

2,9 g NaCl

508 mg $MgCl_2$

TBS pH 7,5/0,1% TWWEN 20

TBS pH 9,5/0,1% TWWEN 20

TRIS-GLYCINA 20% MeOH

APÓS A TRANSFERÊNCIA:

1. A membrana foi imersa em TBS pH 7,5 a 4°C, à noite, quando o processo foi interrompido para que se continuasse no dia seguinte;
2. A membrana foi imersa em TBS pH 7,5/3% leite em pó desnatado (100 ml) por 1 hora;
3. Em seguida, lavou-se em TBS pH 7,5/TWWEN 20, 3 vezes de 10 minutos;
4. A membrana foi imersa em solução de anticorpo de coelho anti-asparaginase diluído (1:500 - 1:1000) em TBS pH 7,5/TWWEN 20 por 2 horas;
5. Lavou-se em TBS pH 7,5/TWWEN 20, 3 vezes de 10 minutos;
6. A membrana foi imersa em solução do anticorpo de cabra anti-coelho conjugado com fosfatase (comercial) diluído em TBS pH 9,5/TWWEN 20 por 1 hora;
7. Lavou-se em TBS pH 9,5/ TWWEN 20, 3 vezes de 10 minutos;
8. Incubou-se em solução com NBT/BCIP/TBS pH 9,5 por alguns minutos, até que aparecessem as bandas.

Após a revelação, a membrana foi armazenada em H₂O destilada, para posterior documentação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente experimento, conduzido em hidroponia, as plantas referentes aos tratamentos T1 e T2 (recebendo concentrações diferentes de nitrato em solução) desenvolveram-se normalmente, atingindo fase reprodutiva; no entanto, as plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio, inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., não apresentaram nodulação satisfatória, prejudicando seu desenvolvimento e não chegando a atingir a fase reprodutiva. Os dados referentes à T3, então, referem-se a plantas em deficiência de nitrogênio e os estádios referentes a início de florescimento (E2) e início de formação de frutos (E3), para este tratamento, correspondem a estágio vegetativo.

4.1 Quantificação de compostos nitrogenados

Tabela 1. Quantificação de compostos nitrogenados em sementes maduras e tecidos de plantas jovens (7 dias após germinação). Os valores são referentes à média de três repetições.

Tecido	Aminoácidos (micromoles/g de tecido fresco)	Proteína (mg/g de tecido fresco)	Nitrato (micromoles/g de tecido fresco)	Alantoína (nanomoles/g de tecido fresco)	Ácido Alantóico (nanomoles/g de tecido fresco)
Semente	48,64	5,70	0	760,81	55,21
Folha	2,15	4,84	0	7,26	33,55
Cotilédone	4,44	24,99	0,71	58,49	61,23
Caule	5,19	3,09	0,20	158,50	62,57
Raiz	2,81	4,09	0	29,13	27,33

Os dados apresentados na Tabela 1 referem-se a semente e plantas jovens, em estágio primário de desenvolvimento, ou seja, indicam apenas remobilização e translocação de reservas. Pelos dados exibidos, sugere-se que a espécie armazena grandes quantidades de aminoácidos e que, aos 7 dias de desenvolvimento, ainda possui grandes reservas a nível cotiledonar, o mesmo não se aplicando aos dados de quantificação de proteína total. Em relação a proteína total, observou-se que a espécie não armazena reservas predominantemente nesta forma, sendo que nas fases iniciais de desenvolvimento, que compreendem o primeiro período após a germinação, a espécie demonstrou sintetizar altas quantidades de proteína, o que pode ser observado pelos dados referentes a cotilédone. Inversamente a estes dados, os resultados obtidos para aminoácidos solúveis totais demonstram que há uma forte redução nestes níveis nas

fases iniciais de desenvolvimento, o que provavelmente está relacionado ao aumento nos níveis de proteína.

Com relação ao nitrato, a espécie não armazena nitrogênio nesta forma, o que era esperado, sendo que os valores observados para cotilédone e caule, próximos a zero, podem estar relacionados ao limite de sensibilidade do método. A espécie demonstra armazenar grande quantidade de nitrogênio metabolizado sob forma de ureídeos, principalmente alantoína, o que pode ser observado pelos dados obtidos para quantificação de ureídeos em sementes, sendo que os valores observados para sementes são superiores aos relatados para tecidos de soja (Atkins et al., 1992) e os observados para tecidos de plantas jovens, aos 7 dias após a germinação, são inferiores aos descritos na literatura para tecidos de plantas (Atkins et al., 1992; Herridge et al., 1996).

Pelos resultados obtidos para os primeiros estádios de desenvolvimento das plantas, observou-se que aos 7 dias após a germinação a translocação de nitrogênio metabolizado sob a forma de ureídeos, especialmente alantoína, é elevada, o que pode ser confirmado pelos dados de concentração em caule. A utilização de ureídeos como metabólito de reserva já havia sido observada em algumas espécies, sendo que Peoples et al. (1991) relatou que ureídeos também são utilizados como compostos de reserva em diversas espécies, tendo sido detectados em seiva de xilema de plantas jovens, em estágio primário de desenvolvimento, sendo portando resultado da translocação de reservas.

Tabela 2. Quantificação de compostos nitrogenados em tecidos de plantas (E1= Estádio vegetativo). Os valores são referentes à média de três repetições. Médias assinaladas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.

Tratamento	Aminoácidos (micromoles/g de tecido fresco)	Proteína (mg/g de tecido fresco)	Nitrato (micromoles/g de tecido fresco)	Alantoína (nanomoles/g de tecido fresco)	Ácido Alantóico (nanomoles/g de tecido fresco)
Folhas					
15 mM NO ₃ ⁻	17,96 A	3,95 A	28,32 A	17,61 AB	22,98 AB
7,5 mM NO ₃ ⁻	15,73 A	0,93 AB	12,87AB	15,73 B	35,02 A
- N	6,11B	0,37B	2,42B	29,34 A	17,69 B
Caule					
15 mM NO ₃ ⁻	22,18 B	0,48 A	20,45 AB	48,83 A	5,76 A
7,5 mM NO ₃ ⁻	41,12 A	0,17 AB	88,04 A	49,49 A	0 B
- N	19,55 B	0,07 B	0,09 B	40,45 A	0 B
Raiz					
15 mM NO ₃ ⁻	27,9 A	0,57 A	31,17 AB	60,73 B	15,02 A
7,5 mM NO ₃ ⁻	31,37 A	0,26 AB	47,28 A	84,34 A	0 B
- N	10,51 B	0,07 B	0,00 B	57,39 B	0 B

Pelos dados apresentados na Tabela 2, observou-se que em estágio vegetativo (E1), os tratamentos T1 e T2 não apresentaram diferenças significativas nas concentrações de aminoácidos totais, mas diferiram significativamente para as concentrações de alantoína e ácido alantóico, em tecidos foliares. As concentrações de alantoína em folhas foram mais expressivas no tratamento T3, ocorrendo o inverso em relação a ácido alantóico. Os valores aqui observados são coerentes com os relatados por Herridge et al. (1996) para *Desmodium rensonii*, em experimento suprido com nitrato.

Observou-se que as variações na concentração de nitrogênio fornecido alterou a concentração de proteína total e nitrato em folhas, sendo que a gradação de nitrato fornecida foi respectivamente igual às concentrações de proteína e nitrato solúvel encontradas em folhas, ou seja, T1 apresentou maiores concentrações, seguido por T2 e

este por T3. Os níveis de nitrato observados para o tratamento T3, próximos a zero, podem estar relacionados ao limite de sensibilidade do método, não indicando provavelmente a presença de nitrato nos tecidos, para este tratamento.

Para o mesmo estágio de desenvolvimento, observou-se diferenças significativas na concentração de nitrato em caule, de forma que T1 apresentou concentração reduzida, em relação a T2; no entanto o inverso foi observado para a concentração de proteína total e ácido alantóico. O mesmo ocorre quando se observa as amostras referentes a tecidos de raiz. As concentrações de ureídeos observadas para os tecidos, no três tratamentos, para o estágio avaliado (E1, estágio vegetativo) foram inferiores aos relatados para tecidos de soja (Atkins et al., 1992) e próximos aos de algumas espécies avaliadas por Herridge et al. (1996) e por Gathumbi et al. (2002).

Em raiz, as concentrações de alantoína apresentaram diferenças entre os tratamentos T1 e T2, sendo que T2 apresentou maiores concentrações que T1, diferindo a 5% de significância. As concentrações totais de ureídeos (alantoína + ácido alantóico) observadas nos tecidos avaliados em estágio vegetativo, para os três tratamentos, foram coerentes com as relatadas por Rodriguez-Navarro et al. (1999) para plantas do gênero *Phaseolus* recebendo solução nutritiva contendo nitrato, e inferiores aos relatados por Peoples et al. (1991) para soja, onde obteve médias da ordem de 400 nanomoles de ureídeos por grama de tecido fresco em plantas não inoculadas, portanto não fixando nitrogênio simbioticamente; os valores aqui obtidos para *Canavalia ensiformes* (L.) variaram entre 40 nanomoles de ureídeos (folhas) a 60-80 nanomoles de ureídeos (raiz).

Tabela 3. Quantificação de compostos nitrogenados em tecidos de plantas (E2= Início de florescimento). Os valores são referentes à média de três repetições. Médias assinadas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.

Tratamento	Aminoácidos (micromoles/g de tecido fresco)	Proteína (mg/g de tecido fresco)	Nitrato (micromoles/g de tecido fresco)	Alantoína (nanomoles/g de tecido fresco)	Ácido Alantóico (nanomoles/g de tecido fresco)
Folhas					
15 mM NO ₃ ⁻	20,14 A	0,73 A	19,02 A	364 A	247,58 A
7,5 mM NO ₃ ⁻	7,62 B	0,36 B	9,23 AB	294,3 A	241,42 A
- N	1,41 B	0,29 B	0,97 B	50,5 B	188,36 B
Caule					
15 mM NO ₃ ⁻	11,96 A	0,53 A	35,75 A	462,1 A	63,62 B
7,5 mM NO ₃ ⁻	7,49 AB	0,48 A	9,57 AB	352,4 A	104,65 A
- N	2,85 B	0,27 B	0,71 B	147,1 B	67,87 B
Raiz					
15 mM NO ₃ ⁻	13,51 A	1,25 A	91,67 A	281,5 A	275,87 A
7,5 mM NO ₃ ⁻	9,84 AB	0,37 B	9,38 AB	267,8 A	229,05 AB
- N	0,71 B	0,21 B	0,87 B	89,6 B	108,13 B

Para as amostras coletadas em início de florescimento (E2, Tabela 3), observou-se alterações a nível quantitativo em relação ao total de aminoácidos solúveis, onde T1 apresentou aumento significativo em relação a T2, em tecidos foliares, sendo que a mesma variação ocorreu em relação à concentração de nitrato no tecido.

Neste estágio houve um incremento na concentração de alantoína e ácido alantóico, em folhas, para os três tratamentos em questão, em relação ao primeiro estágio de desenvolvimento estudado (estádio vegetativo, E1), o que foi relatado por Peoples et al. (1991), onde observou incremento nos níveis de ureídeos em função da mudança no estágio de desenvolvimento, ou seja, com o início de florescimento. Neste experimento T1 e T2 não diferiram significativamente entre si, mas diferiram de T3, quanto aos níveis de alantoína e ácido alantóico observados. O total de ureídeos

(alantoína + ácido alantóico) aqui observados foram similares aos relatados por Atkins et al. (1992) para tecidos de soja, em condições onde as plantas não estavam fixando nitrogênio simbioticamente.

Em relação aos níveis de proteína total, T1 difere dos demais tratamentos, apresentando maior concentração que T2 e T3, no entanto os níveis foram inferiores aos observados em E1, estágio vegetativo.

Em caule, houve variação na concentração de nitrato no tecido, sendo que T1 apresentou uma maior concentração em relação à T2, inversamente ao que foi observado para o primeiro estágio de desenvolvimento. Observou-se uma maior concentração de aminoácidos solúveis totais em T1, em relação a T2, mas os níveis de proteína total não diferiram entre estes dois tratamentos; T3 apresentou os menores níveis de aminoácidos solúveis e de proteína, o que pode estar relacionado à deficiência no suprimento de nitrogênio.

Em raiz, observou-se uma variação significativa na concentração de aminoácidos solúveis totais, entre os três tratamentos avaliados, sendo que T1 apresentou os maiores níveis e T3, os menores. Também foi observado variação nos níveis de proteína, sendo que T1 diferiu dos demais tratamentos e os tratamentos T2 e T3 não diferiram entre si. Em relação a nitrato, foi mantido o padrão observado em relação a folhas e caule, ou seja, T1 apresentou os maiores níveis de nitrato solúvel no tecido, seguido por T2; T3 apresentou baixas concentrações, o que era esperado pelo fato de o tratamento não estar recebendo nitrato em solução, sendo que os níveis de nitrato observados para T3, próximos a zero, podem estar relacionados ao nível de sensibilidade do método utilizado.

Para as análises de ureídeos em raiz, foi observado incremento nos níveis de alantoína e de ácido alantóico, quando comparado ao estágio vegetativo. Em relação a alantoína, T1 e T2 apresentaram as maiores concentrações, não diferindo entre si, mas diferindo de T3; já em relação a ácido alantóico, os incrementos foram mais expressivos, quando comparado às análises realizadas para estágio vegetativo (E1), já que em T1 as concentrações eram baixas, em relação aos níveis observados para alantoína, e os tratamentos T2 e T3 não apresentavam ácido alantóico em caule e raiz. Observou-se que

T1 apresentou os maiores níveis de ácido alantóico, em início de florescimento (E2), seguido por uma pequena diferença em relação a T2, ambos os tratamentos diferindo entre si, e T3 apresentou as menores concentrações deste ureídeo, em raiz. O aumento no nível de ureídeos em função do início do período reprodutivo (neste caso início de florescimento) foi relatado por Peoples et al. (1991), para plantas de soja.

Tabela 4. Quantificação de compostos nitrogenados em tecidos de plantas (E3= Início de formação de frutos). Os valores são referentes à média de três repetições. Médias assinaladas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.

Tratamento	Aminoácidos (micromoles/g de tecido fresco)	Proteína (mg/g de tecido fresco)	Nitrato (micromoles/g de tecido fresco)	Alantoína (nanomoles/g de tecido fresco)	Ácido Alantóico (nanomoles/g de tecido fresco)
Folhas					
15 mM NO ₃ ⁻	9,93 A	0,68 A	3,49 AB	216,5 AB	259,45 B
7,5 mM NO ₃ ⁻	6,97 AB	0,26 AB	5,27 A	159,6 B	553,21 A
- N	2,10 B	0,19 B	0,84 B	394 A	435,82 AB
Caule					
15 mM NO ₃ ⁻	12,96 A	0,36 B	7,45 AB	151,1 B	226,44 A
7,5 mM NO ₃ ⁻	16,68 A	0,30 B	16,42 A	511,3 A	123,88 AB
- N	4,78 B	0,63 A	0,97 B	521,1 A	79,84 B
Raiz					
15 mM NO ₃ ⁻	25,36 A	0,93 A	5,82 A	89,69 A	798,0 A
7,5 mM NO ₃ ⁻	13,42 AB	0,67 AB	5,37 A	95,63 A	662,8 B
- N	4,06 B	0,46 B	0,99 B	11,51 B	706,4 AB

Em início de formação de frutos, E3 (Tabela 4), observou-se que, em folhas, T1 apresentou maior concentração de aminoácidos solúveis que T2, enquanto T3 apresentou as menores concentrações, o mesmo sendo observado em relação a proteína total. Em relação a nitrato, em folhas, T2 apresentou as maiores concentrações, seguido

de T1, sendo que todos diferiram entre si. Os níveis de ureídeos observados não apresentaram diferenças expressivas em relação ao início de florescimento (E2), sendo que T3 apresentou os maiores níveis de alantoína, seguido por T1, e T2 apresentou as menores concentrações, em tecidos foliares; já em relação a ácido alantóico, T2 apresenta as maiores concentrações, seguido por T3, sendo que T1 apresentou os menores níveis. Os valores encontrados para ureídeos em *Canavalia ensiformes* (L.) foram superiores aos relatados por Herridge et al. (1996), para diferentes espécies, e por Atkins et al. (1992) para plantas de soja.

Em caule, não observou-se diferenças significativas nas concentrações de aminoácidos solúveis entre os tratamentos T1 e T2, sendo que T3 apresentou as concentrações mais baixas. Para os níveis de proteína total, a relação foi inversa à observada em folhas, ou seja, T3 apresentou as concentrações mais elevadas, diferindo de T1 e T2, que por sua vez não diferiram entre si.

Em relação aos níveis de nitrato observados em caule, T2 apresentou as maiores concentrações, diferindo significativamente de T1, sendo que T3 apresentou baixas concentrações, o que era esperado pelo fato de o tratamento não receber nitrato em solução, sendo que as concentrações de nitrato observadas para T3, próximas a zero, podem estar relacionadas ao limite de sensibilidade do método, não se referindo, então, à presença de nitrato nos tecidos avaliados, para este tratamento. No que se refere a quantificação de ureídeos, T1 apresentou os menores níveis de alantoína e os maiores de ácidos alantóico; T2 e T3 não diferiram entre si para as concentrações de alantoína, mas T2 apresentou maiores concentrações que T3, para as amostras de caule, sendo os valores superiores aos relatados por Herridge et al. (1996) e por Atkins et al. (1992).

Em raiz, observou-se que T1 apresentou maiores concentrações de aminoácidos solúveis que T2, sendo que T3 apresentou as menores concentrações; o mesmo perfil foi observado em relação a proteína total, sendo que T2 e T3 apresentaram maiores concentrações que as observadas em início de florescimento (E2).

Em relação à concentração de nitrato, os níveis observados foram menores que nos demais tecidos, podendo esta redução estar relacionada à maior atividade de NR neste tecido (ver item 5.4, Tabela 24); a mesma redução observou-se

para os níveis de alantoína neste tecido, sendo que T3 apresentou as menores concentrações e os tratamentos T1 e T2 não diferiram entre si. Para os níveis de ácido alantóico, estes apresentaram-se maiores que nos demais tecidos, sendo que T1 apresentou as maiores concentrações, seguido por T3 e este por T2, de forma que todos os tratamentos diferiram significativamente entre si (5% de significância, teste Tukey).

Pelos dados da Tabela 5 (quantificação de ureídeos em seiva de xilema, estádios reprodutivos, E2 e E3) observou-se que em estágio reprodutivo (E2 e E3, início de florescimento e início de formação de frutos, respectivamente), as maiores concentrações de ureídeos translocados via xilema estão na forma de alantoína, sendo que, em E2, T1 apresentou maiores concentrações deste metabólito que T2, não havendo diferença significativa para os níveis de ácido alantóico. Já em E3, T2 demonstrou os maiores níveis de alantoína, enquanto T1 apresentou concentrações maiores de ácido alantóico, diferindo a 5% de significância (teste Tukey), sendo que os valores obtidos para seiva de xilema em *Canavalia ensiformes* (L.) mostraram-se similares aos observados por Herridge et al. (1996), para *Desmodium rensonii*, e por Peoples et al. (1991) e Atkins et al. (1992), para soja.

Observando-se os dados referentes a ureídeos para os tecidos de plantas, observou-se que em E2 (Tabela 3) as concentrações de alantoína foram maiores em folhas que em raízes, já as concentrações de ácido alantóico foram praticamente iguais nos dois tecidos, podendo esta diferença estar relacionada à concentração exportada via xilema neste estágio de desenvolvimento. A mesma relação se mantém em E3 (Tabela 4), onde observou-se que, em folhas, a concentração de ureídeos sob forma de alantoína foi mais elevada que em raízes, e, em relação a ácido alantóico, as concentrações em raízes foram maiores que nos demais tecidos, o que corrobora os resultados obtidos para seiva de xilema.

Para as análises referentes a seiva de xilema, o tratamento T3 não foi apresentado, uma vez que, por encontrar-se em deficiência nutricional, apresentava pouca parte aérea, o que impossibilitou a coleta de seiva por exudação.

Tabela 5. Quantificação de ureídeos em seiva de xilema (E2 e E3= Estádios reprodutivos). Os valores são referentes à média de três repetições. Médias assinaladas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.

Tratamento	Alantoína (nanomoles/ml seiva)	Ácido Alantóico (nanomoles/ml seiva)
Estádio 2 (Início de florescimento)		
15 mM NO ₃ ⁻	209,77 A	86,98 A
7,5 mM NO ₃ ⁻	119,87 B	70,93 A
Estádio 3 (Início de formação de frutos)		
15 mM NO ₃ ⁻	66,0 B	50,81 A
7,5 mM NO ₃ ⁻	199,6 A	34,83 B

4.2 Análise Qualitativa de Aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)

Tabela 6. Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em sementes maduras.

Aminoácido	Concentração (nmol/g semente)	mol% Aminoácido
Glutamato	160,6	2,74
Glicina	5436,19	92,90
Canavanina	55,54	0,95
Valina	199,29	3,41

Pelos dados da Tabela 6, observou-se que, em sementes maduras de *Canavalia ensiformes* (L.), glicina é o aminoácido preponderante encontrado na forma solúvel, perfazendo cerca de 93% do total de aminoácidos solúveis. Glutamato, canavanina e valina foram também observados, no entanto as concentrações foram insignificantes comparando-se aos resultados encontrados para glicina.

Em espécies do gênero *Lens* (Rozan, 2001), foi observado que em sementes maduras as concentrações de aminoácidos solúveis encontradas são baixas, sendo que asparagina, alanina, aspartato e glutamato são os aminoácidos preponderantes; neste caso glicina esteve presente em níveis da ordem de 5-10% do total de aminoácidos solúveis.

Tabela 7. Análise qualitativa de aminoácidos incorporados a proteínas em sementes maduras. A concentração é expressa em micromoles de aminoácidos/g semente; a % representa mol% de aminoácido.

Aminoácido	Concentração	% Aminoácido
Aspartato + Asparagina	471,85	7,12
Glutamato + Glutamina	1526,28	23,04
Serina	861,42	13,01
Histidina	681,72	10,29
Canavanina	381,89	5,77
Glicina	134,03	2,02
Treonina	504,17	7,61
Arginina	1045,22	15,78
Alanina	386,27	5,83
Metionina	22,72	0,34
Valina	14,37	0,22
Fenilalanina	27,55	0,42
Isoleucina	70,25	1,06
Leucina	27,50	0,42
Lisina	468,18	7,07

Quando analisou-se a composição protéica das sementes, observou-se que os aminoácidos predominantes foram glutamato + glutamina, seguidos por arginina e serina (23, 15,7 e 13%, respectivamente). Histidina e aspartato apresentaram valores significativos (10 e 7%, respectivamente), entretanto os níveis de canavanina observados foram baixos, 5,7%, a comparar com os aminoácidos predominantes, sugerindo que a principal forma de aminonitrogênio armazenada em *Canavalia ensiformes* (L.) possivelmente está na forma de glicina solúvel e glutamato e glutamina, na forma incorporada, e não canavanina.

Aos 7 dias após a germinação (Tabela 8), os níveis de canavanina observados são elevados, demonstrando papel importante na translocação de nitrogênio metabolizado, o que pode ser confirmado pelas altas concentrações presentes em caule, da ordem de 17%. Os níveis de canavanina observados em sementes maduras, 0,95% na forma solúvel e 5,7% na forma incorporada, não justificam as altas concentrações encontradas em plantas jovens (7 dias após a germinação), que chega à ordem de 57% em folhas, o que sugere que há síntese elevada deste aminoácido nos primeiros estádios de desenvolvimento, contradizendo as informações encontradas na literatura. Rosenthal (1992) relatou que os níveis de canavanina armazenados em sementes chega a constituir 13% do total de aminonitrogênio das sementes, em plantas que possuem este aminoácido como forma de reserva. Miersch (1992) sugeriu que em alfafa (*Medicago sativa* L.) canavanina representava 70% do total de nitrogênio solúvel da semente, sendo degradada nos primeiros estádios de desenvolvimento e incrementando os níveis de arginina e asparagina. Para *Canavalia ensiformes* (L.), canavanina demonstrou papel mais importante como composto transportador de nitrogênio, nas fases primárias do desenvolvimento da planta, do que como aminoácido de reserva, conforme sugere os dados apresentados.

Tabela 8. Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em tecidos de plantas jovens (7 dias após germinação). A concentração é expressa em nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa mol% de aminoácido.

	Folhas		Cotilédone		Caule		Raiz	
Aminoácido	Concentração	%	Concentração	%	Concentração	%	Concentração	%
Aspartato	33,83	2,69	403,67	1,45	516,29	1,38	8,97	0,20
Glutamato	40,16	3,19	1354,14	4,85	150,45	0,40	5,73	0,13
Asparagina	426,40	33,86	12391,28	44,43	21616,96	57,96	2228,1	50,24
Serina		-	1500,2	5,38		-	119,36	2,69
Histidina	14,75	1,17	504,22	1,81	356,84	0,96	21,9	0,49
Glutamina	14,98	1,19	838,90	3,01	684,75	1,83	209,33	4,72
Canavanina	724,13	57,51	6420,6	23,02	6288,15	16,86	1024,3	23,10
Glicina		-	896,88	3,21	2760,87	7,40	455,41	10,27
Alanina		-		-		0,45	23,37	0,53
Tirosina		-	118,9	0,42	50,79	0,14		-
Metionina		-	1483,31	5,32	1958,45	5,25	7,79	0,17
Valina	4,84	0,38	481,47	1,72	38,57	0,10	211,24	4,76
Fenilalanina		-	16,88	0,06	895,00	2,40	12,8	0,29
Isoleucina		-	975,42	3,49	1108,46	2,97	106,13	2,39
Leucina		-	502,76	1,80	702,11	1,88		-

Aos 7 dias após a germinação (Tabela 8), observou-se que os aminoácidos solúveis predominantes em todos os tecidos avaliados foram asparagina, entre 33 e 57%, e canavanina, entre 16 e 57%. Em alfafa (*Medicago sativa* L.), nos primeiros estádios de desenvolvimento da planta, o nível de canavanina, que pode chegar a 70% do total de nitrogênio solúvel da semente, é reduzido, incrementando os níveis de arginina e asparagina (Miersch, 1992). Pelos resultados observados para sementes de *Canavalia ensiformes* (L.), canavanina não foi o aminoácido solúvel preponderante, indicando, pelos níveis observados, que glicina, em sementes, é o

aminoácido predominante (Tabela 6), e que, durante a germinação, estes níveis são reduzidos, incrementando no caso os níveis de asparagina e canavanina.

Neste estágio, 7 dias após germinação, os níveis de glicina solúveis decrescem, em relação aos observados em sementes, chegando à ordem de 10% em raiz, tecido onde as concentrações deste aminoácido foram mais elevadas. Em espécies do gênero *Lens*, as concentrações observadas de glicina solúvel em tecidos de plantas em estágio primário de desenvolvimento, entre 4-5 dias após a germinação, atingem a ordem de 2-3% (Rozan, 2001), indicando que em *Canavalia ensiformes* (L.) as concentrações deste aminoácido são superiores às relatadas na literatura para espécies do grupo das leguminosas.

Ainda aos 7 dias após a germinação, observou-se que as concentrações de glutamina também se apresentaram elevadas, quando comparadas aos demais aminoácidos, no entanto as concentrações de asparagina solúvel chegam a ser de 10 a 30 vezes superiores às de glutamina, dependendo do tecido avaliado. Quando observa-se os dados referentes a aminoácidos incorporados, em sementes, (Tabela 7), percebe-se que asparagina não é acumulada em grandes quantidades, o que sugere que esta amida é preferencialmente sintetizada nos primeiros estádios de desenvolvimento.

Em *Linum usitatissimum*, foi observado que os níveis de glutamina e asparagina alteram-se durante o período de germinação, oscilando entre 19, aos 6 dias após a germinação, e 17%, aos 8 dias após a germinação, para glutamina, e entre 3, aos 6 dias após a germinação, e 4,8%, aos 8 dias após a germinação, para asparagina (Wanasundara, 1999). Em *Canavalia ensiformes* (L.) este comportamento parece ser inverso, já que, aos 7 dias após a germinação, os níveis de glutamina apresentaram-se muito inferiores aos observados para asparagina.

Observou-se ainda que, neste estágio, há altas concentrações de metionina e isoleucina em cotilédone, caule e raiz, o que sugere que houve um aumento na via de síntese destes aminoácidos, ambos sintetizados a partir da via metabólica do aspartato, já que, pelos resultados observados para sementes (Tabela 7), estes aminoácidos são armazenados em baixas concentrações, 0,34% (para metionina) e 1,06% (para isoleucina).

Tabela 9. Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em folhas (E1= Estádio vegetativo). A concentração é expressa em nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa mol% de aminoácido.

Aminoácido	T1 (15 mM NO ₃ ⁻)		T2 (7,5 mM NO ₃ ⁻)		T3 (- N)	
	Concentração	%	Concentração	%	Concentração	%
Aspartato	5,38	22,72	12,23	39,04	0,55	15,22
Glutamato	3,47	14,65	5,86	18,72	2,18	60,30
Asparagina	-	-	4,02	12,84	-	-
Arginina	-	-	9,2	29,38	-	-
Tirosina	2,53	10,68	-	-	-	9,85
Metionina	0,83	3,52	-	-	0,51	14,63
Valina	3,02	12,73	-	-	-	-
Fenilalanina	3,76	15,88	-	-	-	-
Isoleucina	3,22	13,60	-	-	-	-
Lisina	1,47	6,22	-	-	0,35	-

Para os dados apresentados na Tabela 9, observou-se que em folhas de plantas em estágio vegetativo (E1), as concentrações de aminoácidos solúveis não são tão marcantes, sendo que houve maior diversidade de aminoácidos em T1, seguido de T2 e T3, o que foi coerente considerando-se a gradação de nitrogênio fornecido aos tratamentos. Neste estágio, a redução de nitrato se dá preferencialmente nas folhas, sendo baixa nas raízes (ver item 5.4, Tabela 25), o que corrobora os resultados obtidos para análise qualitativa de aminoácidos solúveis em folhas, já que para os tratamentos T1 e T2 (plantas recebendo nitrato em solução) as concentrações de glutamato e aspartato foram elevadas e, em T1, não observou-se presença de asparagina solúvel. Asparagina está presente em T2, mas em menores concentrações que glutamato e aspartato. Lohaus et al. (1998) relatou que, quando a redução de nitrato se dá em folhas, os aminoácidos solúveis mais frequentes foram glutamato, glutamina e aspartato, mas

não asparagina, sendo que, em cevada, espinafre e batata, os níveis de asparagina foram pequenos quando a redução de nitrato ocorria em folhas.

Tabela 10. Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em caule (E1= Estádio vegetativo). A concentração é expressa em nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa mol% de aminoácido.

Aminoácido	T1 (15 mM NO ₃ ⁻)		T2 (7,5 mM NO ₃ ⁻)		T3 (- N)	
	Concentração	%	Concentração	%	Concentração	%
Aspartato	14,81	3,29	3,06	1,54	6,01	20,29
Glutamato	1,55	0,34	-	-	0,14	0,46
Asparagina	386,06	85,86	192,42	96,91	16,16	54,61
Histidina	1,28	0,28	-	-	-	-
Glutamina	7,12	1,58	-	-	-	-
Treonina	-	-	-	-	2,01	6,78
Arginina	13,17	2,93	-	-	-	-
Alanina	21,9	4,87	-	-	-	-
Metionina	-	-	-	-	0,41	1,38
Valina	-	-	3,07	1,54	-	-
Fenilalanina	-	-	-	-	4,87	16,47
Isoleucina	3,72	0,83	-	-	-	-

Em caule (Tabela 10), asparagina foi o aminoácido predominante nos três tratamentos avaliados, em plantas em estágio vegetativo (E1), sendo que T1 apresentou baixos níveis de aspartato e glutamato, e concentrações baixas de alanina, no entanto mais elevadas em relação a estes dois últimos. Em milho, foi relatado que o aumento nos níveis de asparagina reduz a concentração de glutamato, alanina e aspartato, podendo atingir 45% da concentração de aminoácidos solúveis, a depender do genótipo (Lohaus et al., 1998). Atkins et al. (1983) relatou que, em *Lupinus albus*,

durante o período de desenvolvimento e crescimento, asparagina chegava a perfazer 89-93% do total de aminoácidos solúveis presentes no tecido, no caso folhas.

O mesmo padrão de aminoácidos solúveis foi observado em raiz (Tabela 11), onde os níveis de asparagina foram elevados em T1 e T2 (61 e 90%, respectivamente), e os de aspartato e glutamato foram reduzidos, não se observando neste tecido a presença de alanina. O tratamento T3 apresentou as menores concentrações de asparagina, sendo os níveis de aspartato e glutamato superiores em relação a esta; o aminoácido predominante em raiz, neste tratamento, foi canavanina, o que pode ser explicado pela alta relação C:N que este aminoácido apresenta, podendo neste caso estar atuando como transportador de nitrogênio em função de economia de carbono (Corbesier et al., 2001), já que este tratamento apresentou pouca parte aérea, resultado da deficiência nutricional a que foi submetido, o que por conseguinte infere em baixa capacidade fotossintética e baixa produção de fotoassimilados.

Tabela 11. Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em raiz (E1= Estádio vegetativo). A concentração é expressa nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa mol% de aminoácido.

Aminoácido	T1 (15 mM NO ₃ ⁻)		T2 (7,5 mM NO ₃ ⁻)		T3 (- N)	
	Concentração	%	Concentração	%	Concentração	%
Aspartato	12,92	8,92	1,93	1,49	5,83	13,44
Glutamato	1,83	1,27	7,21	5,56	2,8	6,45
Asparagina	88,96	61,44	116,79	90,11	1,26	2,90
Serina		-		-	4,8	11,07
Histidina	14,56	10,06		-		-
Canavanina		-		-	28,54	65,74
Treonina		-	3,67	2,83		-
Tirosina	26,51	18,31		-		-
Metionina		-		-	0,17	0,39

Tabela 12. Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em folhas (E2= Início de florescimento). A concentração é expressa em nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa mol% de aminoácido.

Aminoácido	T1 (15 mM NO ₃ ⁻)		T2 (7,5 mM NO ₃ ⁻)		T3 (- N)	
	Concentração	%	Concentração	%	Concentração	%
Aspartato	49,67	1,28	147,6	1,56	12,47	40,73
Glutamato	261,44	6,73	223,91	2,36	8,15	26,62
Asparagina	9,96	0,25	816,5	8,62	1,5	4,90
Serina	232,35	5,98	93,1	0,98	2,04	6,65
Histidina	25,06	0,64	269,73	2,85	1,4	4,59
Glutamina	2262,76	58,24	100,96	1,06	3,73	12,19
Canavanina	620,27	15,96	83,98	0,88	0,8	2,63
Glicina	77,78	2,00	123,77	1,31	-	-
Treonina	34,64	0,89	5,66	0,06	-	-
Arginina	247,71	6,37	939,63	9,93	-	-
Alanina	-	-	30,21	0,32	-	-
Gaba	-	-	1322,28	13,97	-	-
Metionina	24,51	0,63	1,28	0,01	0,51	1,67
Valina	10,78	0,28	126,51	1,34	-	-
Fenilalanina	8,5	0,22	229,57	2,42	-	-
Isoleucina	19,93	0,51	326,69	3,45	-	-
Leucina	-	-	4590,2	48,49	-	-
Lisina	-	-	33,32	0,35	-	-

Quando as plantas entraram em antese (E2), observou-se um incremento na variedade de aminoácidos solúveis em todos os tecidos, sendo que em folhas (Tabela 12), T1 apresentou incremento na concentração de glutamina solúvel, aminoácido que não foi observado em folhas de plantas em estágio vegetativo (E1). Ao lado do acúmulo de glutamina foi observada uma elevação nos níveis de glicina e serina, conforme relatado por Stitt et al. (2002), sendo maiores que os níveis encontrados para asparagina neste tratamento. No tratamento T2, os maiores níveis observados foram de leucina,

perfazendo 48% do total de aminoácidos solúveis. O incremento de glutamina em folhas, 58% do total de aminoácidos solúveis em T1, no início do florescimento sugere que este aminoácido pode atuar iniciando a via que promove a transição para o florescimento (Corbesier et al., 2001).

No tratamento T2 as concentrações de Gaba foram elevadas, da ordem de 14%, o que é coerente com o relatado por Atkins et al. (1983) que, em *Lupinus albus*, observou uma alta concentração de Gaba em tecidos foliares, estando entre os aminoácidos preponderantes neste tecido.

Em termos percentuais, ocorreu decréscimo nos níveis de glutamato e aspartato e aumento nos níveis de histidina, arginina e treonina, em relação ao estágio vegetativo (E1), sugerindo um aumento preferencial nesta via de síntese.

Tabela 13. Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em caule (E2= Início de florescimento). A concentração é expressa em nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa mol% de aminoácido.

Aminoácido	T1 (15 mM NO ₃ ⁻)		T2 (7,5 mM NO ₃ ⁻)		T3 (- N)	
	Concentração	%	Concentração	%	Concentração	%
Aspartato	243,67	5,05	102,36	3,20	58,32	28,40
Glutamato	177,41	3,68	42,18	1,32	16,23	7,90
Asparagina	1907,07	39,53	1994,5	62,31	35,69	17,38
Serina	167,22	3,47	30,06	0,94	8,76	4,27
Histidina	72,67	5,09	57,96	1,81	1,36	0,66
Glutamina	459,96	32,23	5,61	0,17	72,82	35,47
Canavanina	54,89	1,14	16,36	0,51	-	-
Glicina	98,8	2,05	37,55	1,17	-	-
Arginina	222,89	4,62	216,92	6,77	-	-
Alanina	92,53	1,92	175,32	5,48	-	-
Metionina	33,91	0,70	33,64	1,05	8,4	4,09
Valina	20,19	0,42	69,7	2,18	1,94	0,94
Fenilalanina	5,09	0,11	49,88	1,56	0,93	0,45
Isoleucina	-	-	47,07	1,47	0,82	0,40
Leucina	-	-	321,83	10,05	-	-

Em caule (Tabela 13), observou-se um aumento na concentração de asparagina solúvel, para os três tratamentos avaliados, apresentando concentrações pouco superiores às observadas para glutamina, em T1; já em T2, as concentrações de asparagina observadas são acompanhadas de uma redução expressiva nos níveis de glutamina. Por outro lado, histidina e arginina apresentaram-se em níveis elevados, para estes dois tratamentos, mas não treonina, e houve redução nas concentrações de aspartato e glutamato, o que sugere um aumento na via de síntese destes aminoácidos, histidina e arginina.

Já em raiz (Tabela 14), observou-se um incremento nas concentrações de aspartato e glutamato, em relação a caule, para T1; da mesma forma, glutamina apresentou-se em concentrações elevadas, enquanto os níveis de asparagina foram reduzidos (Lohaus et al., 1998). As concentrações de histidina, arginina e treonina mostraram-se maiores em relação à E1, sendo que, para o tratamento T2, arginina apresentou-se em concentrações mais elevadas que em T1 (30 e 7%, respectivamente). Da mesma forma, as concentrações de glicina foram maiores que as presentes em E1, sugerindo aumento na síntese deste aminoácido neste estágio de desenvolvimento. Inversamente a T1, as concentrações de asparagina foram elevadas em T2, em detrimento dos níveis de glutamina (Lohaus et al., 1998).

Tabela 14. Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em raiz (E2= Início de florescimento). A concentração é expressa nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa mol% de aminoácido.

Aminoácido	T1 (15 mM NO ₃ ⁻)		T2 (7,5 mM NO ₃ ⁻)		T3 (- N)	
	Concentração	%	Concentração	%	Concentração	%
Aspartato	976,09	13,99	8,49	2,02	10,83	24,22
Glutamato	383,14	5,49	15,1	3,59	2,79	6,23
Asparagina	148,89	2,13	102,63	24,40	2,79	6,23
Serina	306,06	4,39	-	-	4,86	10,88
Histidina	617,77	8,85	22,51	5,35	19,44	43,49
Glutamina	2921,89	41,88	38,52	9,16	0,44	0,98
Canavanina	-	-	5,88	1,40	0,49	1,11
Glicina	341,03	4,89	16,55	3,93	-	-
Treonina	82,34	1,18	-	-	-	-
Arginina	522,26	7,48	129,48	30,78	-	-
Alanina	422,62	6,06	26,58	6,32	-	-
Tirosina	22,18	0,32	10,67	2,53	-	-
Metionina	106,78	1,53	24,41	5,80	3,05	6,83
Valina	55,27	0,79	12,75	3,03	-	-
Fenilalanina	69,56	0,99	4,43	1,05	-	-
Isoleucina	-	-	2,62	0,62	-	-

Para as amostras de seiva de xilema coletas no início do florescimento (Tabela 15), observou-se que os aminoácidos preferencialmente transportados neste estágio foram leucina, em detrimento de glutamina, que apresenta baixas concentrações na seiva, o que pode estar relacionado à mudança no sítio de redução de nitrato, passando a ter lugar na raiz (ver item 5.4, Tabela 25); o fato de a presença de nitrato atuar inibindo o florescimento pode explicar a alteração no sítio preferencial de redução de nitrato, em função do estágio de desenvolvimento (Corbesier et al., 2001).

Observou-se também uma alta concentração de serina e glicina, este último em maiores concentrações em amostras referentes a T2. A alta concentração de leucina presente foi acompanhada de uma baixa concentração de glutamato, o que pode sugerir aumento preferencial na síntese de leucina (Morcuende et al., 1998). Também foi observada uma baixa concentração de asparagina, sendo as concentrações de alanina, aspartato e mesmo de glutamato, superiores a esta.

Tabela 15. Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em seiva de xilema (E2= Início de florescimento). A concentração é expressa nanomoles de aminoácidos/ml seiva; a % representa mol% de aminoácido.

Aminoácido	T1 (15 mM NO₃⁻)		T2 (7,5 mM NO₃⁻)	
	Concentração	%	Concentração	%
Aspartato	179,10	1,75	59,78	6,35
Glutamato	87,36	0,86	6,48	0,69
Asparagina	49,42	0,48	7,55	0,80
Serina	2380,08	23,30	342,88	36,42
Histidina	262,00	2,57	1,85	0,20
Glutamina	178,23	1,74	37,33	3,97
Glicina	111,96	1,10	198,32	21,06
Treonina	81,69	0,80	2,72	0,29
Arginina	126,43	1,24	47,17	5,01
Alanina	309,80	3,03	11,99	1,27
Tirosina	-	-	8,53	0,91
Metionina	118,88	1,16	20,42	2,17
Valina	880,82	8,62	-	-
Fenilalanina	-	-	6,00	0,64
Isoleucina	60,91	0,60	10,11	1,07
Leucina	4543,60	44,48	148,81	15,81
Lisina	843,86	8,26	31,57	3,35

Pelos resultados obtidos para o início de formação de frutos (E3), em folhas (Tabela 16), observou-se que os níveis de serina elevaram-se, sendo que a concentração de glicina foi reduzida, em relação a E2. Da mesma forma, as concentrações de aspartato foram elevadas, para os três tratamentos avaliados, em detrimento de asparagina, que não foi observada neste estágio (Lohaus et al., 1998). As concentrações de arginina mostraram-se superiores, mas apenas T1 apresentou elevação nos níveis de treonina.

Tabela 16. Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em folhas (E3= Início de formação de frutos). A concentração é expressa nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa mol% de aminoácido.

Aminoácido	T1 (15 mM NO ₃ ⁻)		T2 (7,5 mM NO ₃ ⁻)		T3 (- N)	
	Concentração	%	Concentração	%	Concentração	%
Aspartato	105,39	10,17	135,96	38,35	30,45	24,99
Glutamato	21,16	2,04	-	-	14,66	12,03
Serina	214,57	20,71	99,10	27,95	15,83	12,99
Histidina	-	-	-	-	0,83	0,68
Glutamina	6,04	0,58	32,75	9,24	-	-
Canavanina	-	-	-	-	0,33	0,27
Glicina	5,51	0,53	2,55	0,72	2,02	1,66
Treonina	384,53	33,64	-	-	-	-
Arginina	312,40	30,15	36,51	10,30	43,74	35,90
Alanina	13,27	1,28	24,60	6,94	-	-
Valina	9,20	0,89	17,74	5,00	-	-
Fenilalanina	-	-	5,33	1,50	-	-
Lisina	-	-	-	-	13,97	11,47

Já em caule (Tabela 17), a redução na concentração de asparagina e aumento na concentração de serina, em T1 e T2, e glicina, apenas em T2, demonstrou

aumento na síntese destes aminoácidos durante este estágio. Os níveis de glutamina também não mostraram-se elevados, sendo em T1 a concentração de lisina foi elevada, mas não de metionina e isoleucina; metionina apresentou maiores concentrações em T2, bem como isoleucina, o que demonstra aumento nesta via de síntese para este estágio de desenvolvimento.

Tabela 17. Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em caule (E3= Início de formação de frutos). A concentração é expressa nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa mol% de aminoácido.

Aminoácido	T1 (15 mM NO ₃ ⁻)		T2 (7,5 mM NO ₃ ⁻)		T3 (- N)	
	Concentração	%	Concentração	%	Concentração	%
Aspartato	44,20	2,86	901,59	3,91	59,42	25,21
Glutamato	38,04	2,46	835,62	3,63	77,31	32,79
Asparagina	-	-	73,09	0,32	28,59	12,13
Serina	528,61	34,19	10482,09	45,49	47,62	20,20
Histidina	1,69	0,11	243,25	1,06	2,68	1,14
Glutamina	9,16	0,59	572,19	2,48	-	-
Canavanina	-	-	94,34	0,41	-	-
Glicina	9,10	0,59	2783,26	12,08	5,28	2,24
Treonina	203,96	13,19	21,45	0,09	-	-
Arginina	-	-	2450,20	10,63	4,36	1,85
Alanina	1,67	0,11	111,94	0,49	-	-
Metionina	20,65	1,34	713,82	3,10	3,53	1,50
Valina	62,97	4,07	110,85	0,48	3,68	1,56
Fenilalanina	17,85	1,15	-	-	-	-
Isoleucina	3,13	0,20	523,12	2,27	3,27	1,39
Leucina	97,86	6,33	3125,10	13,56	-	-
Lisina	507,41	32,81	-	-	-	-

Em raiz (Tabela 18), as alterações mais expressivas mostraram-se em T2, que apresentou concentração elevada de leucina, com redução nos níveis de glutamato, e aumento nos níveis de serina, mantendo os mesmos níveis de glicina, em detrimento aos níveis de asparagina, que se mostraram reduzidos, sugerindo aumento nas vias de síntese destes aminoácidos, leucina, serina e glicina (Morcuende et al., 1998; Stitt et al., 2002).

Tabela 18. Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em raiz (E3= Início de formação de frutos). A concentração é expressa nanomoles de aminoácidos/g tecido fresco; a % representa mol% de aminoácido.

Aminoácido	T1 (15 mM NO ₃ ⁻)		T2 (7,5 mM NO ₃ ⁻)		T3 (- N)	
	Concentração	%	Concentração	%	Concentração	%
Aspartato	210,36	3,02	132,69	4,63	75,79	30,88
Glutamato	290,45	4,17	110,81	3,87	39,89	16,25
Asparagina	-	-	22,01	0,77	17,01	6,93
Serina	-	-	591,97	20,67	54,45	22,18
Histidina	-	-	159,74	5,58	1,58	0,64
Glutamina	179,49	2,58	74,83	2,61	-	-
Canavanina	-	-	5,17	0,18	-	-
Glicina	-	-	65,70	2,29	1,72	0,70
Treonina	-	-	10,23	0,36	-	-
Arginina	-	-	655,53	22,89	15,41	6,28
Alanina	153,52	2,21	31,42	1,10	-	-
Gaba	5856,23	84,18	-	-	-	-
Tirosina	-	-	-	-	39,61	16,14
Metionina	-	-	238,98	8,35	-	-
Valina	49,49	0,71	47,75	1,67	-	-
Fenilalanina	40,97	0,59	-	-	-	-
Isoleucina	15,45	0,22	50,58	1,77	-	-
Leucina	161,05	0,31	666,07	23,26	-	-

Para as amostras de seiva de xilema coletadas no início de formação de frutos (E3, Tabela 19), observou-se que T1 apresentou elevadas concentrações de serina e glicina, enquanto as concentrações de asparagina foram baixas (Stitt et al., 2002); da mesma forma, a concentração de glutamato observada foi reduzida, enquanto aspartato apresentou-se em maiores níveis. Em T2, apenas glicina apresentou-se em altas concentrações, 37%, sendo que as concentrações de serina foram inferiores às observadas para T1; asparagina não esteve presente, o que evidencia o fato de asparagina atuar como doador preferencial de grupo amina na síntese de aminoácidos formados no ciclo fotorrespiratório, serina e glicina (Murray et al., 1987). As concentrações de glutamato foram baixas tanto em T1 como em T2, enquanto T2 apresentou altas concentrações de alanina, valina e fenilalanina, este último também elevado em T1, demonstrando que neste estágio ocorreu aumento na síntese destes aminoácidos.

Para as análises referentes a seiva de xilema, o tratamento T3 não foi apresentado, já que tratava-se de plantas em deficiência nutricional, com pouca parte aérea, o que impossibilitou a coleta de seiva por exudação.

Tabela 19. Análise qualitativa de aminoácidos solúveis em seiva de xilema (E3= Início de formação de frutos). A concentração é expressa nanomoles de aminoácidos/ml seiva; a % representa mol% de aminoácido.

Aminoácido	T1 (15 mM NO ₃ ⁻)		T2 (7,5 mM NO ₃ ⁻)	
	Concentração	%	Concentração	%
Aspartato	265,14	15,97	17,13	2,92
Glutamato	24,53	1,48	6,71	1,14
Asparagina	74,14	4,47	-	-
Serina	860,80	51,84	1,69	0,29
Histidina	7,96	0,48	7,96	1,36
Glutamina	-	-	36,78	6,27
Canavanina	8,78	0,53	-	-
Glicina	182,54	10,99	217,56	37,07
Treonina	28,74	1,73	15,50	2,64
Arginina	-	-	1,25	0,21
Alanina	24,25	1,46	75,28	12,83
Tirosina	31,77	1,91	24,92	4,25
Metionina	44,45	2,68	47,02	8,01
Valina	10,38	0,63	66,19	11,28
Fenilalanina	51,29	3,09	45,47	7,75
Isoleucina	45,60	2,75	23,40	3,99

4.3 Avaliação de Massa fresca e Massa seca

Tabela 20. Massa fresca e massa seca de tecidos de plantas jovens (7 dias após germinação). Os valores referem-se à média de três repetições.

Tecido	Massa Fresca (g)	Massa Seca (g)
Folhas	0,21	0,03
Cotilédones	2,25	0,67
Caule	1,52	0,13
Raiz	0,70	0,03

Pelos dados da Tabela 20, observou-se que, aos 7 dias após a germinação, a planta ainda apresentava grande massa a nível cotiledonar, conforme foi discutido nos itens anteriores. Em caule e raiz a massa fresca era mais expressiva, enquanto a massa foliar era baixa. Em termos de massa seca, observou-se que as plantas apresentavam grande teor de água, já que a massa seca cotiledonar apresentou-se em torno de 3 a 4 vezes a apresentada em termos de massa fresca e a massa seca das folhas e da raiz, que em termos de massa fresca apresentava grande diferença, apresentou-se igual.

Pelos dados apresentados nas tabelas a seguir, observou-se um incremento nos valores de massa fresca e massa seca em plantas recebendo nitrogênio fixado, em relação às plantas que apresentavam deficiência de nitrogênio, o que era esperado. Em estágio vegetativo (E1, Tabela 21), não houve diferenças significativas entre T1 e T2 quando observado a massa fresca de folhas e raiz, já T1 apresentou aumento significativo em termos de massa fresca de caule. Já quando observou-se os dados referentes a massa seca, T1 e T2 não apresentaram nenhuma diferença

significativa, para os três tecidos avaliados, enquanto ambos os tratamentos diferiram significativamente de T3.

Tabela 21. Massa fresca e massa seca de tecidos de plantas (E1= Estádio vegetativo). Os valores são referentes à média de três repetições. Médias assinaladas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.

Tratamento	Folhas	Caule	Raiz
Massa Fresca (g)			
15 mM NO ₃ ⁻	38,40 A	16,01 A	26,61 A
7,5 mM NO ₃ ⁻	32,41 A	14,20 AB	17,67 A
- N	8,39 A	4,09 B	10,17 A
Massa Seca (g)			
15 mM NO ₃ ⁻	5,11 A	3,05 A	1,95 A
7,5 mM NO ₃ ⁻	4,29 A	2,61 A	1,39 A
-N	1,26 B	0,86 B	0,82 B

Para os dados referentes a início de florescimento (E2), observou-se que em termos de massa fresca (Tabela 22), os tratamentos T1 e T2 não diferem entre si, mas diferem de T3, o que era esperado por se tratar de plantas em deficiência de nitrogênio. Já quando observa-se os dados referentes a massa seca, observou-se que T1 apresentou um incremento em tecidos de raiz, quando comparado a T2, sendo que T3 ainda difere significativamente dos outros tratamentos para os três tecidos avaliados.

Tabela 22. Massa fresca e massa seca de tecidos de plantas (E2= Início de florescimento). Os valores são referentes à média de três repetições. Médias assinaladas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.

Tratamento	Folhas	Caule	Raiz
Massa Fresca (g)			
15 mM NO ₃ ⁻	132,75 A	43,64 A	95,85 A
7,5 mM NO ₃ ⁻	126,19 A	42,93 A	87,47 A
- N	7,77 B	6,13 B	14,13 B
Massa Seca (g)			
15 mM NO ₃ ⁻	23,3 A	11,13 A	8,22 A
7,5 mM NO ₃ ⁻	24,17 A	11,52 A	7,02 AB
-N	1,63 B	1,62 B	1,27 B

Para os dados referentes ao início de formação de frutos (E3, Tabela 23), observou-se que, para massa fresca, T1 e T2 não diferiram entre si em massa fresca de folhas e raiz, diferindo de T3; já em caule, T2 apresentou diferença significativa em relação a T1, sendo que T3 novamente apresenta menor massa que os demais tratamentos. Quando se observou os dados referentes a massa seca, percebeu-se que T1 e T2 não diferiram entre si para massa de folhas e caule, diferindo ambos de T3; enquanto em raiz, T1 apresentou diferença significativa em relação a T2, e ambos diferiram de T3.

Tabela 23. Massa fresca e massa seca de tecidos de plantas (E3= Início de formação de frutos). Os valores são referentes à média de três repetições. Médias assinaladas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.

Tratamento	Folhas	Caule	Raiz
Massa Fresca (g)			
15 mM NO ₃ ⁻	183,78 A	76,17 B	115,11 A
7,5 mM NO ₃ ⁻	181,79 A	141,62 A	101,70 A
- N	10,95 B	7,74 C	20,58 B
Massa Seca (g)			
15 mM NO ₃ ⁻	14,40 A	15,19 A	5,93 A
7,5 mM NO ₃ ⁻	16,53 A	17,18 A	4,20 AB
-N	1,08 B	1,18 B	1,15 B

4.4 Análise da atividade da enzima Redutase de Nitrato (NR)

Tabela 24: Atividade de NR em tecidos de plântulas (7 dias após germinação). Os valores são referentes à média de três repetições.

Tecido	Atividade ($\mu\text{mol NO}_2^-$ /h.gmf ⁻¹)
Folha	6,01
Cotilédone	4,42
Caule	2,60
Raiz	4,01

Tabela 25. Atividade de NR em tecidos de plantas em três diferentes estádios de desenvolvimento. Os valores são referentes à média de três repetições. Médias assinaladas com letras diferentes entre tratamentos são diferentes a nível de 5% pelo teste de Tukey.

Tratamento	Atividade ($\mu\text{mol NO}_2^-/\text{h.gmf}^{-1}$)		
Estádio 1 (E1= Estádio vegetativo)			
	Folhas cotiledonares	Folhas permanentes	Raiz
15 mM NO_3^-	99,28 A	91,84 A	19,99 A
7,5 mM NO_3^-	96,5 A	46,41 AB	28,06 A
- N	6,02 B	5,26 B	6,36 A
Estádio 2 (E2= Início de florescimento)			
	Folhas	Caule	Raiz
15 mM NO_3^-	10,49 A	5,42 A	37,22 A
7,5 mM NO_3^-	5,55 AB	4,01 A	24,92 A
- N	4,93 B	3,77 A	3,32 A
Estádio 3 (E3= Início de formação de frutos)			
15 mM NO_3^-	7,75 A	5,24 A	62,58 A
7,5 mM NO_3^-	10,21 A	6,55 A	23,65 A
- N	6,98 A	6,12 A	8,02 A

A redução de nitrato a amônia é um processo energeticamente caro e deve ser coordenada com o fluxo de carbono assimilado de forma a manter taxas ótimas de crescimento (Tischner, 2000). Teoricamente, o local mais adequado para a redução de nitrato são os tecidos fotossintetizantes. O nitrato sendo reduzido a nitrito com um gasto de 2 elétrons é transferido para os cloroplastos e reduzido a amônia, com gasto de mais 6

elétrons produzidos diretamente da fase fotoquímica. Entretanto a redução de nitrato por tecidos não fotossintetizantes é amplamente relatada na literatura (Oliver et al., 1983; Wallace, 1986), de forma que não há explicação das razões pelas quais o nitrato é reduzido em tecidos não fotossintetizantes onde necessita obter elétrons a partir da fosforilação oxidativa.

Para os dados da Tabela 25, observou-se que no primeiro estágio de desenvolvimento estudado (E1), ainda em fase vegetativa, as plantas apresentavam atividade de NR elevada em folhas cotiledonares, tanto para T1 como para T2, no entanto a atividade de NR foi reduzida em folhas permanentes em T2, quando comparado a T1 e em relação à atividade em folhas cotiledonares, apresentando diferença significativa a 5%. Em raízes, ambos os tratamentos apresentaram atividade reduzida, quando comparada com o observado em folhas, conforme relatado por Silveira et al. (2001) para espécies de *Phaseolus*.

Comparando-se estes resultados aos níveis de aminoácidos solúveis observados nestes tecidos (Tabelas 9, 10 e 11), observou-se que, em estágio vegetativo, as folhas apresentavam uma concentração de aminoácidos solúveis totais de 17,9 μ moles/g de tecido fresco (ver Tabela 2); considerando-se a densidade do tecido próxima à da água, a partir dos dados de composição percentual (ver Tabela 9) observou-se que o aminoácido predominante em folhas foi o aspartato (22,72% do total) com 4,1 mM, em caule e raiz (Tabelas 10 e 11, respectivamente) foi asparagina, com 8,7 mM (85,86% do total) e 6,1 mM (61,44% do total), respectivamente.

Quando as plantas iniciaram o estágio reprodutivo (E2, início de florescimento), aparentemente o sítio preferencial de redução de nitrato é invertido, ou seja, tanto em T1 como em T2 a atividade de NR em raízes foi aumentada, enquanto houve um decréscimo na atividade em folhas, bem como uma baixa atividade em caule. No entanto, quando comparado T1 e T2, o primeiro apresenta uma atividade mais elevada em folhas do que o segundo, o que pode estar relacionado à concentração de nitrato fornecida. Paralelamente, ocorrem alterações profundas no padrão de aminoácidos solúveis presentes nos tecidos (ver Tabelas 12, 13 e 14); em folhas o aminoácido mais abundante passa a ser glutamina, 12,9 mM (58,2% do total), em caule

é histidina 5,4 mM (44,9%) e raiz a glutamina 5,4 mM (41,88% do total), entretanto os níveis de glutamina presentes em folhas é superior àqueles presentes em raízes.

Em início de formação de frutos (E3), as plantas mantêm uma atividade mais alta de NR em raízes, sendo que T1 apresentou uma atividade mais elevada que T2, no entanto esta diferença não foi evidente a 5% de significância. As variações que se observava entre os dois tratamentos para atividade em folhas não são observadas neste estágio de desenvolvimento. Observando-se os resultados referentes a análise de aminoácidos, percebe-se nova alteração na composição de aminoácidos solúveis (ver Tabelas 16, 17 e 18); em folhas o aminoácido predominante é treonina 9,4 mM (33,6 % do total), em caule a serina 4,6 mM (34,2% do total) e em raiz o Gaba com 21,3 mM (84,2% do total).

Os relatos de inibição da redutase de nitrato por produtos finais da via de assimilação correlacionam os níveis de asparagina e glutamina com a maior ou menor redução de nitrato em determinado tecido. Ferrario-Méry et al. (2001) constataram forte inibição na transcrição do gene para NR em discos de folhas de *Nicotiana tabacum* tratados com 100 mM de Glutamina; quando observa-se a composição percentual de aminoácidos solúveis presentes em folhas, em *Canavalia ensiformes* (L.), no início do florescimento (Tabela 12), percebe-se que os níveis de glutamina elevam-se significativamente em relação ao estágio vegetativo (Tabela 9), sugerindo que a alteração no sítio de redução de nitrato está estritamente relacionada aos níveis endógenos de glutamina, no tecido em questão.

Para os três estádios de desenvolvimento estudados, T3 (plantas recebendo solução nutritiva omissa em nitrato) apresentou baixa atividade de NR em todos os tecidos avaliados (Tabela 25), o que evidencia a presença de uma forma de NR constitutiva não dependente de nitrato, conforme observado por Andrews et al. (1990), e citado por Silveira et al. (2001). A possibilidade de nitrato agir como agente contaminante, durante o cultivo das plantas testadas na fase adulta, é eliminada com o teste de atividade de nitrato redutase em plantas jovens, 7 dias após a germinação, já que durante o processo de germinação não foi fornecido qualquer tipo de nutriente, sendo as sementes germinadas em papel filtro embebido em água destilada.

Comparando-se os resultados obtidos em plantas adultas recebendo solução nutritiva omissa em nitrato (T3) aos dados referentes a atividade em tecidos de plantas jovens, 7 dias após a germinação, (Tabela 24), percebe-se que a atividade observada é da mesma ordem da observada em tecidos de plantas referentes a T3, para todos os tecidos avaliados, reforçando a evidência de uma forma constitutiva da enzima.

4.5 Avaliação da presença da enzima Asparaginase (ASNase) por WESTERN BLOT

Figura 1- Eletroforese em gel nativo (coloração com prata) de amostras (proteína total) de tecidos de plantas jovens(7 dias após a germinação). 1 e 5, raiz; 2 e 6, caule; 3 e 7, cotilédone; 4 e 8, folha; J, semente imatura de *Crotalaria juncea* (padrão).

Figura 2 - WESTERN BLOT de amostras de tecidos de plantas jovens (7 dias após a germinação). 1 e 5, raiz; 2 e 6, caule; 3 e 7, cotilédone; 4 e 8, folha; J, semente imatura de *Crotalaria juncea* (padrão). A seta indica o local da reação.

Dos compostos nitrogenados predominantemente translocados, glutamina, asparagina e ureídeos, a asparagina é comumente o composto preponderante de suprimento de nitrogênio para os tecidos em crescimento. Ao chegar ao dreno, asparagina é catabolizada em aspartato e amônia pela enzima ASNase e a amônia é incorporada em compostos orgânicos através do sistema enzimático GS/GOGAT. Desta maneira, a enzima ASNase desempenha um papel chave no metabolismo de síntese de compostos nitrogenados (Aguilar, 1995).

A presença da enzima ASNase reflete os sítios preferências de degradação de asparagina; por WESTERN BLOT as proteínas separadas em gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, sobre a qual procederam-se as reações imunoquímicas. O primeiro anticorpo, contra ASNase, identificando uma sequência de aminoácidos comuns (determinante antigênico), reage com a proteína, e, ao final do processo, revela-se resultado positivo (precipitação do produto da reação catalisada pela enzima conjugada com o segundo anticorpo). Não havendo determinante antigênico identificável pelo anticorpo, não ocorrerá precipitação (resultado negativo).

Pelo método, buscou-se padronizar as concentrações das amostras, de forma que não houvessem grandes diferenças na quantidade de proteína aplicada no gel para eletroforese, o que pode ser observado na Figura 1, onde confirma-se que todas as amostras apresentavam altas concentrações de proteínas, o que infere que as diferenças nos resultados obtidos por WESTERN BLOT restringem-se à quantidade da enzima ASNase presente ou não na amostra.

Na Figura 2, observou-se que a reação foi positiva para todos os tecidos avaliados, isto é, a enzima ASNase está presente em todos os tecidos de plantas em estágio primário de desenvolvimento, aos 7 dias de desenvolvimento, o que é coerente com os dados observados de análise qualitativa de aminoácidos (Tabela 7), onde houve altas concentrações de asparagina solúvel em todos os tecidos, indicando que a degradação desta amida ocorria em todos os tecidos. Atkins et al. (1983) relatou que, durante o crescimento, a atividade de ASNase é superior à de asparagina-aminotransferase, em folhas de soja, o que infere que a presença da enzima em tecidos de plantas jovens de *Canavalia ensiformes* (L.), constatada por WESTERN BLOT, pode ser diretamente correlacionada à degradação de asparagina presente no tecido por ação da enzima ASNase.

Streeter (1977) relatou a atividade de ASNase em embriões de *Lupinus alba*, o que infere que o catabolismo de asparagina em tecidos jovens se dá preferencialmente por atividade de ASNase, corroborando a hipótese de que a degradação de asparagina em tecidos de plantas jovens de *Canavalia ensiformes* (L.)

seja realizada pela enzima ASNase. A atividade de ASNase também foi relatada para tecidos verdes de *Lupinus alba*, por Streeter (1977), o que corrobora a hipótese de que a presença de ASNase em folhas e caule de plantas jovens de *Canavalia ensiformes* (L.) seja diretamente relacionada à presença de atividade catalítica.

Figura 3 - Eletroforese em gel nativo (coloração com prata) de amostras (proteína total) de tecidos de plantas (E1= Estádio vegetativo). 1, 2 e 3, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com com 7,5 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9, raiz, caule e folha de plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; J, semente imatura de *Crotalaria juncea* (padrão).

Através do método utilizado, as concentrações das amostras de proteína foram padronizadas, de forma que houvesse uniformidade nas quantidades de proteína aplicadas no gel para eletroforese, o que pode ser observado pela Figura 3, onde confirma-se que todas as amostras apresentavam altas concentrações de proteínas, inferindo que as diferenças nos resultados obtidos por WESTERN BLOT restringem-se à quantidade da enzima ASNase presente ou não na amostra.

Na Figura 4, observou-se reação positiva para as amostras 1, 3 (raiz e folha de plantas referentes a T1), 4, 6 (raiz e folha de plantas referentes a T2), 7, 8 e 9 (raiz, caule e folha de plantas referentes a T3), indicando a presença da enzima nestes tecidos, quando as plantas estão em estágio vegetativo (E1). Comparando-se com os dados observados em análise qualitativa de aminoácidos para este estágio de desenvolvimento (Tabelas 8, 9 e 10), observou-se que para T1 e T2, as concentrações maiores de asparagina solúvel observadas estão em caule e raiz, o que indica que a amida presente no caule possivelmente está sendo translocada para as folhas, onde é degradada; já a asparagina presente nas raízes provavelmente é degradada neste mesmo tecido, por ação da enzima ASNase. Para as plantas referentes a T3, há baixas concentrações de asparagina presentes em caule e raiz, mas a presença da enzima indica que há degradação em todos os tecidos.

Elias et al. (1997) relatou que em *Manihot esculenta crantz* ASNase apresentava máximos níveis de atividade em raiz e folha; Streeter (1977) relatou alta atividade de ASNase em raiz e nódulos de *Lupinus alba*, sendo o mesmo padrão de atividade é relatado por Atkins (1983) para raiz e folhas de soja. Ireland & Joy (1983) relatou que em folhas jovens os níveis de atividade de ASNase eram altos, enquanto em folhas maduras estes níveis eram reduzidos. Para *Canavalia ensiformes* (L.), a presença da enzima ASNase em tecidos de plantas em estágio vegetativo pode ser correlacionada à concentração de asparagina presente no tecido, no mesmo estágio de desenvolvimento; no entanto a degradação desta amida por ação da enzima ASNase pode não ser completa, podendo estar ocorrendo catabolismo por ação de asparagina-aminotransferase, já que, segundo Streeter (1977) em folhas maduras ASNase mostrou-

se insuficiente para metabolizar a asparagina presente, em soja, ocorrendo aumento na atividade de asparagina-aminotransferase neste tecido.

Figura 4 - WESTERN BLOT de amostras de tecidos de plantas (E1= início de nodulação). 1, 2 e 3, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 7,5 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9, raiz, caule e folha de plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; J, semente imatura de *Crotalaria juncea* (padrão). A seta indica o local da reação.

J 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Figura 5 - Eletroforese em gel nativo (coloração com prata) de amostras (proteína total) de tecidos de plantas (E2= início de florescimento). 1, 2 e 3, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 7,5 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9, raiz, caule e folha de plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; J, semente imatura de *Crotalaria juncea* (padrão).

Pelo método utilizado, as concentrações das amostras de proteína foram padronizadas, de forma que as quantidades de proteína aplicadas no gel para eletroforese fossem padronizadas, o que pode ser observado pela Figura 5, onde confirma-se que todas as amostras apresentavam altas concentrações de proteínas, inferindo que as diferenças nos resultados obtidos por WESTERN BLOT restringem-se à quantidade da enzima ASNase presente ou não na amostra.

Na Figura 6, observou-se reação positiva para as amostras 1, 2, 3 (raiz, caule e folha de plantas referentes a T1), 4 e 5 (raiz e caule de plantas referentes a T2), indicando a presença da enzima nestes tecidos, quando as plantas estão em início de

florescimento (E2). Comparando-se com os dados observados para análise qualitativa de aminoácidos para este estágio de desenvolvimento (Tabelas 11, 12 e 13), observou-se que há altas concentrações de asparagina solúvel em caule para T1 e T2, altas concentrações em folhas para T2, quando comparado com T1, e concentrações moderadas em raiz, o que justifica a presença da enzima nos tecidos avaliados. Quando se observou a concentração de asparagina translocada via xilema, para este estágio (Tabela 14), percebeu-se que a concentração de asparagina translocada em T1 era superior à presente em seiva de xilema de T2 (49, 42 e 7,55 nanomoles/ml, respectivamente), o que sugere que a alta concentração de asparagina em folhas de T2 pode estar relacionada à síntese neste tecido, ou à baixa degradação, já que não se observa presença da enzima no mesmo. A ausência da enzima em folhas de plantas referentes a T2 pode, ainda, indicar que a asparagina presente está sendo incorporada em proteínas ou está sendo translocada para outros tecidos onde é degradada.

As concentrações de asparagina solúvel em tecidos de plantas referentes a T3 são baixas quando comparadas aos demais tratamentos, o que parece justificar a ausência da enzima nestes tecidos.

Em *Manihot esculenta* crantz, Elias et al. (1997) relatou que ASNase apresentava máximos níveis de atividade em raiz e folha, o que pode ser correlacionado à presença da enzima em raiz e folha de plantas referentes ao tratamento T1 e raiz de plantas referentes ao tratamento T2 (Figura 6), em *Canavalia ensiformes* (L.); Streeter (1977) relatou alta atividade de ASNase em raiz e nódulos de *Lupinus alba*, sendo o mesmo padrão de atividade é relatado por Atkins (1983) para raiz e folhas de soja.

Figura 6 - WESTERN BLOT de amostras de tecidos de plantas (E2= início de florescimento). 1, 2 e 3, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 7,5 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9, raiz, caule e folha de plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; J, semente imatura de *Crotalaria juncea* (padrão). A seta indica o local da reação.

Ireland & Joy (1983) relatou que em folhas jovens os níveis de atividade de ASNase eram altos, enquanto em folhas maduras estes níveis eram reduzidos. Para *Canavalia ensiformes* (L.), a presença da enzima ASNase em tecidos de plantas em início de fase reprodutiva (Figura 6; E2, início de florescimento) pode ser correlacionada à concentração de asparagina presente no tecido, no mesmo estágio de desenvolvimento; Sieciechowicz (1988a) relatou que em folhas maduras a atividade da enzima ASNase é reduzida, enquanto a atividade de asparagina-aminotransferase é aumentada, de forma

que, em *Canavalia ensiformes* (L.) a degradação de asparagina por ação da enzima ASNase pode não ser completa, podendo estar ocorrendo catabolismo por ação de asparagina-aminotransferase. Streeter (1977) relatou que, em folhas maduras, ASNase mostrou-se insuficiente para metabolizar a asparagina presente, em soja, ocorrendo aumento na atividade de asparagina-aminotransferase neste tecido; o mesmo padrão de degradação de asparagina pode estar acontecendo para as amostras avaliadas de *Canavalia ensiformes* (L.), de forma que ASNase não seja responsável pela total degradação de asparagina, para estes tecidos.

Figura 7 - Eletroforese em gel nativo (coloração com prata) de amostras (proteína total) de tecidos de plantas (E3= início de formação de frutos). 1, 2 e 3, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 7,5 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9, raiz, caule e folha de plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; J, semente imatura de *Crotalaria juncea* (padrão).

Pelo método utilizado, as concentrações das amostras de proteína foram padronizadas, de forma as quantidades de proteína aplicadas no gel para eletroforese fossem padronizadas, o que pode ser observado pela Figura 7, onde confirma-se que todas as amostras apresentavam altas concentrações de proteínas, inferindo que as diferenças nos resultados obtidos por WESTERN BLOT restringem-se à quantidade da enzima ASNase presente ou não na amostra.

Na Figura 8, observou-se que houve reação positiva para as amostras 1, 3 (raiz e folha de T1) e para a amostra 4 (raiz de T2), indicando a presença da enzima nestes tecidos quando as plantas iniciam a formação de frutos (E3). Comparando-se a reação à concentração de asparagina nos tecidos de plantas neste estágio de desenvolvimento, observou-se que em folhas (Tabela 15) nenhum dos três tratamentos apresentava asparagina solúvel, o que infere que a asparagina translocada às folhas, em T1, poderá estar sendo rapidamente degradada de forma a liberar amônia à síntese de outros aminoácidos necessários ao estágio em questão, conforme sugere a presença da enzima. Não se observa a presença de asparagina solúvel nos demais tecidos, para este tratamento, no entanto há presença de asparagina sendo translocada via xilema (Tabela 18), o que corrobora a presença da enzima em folhas. A presença de ASNase em raízes indica que também neste tecido há degradação desta amida, de forma a liberar amônia à síntese de outros aminoácidos.

Para T2, observou-se a presença de baixas concentrações de asparagina em caule (Tabela 16) e raízes (Tabela 17), mas não em seiva de xilema (Tabela 18), indicando que a amida não é translocada para as folhas, o que justifica a ausência de ASNase neste tecido; no entanto, a presença da enzima em raízes, indica que ocorre degradação de asparagina neste tecido, mas a ausência de ASNase em caule sugere que a asparagina presente neste tecido poderá estar sendo incorporada a proteínas, já que não se observa este aminoácido na forma solúvel em folhas.

Para T3, as concentrações de asparagina em caule e raízes é baixa, e não está presente em folhas, como nos demais tratamentos, o que pode justificar a ausência de ASNase nos tecidos de plantas referentes a este tratamento.

Figura 8 - WESTERN BLOT de amostras de tecidos de plantas (E3= início de formação de frutos). 1, 2 e 3, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6, raiz, caule e folha, respectivamente, de plantas recebendo solução nutritiva com 7,5 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9, raiz, caule e folha de plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; J, semente imatura de *Crotalaria juncea* (padrão). A seta indica o local da reação.

A presença de ASNase em raiz e folhas de plantas referentes a T1 e em raiz de plantas referentes a T2 (Figura 8) pode estar correlacionada à presença de atividade da enzima nestes tecidos; em *Manihot esculenta crantz*, Elias et al. (1997) relatou que ASNase apresentava máximos níveis de atividade em raiz e folhas, o que pode ser correlacionado à presença da enzima nos referidos tecidos de *Canavalia ensiformes* (L.).

Streeter (1977) relatou alta atividade de ASNase em raiz e nódulos de *Lupinus alba*, sendo que o mesmo padrão de atividade é relatado por Atkins (1983) para raiz e folhas de soja, o que infere que a presença de ASNase em tecidos de raiz de *Canavalia ensiformes* (L.) pode representar degradação de asparagina pela ação desta enzima. Ireland & Joy (1983) relatou que em folhas jovens os níveis de atividade de ASNase eram altos, enquanto em folhas maduras estes níveis eram reduzidos. Para *Canavalia ensiformes* (L.), a presença da enzima ASNase em folhas de plantas em início formação de frutos (E3, Figura 8) pode ser correlacionada à concentração de asparagina presente no tecido, no mesmo estágio de desenvolvimento; Sieciechowicz (1988a) relatou que em folhas maduras a atividade da enzima ASNase é reduzida, enquanto a atividade de asparagina-aminotransferase é aumentada, de forma que, em *Canavalia ensiformes* (L.) a degradação de asparagina por ação da enzima ASNase pode não ser completa, podendo estar ocorrendo catabolismo por ação de asparagina-aminotransferase.

Streeter (1977) relatou que, em folhas maduras, ASNase mostrou-se insuficiente para metabolizar a asparagina presente, em soja, ocorrendo aumento na atividade de asparagina-aminotransferase neste tecido, o que infere que a ASNase presente em folhas de plantas referentes a T1 pode ser responsável apenas pela degradação parcial da asparagina presente neste tecido.

5 CONCLUSÕES

- As principais formas de reserva de nitrogênio metabolizado utilizadas por *Canavalia ensiformes* (L.) constituem-se em aminoácidos e ureídeos, especialmente alantoína;
- Como forma de reserva de aminonitrogênio, as maiores concentrações observadas foram glicina, na forma solúvel, e glutamato + glutamina, na forma incorporada a proteínas, demonstrando serem estes os principais aminoácidos utilizados como reserva em *Canavalia ensiformes* (L.);
- A espécie não demonstrou armazenar grandes quantidades de proteína, sendo que houve grande síntese desta forma de nitrogênio metabolizados nos primeiros estádios de desenvolvimento;
- As variações na concentração de nitrato fornecida às plantas alterou significativamente as concentrações de proteína presente nos tecidos de *Canavalia ensiformes* (L.), em plantas em estágio vegetativo;
- Durante o estágio vegetativo, os níveis observados de ureídeos presentes nos tecidos foram baixos, havendo aumento de síntese como início da fase reprodutiva;

- Durante o estágio reprodutivo, alantoína foi a principal forma de ureídeo translocado via xilema;
- Canavanina, ao contrário do reportado na literatura, não foi a principal forma de aminonitrogênio armazenada em *Canavalia ensiformes* (L.), tendo demonstrado grande capacidade de síntese e translocação deste aminoácido nos estádios iniciais de desenvolvimento;
- Nos estádios iniciais de desenvolvimento, os níveis de glicina e glutamina foram reduzidos, ocorrendo incremento nos níveis de asparagina e canavanina solúveis, em *Canavalia ensiformes* (L.);
- Durante os primeiros estádios de desenvolvimento ocorreu aumento nos níveis de metionina e isoleucina, demonstrando ocorrer aumento preferencial nesta via de síntese, a via do aspartato;
- Os níveis de nitrato fornecidos alteraram drasticamente o metabolismo de aminoácidos em *Canavalia ensiformes* (L.), tendo se observado grandes variações especialmente nos tratamentos T1 e T2 (plantas recebendo 15 mM e 7,5 mM de NO_3^- em solução, respectivamente);
- Com o início da fase reprodutiva o metabolismo de aminoácidos foi alterado, sendo que em T1 os aminoácidos presentes em maiores concentrações foram glutamina, glicina e serina e, em T2, foram leucina e Gaba;
- Os níveis de canavanina nos tecidos, durante o desenvolvimento, foram baixos, quando comparados aos níveis encontrados em plantas jovens (7 dias após a germinação);

- Em estágio vegetativo, a redução de nitrato em *Canavalia ensiformes* (L.) ocorria principalmente em folhas, sendo baixa nas raízes. Com o início da fase reprodutiva, o sítio de redução de nitrato foi invertido, passando a ter lugar predominantemente nas raízes;
- A inversão do sítio de redução de nitrato com o início da fase reprodutiva foi acompanhada de um aumento nos níveis de glutamina solúvel em folhas, demonstrando que em *Canavalia ensiformes* (L.) glutamina regula a atividade da enzima nitrato redutase;
- Em plantas jovens (7 dias após a germinação) e plantas referentes a T3 (recebendo solução nutritiva omissa em nitrato) foi observada atividade da enzima nitrato redutase, indicando que *Canavalia ensiformes* (L.) apresenta uma forma constitutiva de NR;
- Em plantas jovens (7 dias após a germinação) a enzima asparaginase demonstrou ser expressa em todos os tecidos, sendo que em plantas adultas os maiores níveis de expressão foram observados em plantas em estágio vegetativo;
- Os sítios de possível catabolismo de asparagina por ação da enzima asparaginase foram reduzidos durante o desenvolvimento, sugerindo que em plantas adultas ocorre aumento da degradação de asparagina por ação da enzima asparagina-aminotransferase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRELL, D.; LARSSON, C. M.; LARSSON, M. et al. Initial kinetics of ^{15}N -nitrate labelling of root and shoot N fractions of barley cultured at different relative addition rates of nitrate-N. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.35, p.923-931, 1997.
- AGUIAR, L. F. de. Estudo molecular e imunoquímico de asparaginase de *Crotalaria*. Campinas, 1995. 86 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas.
- ALBIN, D. M.; WUBBEN, J. E.; GABERT, V. M. The influence of hydrochloric acid concentration and measurement method on the determination of amino acid levels in soya bean products. **Animal Feed Science and Technology**, v.87, p.173-186, 2000.
- ALVES, B. J. R.; RESENDE, A. S.; URQUIAGA, S. et al. Biological nitrogen fixation by two tropical forage legumes assessed from the relative ureide abundance of stem solutes: N-15 calibration of the technique in sand culture. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.56, p.165-76, 2000.

- ANDREWS, M.; DEFARIA, S. M.; MCINROY, S. G. et al. Constitutive nitrate reductase activity in the leguminosae. **Phytochemistry**, v.29, n.1, p. 49-54, 1990.
- ATKINS, C. A.; PATE, J. S.; PEOPLES, M. B. et al. Amino acid transport and metabolism in relation to the nitrogen economy of a legume leaf. **Plant Physiology**, v.71, p.841-848, 1983.
- ATKINS, C. S.; FERNANDO, M.; HUNT, S. et al. A metabolic connection between nitrogenase activity and the synthesis of ureides in nodulated soybean. **Physiologia Plantarum**, v.84, p.441-447, 1992.
- BARNEIX, A.J.; CAUSIN, H. F. The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. **Journal of Plant Physiology**, v.149, p.358-362, 1996.
- BIELINSKI L. R.; TURNER, N. A. Separation and estimation of aminoacids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.17, p.278-293, 1966.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BUSH, D. R. Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.44, p.513-542, 1993.

- CATALDO, D. A.; HARRON, M.; SCHRADEV, L. E. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.6, p.71-80, 1975.
- CHALK, P. M. Characterization of novel inbred lines of white clover (*Trifolium repens* L.). II. Variation in N₂ fixation, NO₃ uptake and their interactions. **Euphytica**, v.103, p.45-54, 1998.
- CHAMPIGNY. M. L. Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. **Photosynthesis Research.**, v.46, p.117-127, 1995.
- CORBESIER, L.; HAVELANGE, A.; LEJEUNE, P. et al. N content of phloem and xylem exudates during the transition to flowering in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell and Environment**, v.24, p.367-375, 2001.
- DATE, R. A. Nitrogen a major limitation in the productivity of natural communities, crops and pastures in the Pacific area. **Soil Biology and Biochemistry**, v.5, p.5-18, 1973.
- DILWORTH, M. F.; DURE, L. Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination .10. Nitrogen flow from arginine to asparagine in germination. **Plant Physiology**, v.61, n.4, p.698-702, 1978.
- ELIAS, M.; NAMBIAN, B.; SUDHAKARAN, P. R. Catabolism of linamarin in cassava (*Manihot esculenta* crantz). **Plant Science**, v.126, p.155-162, 1997.

- EMES, M. J.; FOWLER, M. W. The intracellular location of the enzymes of nitrate assimilation in the apices of seedling pea roots. **Planta**, v.144, p.249-253, 1979.
- FERRARIO-MÉRY S.; MASCLAUX C.; SUZUKI A. et al. Glutamine and α -Ketoglutarate are metabolite signals involved in nitrate reductase gene transcription in untransformed and transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-glutamine- α -ketoglutarate aminotransferase. **Planta**, v.213, p.265-271, 2001.
- FINNEMAN, J.; SCHJOERRING, J. K. Translocation of NH_4^+ in oilseed rape plants in relation to glutamine synthetase isogene expression and activity. **Physiologia Plantarum**, v.105, p.469-477, 1999.
- FISCHER, W.-N.; ANDRÉ, B.; RENTSCH, D. et al. Amino acid transport in plants. **Trends in Plant Science**, v.3, n.5, p.188-195, 1998.
- FORDE, B. G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1465, p.219-235, 2000.
- GATHUMBI, S. M.; CADISCH, G.; GILLER, K. E. ^{15}N natural abundance as a tool for assessing N_2 -fixation of herbaceous, shrub and tree legumes in improved fallows. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, p.1059-1071, 2002.
- GIVAN, C. V. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. **Phytochemistry**, v.18, p.375-382, 1979.

- GOJON, A.; DAPOIGNY, L.; LEJAY, L. et al. Effects of genetic modification of nitrate reductase expression on $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake and reduction in *Nicotiana* plants. **Plant Cell and Environment**, v.21, p.43-53, 1998.
- GRENSON, M. Specificity and regulation of the uptake and retention of amino acids and pyrimidines in yeast. In: VANEK, Z., HOSTALEK, Z., CUDLIN, L. (Ed.) **Genetics of industrial microorganisms**. s.l Prague Academia, 1973, 1v.
- HALBLEIB, C. M.; LUDDEN, P. W. Regulation of biological nitrogen fixation. **Journal of Nutrition**, v.130, p.1081-1084, 2000.
- HARDY, R.W.F.; HAVELKA, V.P. Nitrogen fixation research: a key to world food. **Science**, v.188, p.633-643, 1975.
- HEESCHEN, V.; MATLOK, J.; SCHRADER, S. et al. Asparagine catabolism in bryophytes: Purification and characterization of two L-asparaginase isoforms from *Sphagnum fallax*. **Physiologia Plantarum**, v.97, p.402-410, 1996.
- HERRIDGE, D. F.; PALMER, B.; NURHAYATI, D. P. et al. Evaluation of the xylem ureide method for measuring N_2 fixation in six tree legume species. **Soil Biology and Biochemistry**, v.28, n.3, p.281-289, 1996.
- HWANG, I. D.; KIM, S. G.; KWON, Y. M. Canavanine metabolism in tissue cultures of *Canavalia lineata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, p.17-23, 1996a.

- HWANG, I. D.; KIM, S. G.; KWON, Y. M. Canavanine synthesis in the *in vitro* propagated tissues of *Canavalia lineata*. **Plant Cell Reports**, v.16, p.180-183, 1996b.
- IRELAND, R. J.; JOY, K. W. Subcellular localization of Asparaginase and Asparagine aminotransferase in *Pisum sativum* leaves. **Plant Physiology**, v.72, p.1127-1129, 1983.
- JARRET, H. W.; COOKSY, K. D.; WLLIS, T. et al. The separation of *o*-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reverse-phase chromatography on octylsilica column. **Analytical Biochemistry**, v.153, p.189-198, 1986.
- JIAO, G.; BARABAS, N. K.; LIPS, S. H. Nitrate uptake, storage and reduction along the root axes of barley seedlings. In: MARTINS-LONCAO, M.A. (Ed.) **Nitrogen in a sustainable ecosystem – from the Cell to the Plant**. Amsterdam: Kluwer, 2000. p.1-8.
- KAISER, W.M.; HUBER, S. C. Posttranslation regulation of nitrate reductase in higher plants. **Plant Physiology**, v.6, p.817-821, 1994.
- KING, B. J.; SIDDIQI, M. Y.; RUTH, T. W. et al. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. **Plant Physiology**, v.102, p.1279-1286, 1993.
- LAZOF, D. B.; RINCON, M.; RUFTY, T. W. et al. Aluminium accumulation and associated effects on $^{15}\text{NO}_3$ influx in roots of two soybean genotypes differing in Al tolerance. **Plant and Soil**, v.164, p.291-297, 1994.

- LEA, P. J.; FESTENSTEIN, G. N; HUGHES, J. S. et al. An immunological and enzymological survey of asparaginase in seeds of *Lupinus*. **Phytochemistry**, v.23, n.3, p.511-514, 1984.
- LOHAUS, G. Transport of amino acids with special emphasis on the synthesis and transport of asparagine in the Illinois low protein and Illinois high protein strains of maize. **Planta**, v.205, p.181-188, 1998.
- LOHAUS, G.; BURBA, M.; IELDT, I. I. W. Comparison of the contents of sucrose and amino acids in the leaves, phloem sap and taproots of high and low sugar-producing hybrids of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.45, p.1097-1101, 1994.
- MATTSON, M.; SCHJOERRING, J. K. Ammonia emission from young barley plants: influence of N-source, light/dark cycles and inhibition of glutamine synthetase. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.477-484, 1996.
- McCLURE, P. R.; ISRAEL, D. W. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. **Plant Physiology**, v.64, p.411-416, 1979.
- McCLURE, P. R; ISRAEL, D. W.; VOLK, R.J. Evaluation of the relative ureide content of xylem sap as an indicator of N₂ fixation in soybeans. **Plant Physiology**, v.66, p.720-725, 1980.
- MICHAELSON-YEATES, T. P. T.; MACDUFF, J. H.; ABBERTON, M. T.; RAISTRICK, N. Nodule function in symbiotic bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.) and Kersting's bean (*Macrotyloma geocarpum* L.) is tolerant of nitrate in root medium. **Annals of Botany**, v.82, p.687-690, 1998.

MIERSCH, J.; JÜHLKE, C.; STERNKOPF, G. et al. Metabolism and exudation of canavanine during development of alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Verko). **Journal of Chemical Ecology**, v.18, p.2117-2129, 1992.

MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. Ammonia assimilation. In: MIFLIN, B. J. (Ed.). The biochemistry of plants: amino acids and derivatives. New York: Academic Press, 1980. p.169-202.

MORCUENDE, R.; KRAPP, A.; HURRY, V. et al. Sucrose-feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of α -oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. **Planta**, v.206, p.394-409, 1998.

MURRAY, A. J. S.; BLACKWELL, R. D.; JOY, K. W. et al. Photorespiratory N donors, aminotransferase specificity and photosynthesis in a mutant of barley deficient in serine: glyoxylate aminotransferase activity. **Planta**, v.172, p.106-113, 1987.

OACKLEY, B. R.; KIRSCH, D. R.; MORRIS, N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting protein in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.105, n.2, p.361-363, 1980.

OAKS, A.; HIREL, B. Nitrogen Metabolism in roots. **Annual Review of Plant Physiology**, v.36, p.345-365, 1985.

OLIVER A. J.; SMITH S. E.; NICHOLAS D. I D. et al. Activity of nitrate reductase in *Trifolium subterraneum*. Effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. **New Phytologist**, v.94, p.63-79, 1983.

- ONO, F.; FROMMER, W. B.; WIRÉ, N., von. Coordinated diurnal regulation of low-and high-affinity nitrate transporters in tomato. **Plant Biology**, v.2, p.17-23, 2000.
- PADGETT, P. E.; LEONARD, R. T. Free amino acid levels and regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.871-883, 1996.
- PATE, J. S. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.31, p.313-340, 1980.
- PEOPLES, M. B.; ATKINS, C. A.; PATE, J. S. et al. Re-evaluation of the role of ureides in the xylem transport of nitrogen in *Arachis* species. **Physiologia Plantarum**, v.83, p.560-567, 1991.
- RADIN, J. W. "In vivo" assay of nitrate reductase in cotton leaf discs: effect of oxygen and ammonium. **Plant Physiology**, v.51, p.332-336, 1973.
- RAMIREZ, M.; ALPIZAR, L.; QUIROZ, J. et al. Formation of L-canavanine in *in vitro* cultures of *Canavalia ensiformes* (L.) DC. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.30, p.231-235, 1992.
- RENTSCH, D.; LALOI, M.; ROUHARA, I. et al. NTR1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. **FEBS Letters**, v.370, p.264-268, 1995.

- RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; SANTAMARÍA, C.; TEMPRANO, F. et al.
Interaction effects between *Rhizobium* strain and bean cultivar on nodulation, plant growth, biomass partitioning and xylem sap composition. **European Journal of Agronomy**, v.11, p.131-143, 1999.
- RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N.; SANTAMARIA, C.; TEMPRANO, F. et al.
Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. **Field Crops Research**, v.65, p.229-248, 2000.
- ROGNES, S. E. Glutamine-dependent asparagine synthetase from lupinus-luteus. **Phytochemistry**, v.14, n.9, p.1975-1982, 1975.
- ROSENTHAL, G. A. Purification and characterization of the higher plant enzyme L-canaline reductase. **Biochemistry**, v.89, p.1780-1784, 1992.
- ROSENTHAL, G. A. L-Canaline: a potent antimetabolite and anti-cancer agent from leguminous plants. **Life Sciences**, v.60, n.19, p.1635-1641, 1997.
- ROSENTHAL, G. A.; BERGE, M. A.; OZINSKAS, A.J. et al. Ability of L-canavanine to support nitrogen Metabolism in the jack bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p.1159-1163, 1988.
- ROSNICK-SHIMMEL, L. The influence of nitrogen nutrition on the accumulation of free amino acids ins mot tissue of *Urtica dioica* and their apical transport in xylem sap. **Plant and Cell Physiology**, v.26, p.215-219, 1985.
- ROZAN, P.; KUO, Y.-H.; LAMBEIN, F. Amino acids in seeds and seedlings of the genuns *Lens*. **Phytochemistry**, v.58, p.281-289, 2001.

- SAGI, M.; LIPS, H. S. The levels of nitrate reductase and MoCo in annual ryegrass as affected by nitrate and ammonium nutrition. **Plant Science**, v.135, p.17-24, 1998.
- SANZALFEREZ, S.; DELCAMPO, F. F. A comparative-evaluation of the symbiotic N₂ fixation and physiological performance of 36 native legume species collected in a tropical savanna during the rainy and dry seasons. **Symbiosis**, v.16, p.225-247, 1994.
- SARAVITZ, C. H.; DEVIENNE-BARRET, F.; RAPER, C. D. et al. Nitrate uptake rate by soybean and wheat plants determined by external nitrate concentration and shoot mediated demand. **International Journal of Plant Sciences**, v.159, p.305-312, 1998.
- SCHUBERT, K. R. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and Metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, v.37, p.539-574, 1986.
- SHAHIDI, F.; CHAVAN, U. D.; BAL, A.K. et al. Chemical composition of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) plant parts. **Food Chemistry**, v.64, p.39-44, 1999.
- SIEBKE, K.; WEIS, E. Assimilation images of leaves of *Glechoma hederaceae*: analysis of non-synchronous stomata related oscillations. **Planta**, v.196, p.155-165, 1995.
- SIECIECHOWICZ, K. A.; IRELAND, R. J.; JOY, K. W. Diurnal variation of asparaginase in developing pea leaves. **Plant Physiology**, v.77, p.506-508, 1985.

- SIECIECHOWICZ, K. A.; IRELAND, R. J.; JOY, K. W. Diurnal changes in asparaginase activity in pea leaves. **Journal of Experimental Botany**, v.39, n.203, p.707-721, 1988a.
- SIECIECHOWICZ, K. A.; JOY, K. W.; IRELAND, R. J. The metabolism of asparagine in plants. **Phytochemistry**, v.27, n.3, p.663-671, 1988b.
- SILVEIRA, J. A. G.; MATOS, J. C. S.; CECATTO, V. M. et al. Nitrate reductase activity, distribution, and response to nitrate in two contrasting *Phaseolus* species inoculated with *Rhizobium* spp. **Environmental and Experimental Botany**, v.46, p.37-46, 2001.
- SIVASANKAR, S.; OAKS, A. Regulation of nitrate reductase during early seedling growth. **Plant Physiology**, v.107, p.1225-1231, 1995.
- SIVASANKAR, S.; ROTHSTEIN, S.; OAKS, A. Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings. **Plant Physiology**, v.114, p.583-589, . 1997.
- SODEK, L.; LEA, P. J. Asparaginase from test of developing lupin and pea seeds. **Phytochemistry**, v.34, p.51-56, 1993.
- SODEK, L.; LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Distribution and properties of a potassium-dependent asparaginase isolated from developing seeds of *Pisum sativum* and other plants. **Plant Physiology**, v.65, n.1, p.22-26, 1980.

- STEINER, H. Y.; SONG, W.; ZHANG, L. et al. An *Arabidopsis* peptide transporter is a member of a novel family of membrane transport proteins. **The Plant Cell**, v.6, p.1289-1299, 1994.
- STEWART, C. R. Effect of ammonium, glutamine, methionine sulfoximine and azaserine on asparagine synthesis in soybean leaves. **Plant Science Letters**, v.14, n.3, p.269-273, 1979.
- STITT, M.; KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. **Plant Cell and Environment**, v.22, p.583-621, 1999.
- STITT, M.; MULLER, C.; MATT, P. et al. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.370, p.959-970, 2002.
- STREETER, J. G. Asparaginase and Asparagine transaminase in soybean leaves and root nodules. **Plant Physiology**, v.60, p.235-239, 1977.
- TA, T. C.; JOY, K. W.; IRELAND, R. J. Amino acid Metabolism in pea leaves: utilization of nitrogen from amide and amino groups of [^{15}N]asparagine. **Plant Physiology**, v.74, p.822-826, 1984.
- TAN, X. W.; IKEDA, H.; ODA, M. The absorption, translocation, and assimilation of urea, nitrate or ammonium in tomato plants at different plant growth stages in hydroponic culture. **Scientia Horticulturae**, v.84, p.275-283, 2000.
- TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**, v.23, p.1005-1024, 2000.

- TISCHNER, R.; PEUKE, A.; GODBOLD, D. L. et al. The effect of NO₂-fumigation on aseptically grown spruce seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v.133, p.243-246, 1988.
- TOWBIN, H.; STAHLIN, T.; GORDON, J. Eletroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and sample application. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v.76, p.4350-4354, 1979.
- UDVARDI, M. K.; LISTER, D. L.; DAY, D. A. Biological nitrogen fixation-investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, v.141, p.13-39, 1992.
- ULLRICH, W. R. Nitrate and ammonium uptake in green algae and higher plants: mechanism and relationship with nitrate metabolism. In: ULLRICH, W. R.; APARÍCIO, P. J.; SYRETT, P. J. et al. (Ed). **Inorganic nitrogen metabolism**. New York: Springer, 1987. p. 32-38.
- VAN ETEN, C. H.; KWOLEK, W. F.; PETERS, J. E. et al. Plant seeds as protein sourcer for food or feed. Evaluation based on amino acid composition of 379 species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.15, p.1077-1089, 1967.
- VOGELS, G. D.; VAN DER DRIFT, C. Differential analyses of glyoxylate derivates. **Analytical Biochemistry**, v.33, p.143-157, 1970.
- Von WIRÉN, N.; GAZZERINI, S.; FROMMER, W. B. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. **Plant and Soil**, v.196, p.191-199, 1998.

- WALLACE W. Distribution of nitrate assimilation between the root and shoot of legumes and comparison with wheat. **Physiologia Plantarum**, v.66, p.630-636, 1986.
- WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; SHAHIDI, F.; BROSNAN, M. E. Changes in flax (*Linum usitatissimum*) seed nitrogenous compounds during germination. **Food Chemistry**, v. 65, p.289-295, 1999.
- WARD, M. R.; GRIMES, H. D.; HUFFAKER, R. C. Latent nitrate reductase activity is associated with plasma membrane in corn roots. **Planta**, v.177, p.470-475, 1989.
- WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.659-688, 2001.
- WILSON, D. G.; KING, K. W.; BURRIS, R. H. Transamination reactions in plants. **Journal of Biological Chemistry**, v.208, n.2, p.863-874, 1954.
- YEMM, E. M.; COCKING, E. C. Estimation of amino acids by ninhydrin. **Analyst**, v.80, p.209-213, 1955.

APÊNDICE

PREPARO DE REAGENTES E SOLUÇÕES:

1. Quantificação de Compostos Nitrogenados

Tampão Citrato (0,2 M, pH 5,0):

19,2 g ácido cítrico (500 ml H₂O)

29,4 g citrato de sódio (500 ml H₂O)

Ajustar o pH com a solução de ácido cítrico.

Solução Ninidrina 5%:

5 g ninidrina em 100 ml Metilglicol

Armazenar em frasco escuro.

Solução KCN (0,0002 M):

Estoque (0,01 M): 65 mg cianeto de potássio (KCN) em 100 ml H₂O

2 ml solução estoque em 100 ml (volume final) de metilglicol.

Solução Fenilhidrazina 0,33%:

100 mg cloridrato de fenilhidrazina em 30 ml H₂O

Preparar 3 horas antes de usar.

Solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1,65%:

500 mg ferricianeto de potássio em 100 ml H_2O

Não armazenar.

Tampão Fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$) 0,4 M, pH 7,0:

7,16 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ou 5,36 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ em 50 ml H_2O

2,72 g KH_2PO_4 em 50 ml H_2O

Ajustar o pH com solução de KH_2HPO_4 .

Solução Bradford:

200 mg azul-brilhante Comassie (G-250) em 50 ml de metanol ou etanol. Agitar por 2 horas.

Após homogeneização, adicionar 100 ml H_3PO_4 85% (ácido sobre o álcool). Agitar por 2 horas e deixar em repouso por 24 horas.

Completar para 1 litro e deixar em repouso por 24 horas. Filtrar e armazenar em frasco escuro.

2. Análise de Aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)**Solução A (Tampão $\text{NaOAc-Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,25):**

4,10 g acetato de sódio (NaOAc)

17,91 g fosfato dissódico $\cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)

Dissolver em H_2O Milli-Q; ajustar o pH para 7,25 com ácido acético. Adicionar 20 ml Metanol (para HPLC) e 20 ml tetrahidrofurano. Completar o volume para 1 litro.

Filtrar e degaseificar a solução antes de utilizar no equipamento.

Solução B (metanol 65%):

650 ml metanol (para HPLC) e 350 ml H₂O Milli-Q. Filtrar e degaseificar a solução antes de utilizar no equipamento.

Solução C (metanol 100%)

500 ml Metanol (para HPLC). Filtrar e degaseificar a solução antes de utilizar no equipamento.

Reagente OPA:

Tampão Borato pH 9,5:

2,5 g ácido bórico (em H₂O Milli-Q). Ajustar o pH para 9,5 com NaOH 2 N. Completar o volume para 100 ml.

OPA-Borato pH 9,5:

50 mg o-phtaldialdeído em 1 ml metanol (para HPLC). Após dissolver, adicionar 6,5 ml tampão borato pH 9,5. Armazenar em frasco escuro.

Reagente OPA:

500 µl OPA-Borato pH 9,5 e 4 µl β-mercaptoetanol. Armazenar em eppendorf escuro; mantém-se estável por cerca de 3 dias (em ambiente refrigerado).

3. Análise de Atividade da Enzima Nitrato Redutase (NR)

Tampão Fosfato (0,1 M, pH 7,5 + KNO₃):

21,45 g Na₂HPO₄ . 7 H₂O em 800 ml H₂O

4,14 g NaH₂PO₄ em 300 ml H₂O

Ajustar o pH com a solução NaH₂PO₄.

Para 500 ml tampão fosfato, adicionar 0,750 g KNO₃ (nitrato de potássio) e 5 ml de propanol (1%).

Sulfanilamida 1%:

1 g sulfanilamida em 100 ml HCl.

Naftiletileno 0,02%:

0,02 g naftiletileno em 100 ml H₂O.

4. Análise da Presença da Enzima Asparaginase (ASNase) por WESTERN BLOT

Tampão Tris HCl, pH 8,0 + 10% Glicerol (Para Extração da Enzima Asparaginase):

Tris (HCl /50mM pH 8,0) - 6,05 g/l + 10 % Glicerol + 1 mM DTT.

DTT 1 mM (PM= 154): 1 mM= 154 mg/l.

PAGE nativa ou não-dissociante:

Tampões e reagentes

A) TAMPÃO ELETRODO

Tris 1,25g - 0,25 M.

Glycina 7,2 g - 1,92 M

PH próximo de 8,3

500 ml Final.

B) TRIS pH 8,8 (3,0 M)

Tris 36,3 g

HCl 1 N $\pm$ 48,0 ml - pH 8,8

100 ml Final.

C) TRIS pH 6,8 (0,5 M)

Tris 6 g

HCl 0,1 N $\pm$ 48,0 ml - pH 6,8

100 ml Final.

D) ACRILAMIDA 30% Final

29,2 g Acrilamida

0,8 g Bis Acrilamida

100 ml Final.

Preparo do Gel

GEL DE SEPARAÇÃO (10% Acrilamida final)

10 ml D

7,5 ml B

12,5 ml H₂O

Final: 56 μ l TEMED

100 μ l Persulfato de NH₄ ou amônio, 10%.

GEL DE EMPILHAMENTO

2,5 ml C

1,25 ml D

6,0 ml H₂O

+ 2,5 µl Azul de Bromofenol

Final: 100 µl Persulfato de NH₄ ou amônio, 10%

20 µl TEMED.

WESTERN BLOT:

Tampões:

TBS pH 7,5

1,21 g Tris

9 g NaCl

Volume final 1 litro.

Ajustar pH com HCl 0,1 N.

TBS pH 9,5

6,05 g Tris

2,9 g NaCl

508 mg MgCl₂

Volume final 500 ml.

Ajustar pH com HCl 0,1 N.

TBS 7,5/0,1% TWWEN 20

1 l TBS pH 7,5 + 1ml TWWEN 20.

TBS 9,5/0,1% TWWEN 20

500 ml TBS pH 9,5 + 0,5 ml TWWEN 20.

TRIS-GLYCINA 20% MeOH

1 l Tris-Glycina (final) + 200 ml MeOH.

Preparo de NBT/BCIP/TBS pH 9,5:

NBT (Estoque): 50 mg/1 ml Dimetilformamida 70% (0,7 ml dimetilformamida + 0,3 ml H₂O).

Para uso: Retirar 165 µl em 25 ml TBS pH 9,5.

BCIP (Estoque): 25 mg/1 ml Dimetilformamida 50% (0,5 ml dimetilformamida + 0,5 ml H₂O). Aquecer a 37 ° C para ajudar a solubilizar.

Para uso: Retirar 165 µl em 25 ml TBS pH 9,5/NBT.